

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA DE
PROTEÍNAS QUINASAS CLK (CLK/STY, CLK2,
CLK3 Y CLK4) Y SU IMPLICACIÓN EN EL
CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS
DE LA ERITROLEUCEMIA MURINA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por
Ana García Sacristán
Madrid, Octubre de 2004

La presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización de la familia de proteínas quinasas clk (clk/STY, clk2, clk3 y clk4) y su implicación en el control de la diferenciación en células de la eritroleucemia murina”, ha sido realizada por la Licenciada Ana García Sacristán, bajo la dirección de la Dra. Dora B. Krimer Smunis, en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.).

Lic. Ana García Sacristán
para optar al título de Doctor

Vº Bº del Director de Tesis
Dra. Dora B. Krimer Smunis

Vº Bº del Tutor de Tesis
Dr. Jose G. Gavilanes Franco

27 de Septiembre de 2004

*A mis padres, mis hermanos y mis abuelos:
me enseñasteis a creer en el Dios de las pequeñas cosas.*

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Débora Krimer la oportunidad que me ha brindado de realizar la tesis doctoral en su laboratorio. Especialmente quisiera agradecerle todo lo que he aprendido gracias a ella y el esfuerzo que ha realizado en los últimos meses para dar cuerpo a la tesis. También quiero agradecerles a los Doctores Pablo Hernández y Bernardo Schwartzman sus consejos e interés por mi trabajo de tesis.

En segundo lugar no solo quiero agradecer sino reflejar mi respeto y admiración por Marisa y Pili: me habéis ayudado infinitamente en el laboratorio, pero donde de verdad se nota vuestra influencia es en mi vida personal. Gracias por preocuparos tanto de mí.

Ahora llega el momento de agradecer a todos mis compañeros del U3B su ayuda, dedicación, ánimos y aguante. Sin vosotros no habría sido posible terminar esta tesis, creo que es justo dedicaros al menos una frase por todos los momentos que hemos compartido: en el laboratorio, en la mesa negra, en el VIP, en los bares, en casa de Raúl, Leti o Ali ...

Leti (y J.C.): Mi compañera de poyata, mi profe, mi paño de lágrimas, sabes que te he echado mucho de menos al final de la tesis.

Ali (y Paco): Mi profe bis, he aprendido mucho de ti. Recuerdo una de las primeras frases que me dijiste: "Para ser investigador hay que aprender a ser humilde" y sé que practicas con el ejemplo.

Raúl: Mi profe tris, una frase es poquito espacio para resumir lo que hemos pasado juntos. Espero que todo lo que compartamos a partir de ahora nos haga reir un poquito más.

Maria José: Gracias por animar la hora de la comida con tus "Historias Paraguayas"

Leo: Gracias por reirte siempre de mis bromas y por intentar que el ambiente del laboratorio fuera agradable.

Marta: Que sería de mi si no hubiera conocido Redilluera, sin las revistas de tu papi, sin el cocido de tu mami, sin San Bartola, sin tus regalitos ...sin ti.

Loli: Gracias por compartir conmigo las historias de Lucía y encontrar siempre el lado positivo.

Eva: Siempre tan pendiente de mi, preguntando como estaba y como me sentía.

Rosa: He aprendido mucho de ti, de tu seguridad y de tu forma de ser.

Alberto: El "aita", has sido un ejemplo de cómo se trabaja en el laboratorio.

Agur: No sabes como he echado de menos tus abrazos y el cariño que nos distes.

Luque: Por el tiempo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio eres un U3B de pleno derecho. Muchas gracias por hacernos reir tanto.

Ahora les toca el turno a mis vecinos de pasillo en el CIB de Velásquez: Pilar, Jose, Esther, Elena, Jesús, Amalia y Paula. Con vosotros he compartido mucho, me habéis animado y ayudado incondicionalmente, vuestra es también parte de la Tesis. A los Patricios y Carmelos: Alfonso, Carlos (gracias, gracias, muchas gracias), Patricia, Donna, Paco (que paciencia has tenido conmigo), Merche y Elena. A los vecinos de la séptima Cris y Tatu, de la quinta planta Esther, a Elisa y Maite (compras) y a Beril y Luisa que han sido un refugio dentro del CIB para olvidar por unos momentos la Tesis.

En estos años de trabajo han estado conmigo en los malos y los buenos momentos mis amigos: Ali, Llusa, Germán uno y Germán dos, Clara y Jose, Carlos, Ricardo y Nuria, Jose Miguel (Campos), Arancha y David y han venido al mundo nuevas adquisiciones Yago, Raúl y Sara. Todos vosotros sois la mejor parte de mi, muchas gracias.

A Mercedes, Julio, Héctor y Belén por los Viernes de "mujeres" en los que puedo olvidar y compartir mis problemas por unas horitas.

Por último, precisamente porque han sido, son y serán los pilares de mi vida quiero agradecerles a mis padres y a mis hermanos su paciencia, sus ánimos y su fe en mi. Papi ¡por fin hemos cruzado este puente!, mami ¡ahora de que me voy a quejar antes de acostarme!, Raque y H, ¡Espero compartir más desayunos en los que arreglamos el mundo en dos patadas!, Pedri y Cris ¡Por fin podré ir a Cantalojas!.

A los que se fueron antes de ver acabada la Tesis, mis abuelos, porque de ellos aprendí el valor de la superación personal.

Aclaración:

En la escritura de esta Memoria se ha evitado, en lo posible, el empleo de términos en lengua inglesa. No obstante, se ha mantenido la nomenclatura original de ciertos términos reconocidos y ampliamente utilizados en artículos científicos. Asimismo, se ha optado por los términos ingleses cuando resulta difícil traducir un concepto y no existe actualmente un consenso en la comunidad científica. Así, por ejemplo se han utilizado los términos *splicing*, *branch point* o *speckles*, entre otros.

Abreviaturas

BFU-E	Unidades formadoras de brotes eritroides	MEL-R	<i>Murine erythroleukemia</i> resistente
BSA	Albúmina de suero bovino	M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
B+	Benzidina positivo	mRNA	RNA mensajero
cDNA	DNA complementario	NGF	<i>Nerve growth factor</i>
CFU-E	Unidades formadoras de colonias eritroides	NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>
CHX	Cicloheximida	nt	Nucleótidos
CO₂	Ácido carbónico	N-terminal	Amino terminal
cpm	Cuentas por minuto	O.D.	Densidad óptica
C-terminal	Carboxi-terminal	PAGE	Electroforesis en geles de poli-acrilamida
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol	pb	Pares de bases
dATP	Trifosfato de desoxiadenina	PBS	Tampón fosfato salino
dCTP	Trifosfato de desoxicitosina	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DEPC	Dietilpirocarbonato	PKC	Proteína quinasa C
DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbeco</i>	PTB	<i>Polypyrimidine tract binding protein</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido	PTC	Codón de terminación prematuro
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PVDF	Polyvinilideno difluorado
E4	Exón 4	RNA	Ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético	RNA pol II	Enzima RNA polimerasa II
EPO	Eritropoyetina	rpm	Revoluciones por minuto
EPO-R	Receptor de eritropoyetina	RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a PCR
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>	SDS	Dodecil sulfato sódico
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>	snRNPs	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>
F-Mu1-V	<i>Friend murine leukemia virus</i>	SR	Serina Arginina
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>	SSC	Solución salina de citrato de sodio
HA	Hemaglutinina	SFFV	<i>Spleen focus forming virus</i>
HMBA	N,N'-Hexamethylene-bis-acetamida	TBE	Tris-Borato-EDTA
ISE	<i>Intronic splicing enhancer</i>	TBST	Tampón tris salino de Tween-20
ISS	<i>Intronic splicing silencer</i>	UV	Radiación ultravioleta
Kb	Kilobases		
KDa	KiloDalton		
MEL	<i>Murine erythroleukemia</i>		

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	
1. Introducción	
1.1. Línea celular MEL	1
1.2. Etapas de la diferenciación inducida de las células MEL	2
1.3. Mecanismos de diferenciación en células MEL: cambios a nivel molecular	4
1.4. Identificación de genes implicados en la diferenciación inducida en células MEL	6
1.5. El gen <i>clk</i> / <i>STY</i>	6
1.6. Familia de proteínas quinasas <i>clk</i>	9
1.7. La familia <i>clk</i> y el <i>splicing</i> alternativo	12
1.7.1. Elementos reguladores de <i>splicing</i>	13
2. Objetivos	16
3. Materiales y Métodos	
3.1. Cultivos celulares	17
3.1.1. Líneas celulares	17
3.1.2. Transfectantes estables derivados de MEL DS-19	17
3.1.3. Condiciones de cultivo	17
3.1.4. Ensayos de diferenciación	18
3.1.4.1. Tratamiento con HMBA	18
3.1.4.2. Ensayo de benzidina	18
3.1.5. Cinéticas de crecimiento y viabilidad	18
3.1.6. Tratamiento con cicloheximida	19

3.2. Transfecciones con vectores de expresión	19
3.2.1. Transfecciones estables con cationes lipídicos	19
3.2.2. Transfecciones transitorias mediante electroporación	19
3.3. Preparación y análisis de DNA	20
3.3.1. Extracción y purificación de DNA plasmídico	20
3.4. Preparación y análisis de RNA	20
3.4.1. Extracción y purificación de RNA	20
3.4.2. Transferencia a soportes sólidos	20
3.4.3. Hibridación con sondas marcadas	22
3.4.3.1. Marcaje con sustratos fluorescentes	22
3.4.3.2.- Marcaje con precursores radiactivos	22
3.4.4. RT-PCR	23
3.5. Preparación y análisis de proteínas	24
3.5.1. Purificación de proteínas	24
3.5.2. Transferencia e hibridación de proteínas	24
3.6. Inmunohistoquímica	25

4. Resultados

4.1. Características de células MEL DS-19 en cultivo	
4.1.1. Cinética de crecimiento de MEL DS-19 en cultivos con y sin HMBA	26
4.1.2. Estudio de la viabilidad celular de MEL DS-19 a lo largo de la diferenciación inducida con HMBA	27
4.1.3. Estudio de la diferenciación celular inducida por HMBA en células MEL DS-19	28
4.1.3.1. Determinación de células diferenciadas mediante ensayos con benzidina	28
4.1.3.2. Modulación de la expresión de β -globina a lo largo de la diferenciación	31

4.2. Clk/STY	
4.2.1. Aislamiento e identificación	32
4.2.2. Expresión a nivel de mRNA del gen clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida con HMBA	33
4.2.3. Estudio de la expresión de los transcritos, productos del <i>splicing</i> alternativo, de clk/STY en MEL DS-19 indiferenciadas y diferenciadas	34
4.2.4. Estudio de la expresión de los transcritos de 1,7 y 1,8 Kb de clk/STY en distintos tejidos de ratón	40
4.3. Caracterización y análisis de clk2, clk3 y clk4.	
4.3.1. Clonaje y caracterización de clk2, clk3 y clk4	41
4.3.2. Expresión a nivel de mRNA de los genes clk2, clk3 y clk4 en células MEL indiferenciadas y diferenciadas	45
4.3.3. Análisis de la expresión de los transcritos de la familia clk, producto de <i>splicing</i> alternativo, durante la diferenciación	46
4.3.4. Análisis comparativo por homología de secuencia de los clks	48
4.4. Estudio de la sobreexpresión de clk/STY y clk/STY ^{tr} en células MEL DS-19.	
4.4.1. Establecimiento de transfectantes estables en células MEL para clk/STY y clk/STY ^{tr}	52
4.4.2. Inducción de la diferenciación en transfectantes pEBBpurclk/STY y pEBBpurclk/STY ^{tr}	54
4.4.3. Análisis de la relación exclusión/inclusión del exón 4 en los transfectantes clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida	55
4.4.4. Estudio de la relación exclusión/inclusión del exón 4 de clk2, clk3 y clk4 en transfectantes clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida	56
4.5. clk4: identificación de un exón adicional que determina una nueva isoforma.	
4.5.1. Descripción de un exón adicional en el gen clk4	61
4.5.2. <i>Splicing</i> alternativo del exón 2' de clk4	66
4.5.3. Predicción de los distintos productos derivados de las isoformas de clk4	67

4.6. Regulación del <i>splicing</i> alternativo del exón 4 de la familia clk y del exón 2' de clk4.	
4.6.1. Análisis de la relación exclusión/inclusión del exón 4 de clk/STY, clk2, clk3 y clk4 en células MEL y MEL-R tratadas con cicloheximida	70
4.6.2. Localización de sitios de unión a la proteína PTB adyacentes al exón 4 de clk/STY, clk2, clk3 y clk4 y del exón 2' de clk4	72
4.6.3. Localización de sitios de unión a proteínas SR	75
4.7. Localización y distribución de las proteínas SC-35, clk/STY y clk/STY ^{tr} .	
4.7.1. Localización de SC-35 en células MEL y MEL-R	78
4.7.2. Localización de SC-35 y CLK/STY en transfectantes estables pEBBpurclk/STY	80
4.7.3. Localización celular de las proteínas CLK/STY, CLK/STY ^{tr} y SC-35 en células MEL DS-19	82
5. Discusión	
5.1. clk/STY y la determinación eritropoyética	84
5.2. Cambios en la expresión de clk/STY	85
5.3. Clk/STY ^{tr} : ser o no ser	87
5.4. Regulación del <i>splicing</i> alternativo del exón 4	89
5.5. Una nueva isoforma de clk4	91
5.6. Localización subnuclear de clk/STY y SC-35	94
6. Conclusiones	96
7. Bibliografía	98

1. Introducción

Los procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular se encuentran altamente coordinados en las células de los diferentes tejidos y órganos que componen un organismo vivo. En células tumorales se producen una serie de desequilibrios que afectan a estos procesos dando como resultado un crecimiento celular incontrolado, el bloqueo de la diferenciación y, en ocasiones, alteraciones en los patrones de muerte celular. Algunos autores consideran que por defecto las células tienden a ejecutar un programa de diferenciación y que, en el caso de las células tumorales, se produce un bloqueo en el desarrollo de este proceso (Harris, 2004). Esto no significa necesariamente que haya desaparecido la capacidad potencial para diferenciarse y, de hecho, se conocen agentes químicos capaces de inducir la diferenciación en células tumorales transformadas. A lo largo de los años, se han establecido diversas líneas celulares leucémicas capaces de desbloquear el proceso de diferenciación, que han facilitado el estudio de los mecanismos de la hematopoyesis (Tsiftoglou et al., 2003b). A su vez, han permitido desarrollar terapias anticancerígenas utilizando los distintos agentes inductores (Andreeff et al., 1992; Leszczyniecka et al., 2001; Reuben et al., 1976).

Uno de los objetivos del laboratorio en donde se ha desarrollado la presente tesis doctoral es la identificación y caracterización de genes involucrados en el proceso de diferenciación eritropoyética. Como principal modelo de estudio se utilizó una línea celular eritroleucémica conocida como células MEL (*murine erythroleukemia cells*) o células Friend, que constituye uno de los sistemas mejor caracterizados de reprogramación de células tumorales hacia una diferenciación y división celular terminal (Marks and Rifkind, 1978). El sistema de diferenciación *in vitro* de las células MEL nos ha permitido estudiar en este caso el comportamiento del gen *clk*/STY (y otros miembros de la familia *clk*) a lo largo de la diferenciación.

1.1. Línea celular MEL.

En el año 1966 Friend y colaboradores establecieron cultivos celulares derivados de tumores subcutáneos de células infectadas con un complejo vírico denominado complejo Friend (Friend et al., 1966). Cuando se clonaron las células tumorales en un

medio semisólido se observaron células inmaduras y eritroblastos en diferenciación, lo que sugería la potencialidad inherente de las células MEL en cultivo hacia la diferenciación eritroblástica. Posteriormente, estos datos fueron confirmados por varios laboratorios (Marks and Rifkind, 1978; Singer et al., 1974).

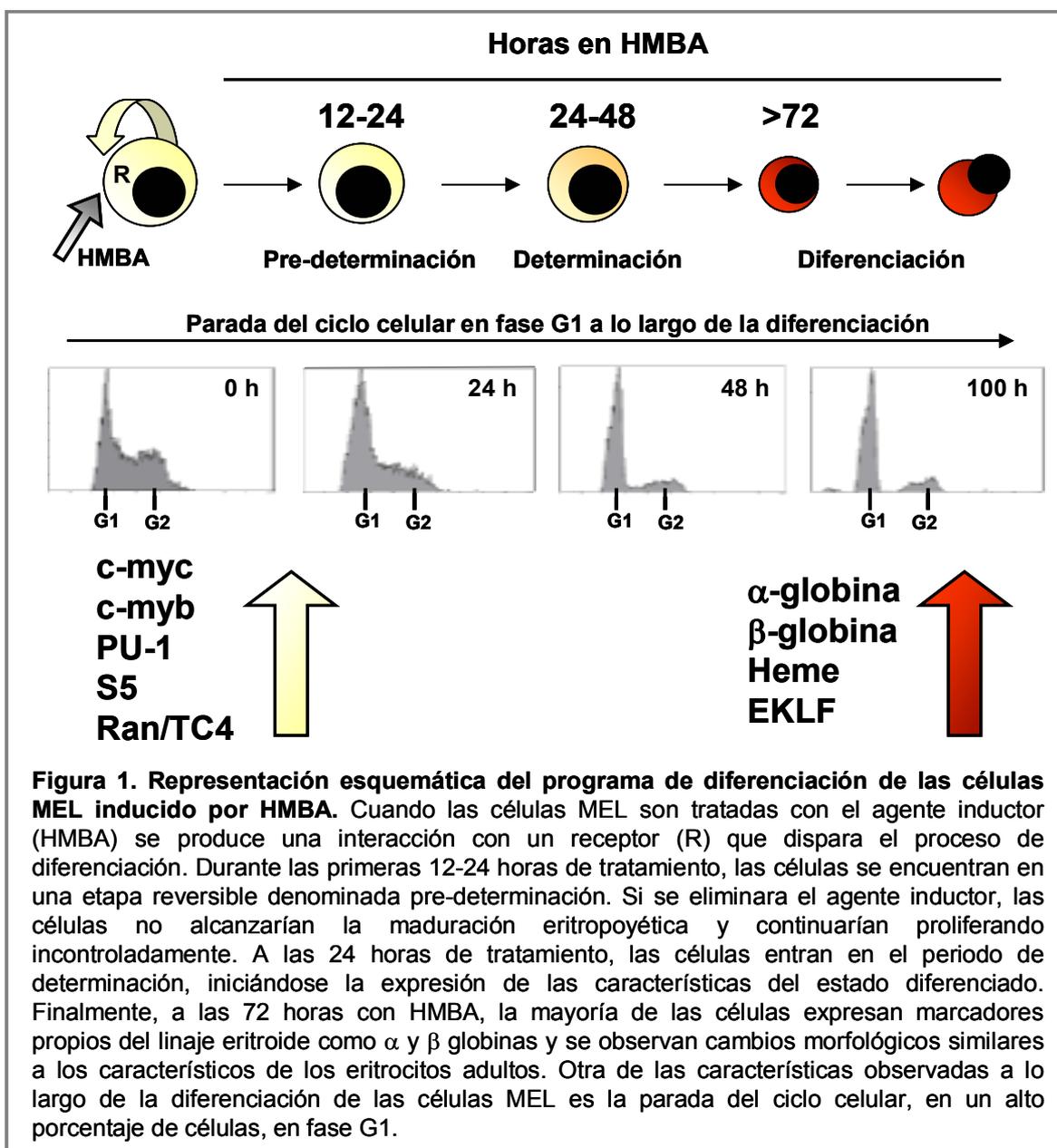
El complejo Friend está formado por el SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*), un virus deficiente en su replicación y responsable del efecto de proliferación celular, (Wolff and Ruscetti, 1985) y por el F-MuLV (*Friend Murine Leukemia Virus*), un virus que contiene los componentes necesarios para la replicación (Spiro et al., 1988). La especificidad del complejo Friend para inducir eritroleucemia sugiere que este complejo actúa perturbando el mecanismo regulador hematopoyético normal (Ben-David and Bernstein, 1991). El blanco primario de la infección viral son las células progenitoras eritroides BFU-E (“unidades formadoras de brotes eritroides”) y CFU-E (“unidades formadoras de colonias eritroides”) (Liao and Axelrad, 1975; Peschle et al., 1980). A diferencia de otras líneas eritropoyéticas, las células MEL no requieren eritropoyetina (Epo) para su crecimiento. Marks y colaboradores han sugerido que la capacidad de proliferación de las células MEL, en ausencia de Epo, se debe a la síntesis constitutiva de la proteína gp55 codificada por el gen *env* del SFFV y su asociación a la proteína receptora de eritropoyetina (Epo-R) (Marks et al., 1996; Ney and D'Andrea, 2000).

En el año 1971 se observó que algunos agentes químicos eran capaces de inducir el proceso de diferenciación en células MEL (Friend et al., 1971). A partir de ese momento, un gran número de compuestos han sido utilizados para inducir la diferenciación celular, entre los que se destacan el DMSO y el HMBA (Tsiftoglou et al., 2003b). Algunos de estos compuestos como el ácido retinoico, el DMSO, el ácido hidroxámico y el HMBA han sido utilizados con éxito para inducir la diferenciación de células tumorales en pacientes que padecían ciertos tipos de leucemia (Andreeff et al., 1992; Leszczyniecka et al., 2001; Reuben et al., 1976).

1.2. Etapas de la diferenciación inducida de las células MEL.

Cuando se trata un cultivo de células MEL con un agente inductor se producen una serie de procesos complejos que conducen a las células irreversiblemente hacia la maduración del linaje eritroide (Figura 1). Inicialmente, las células tratadas atraviesan un periodo de latencia (12-24 horas) denominado pre-determinación, caracterizado por

una depresión general de la expresión génica y en donde, eliminando el agente inductor, las células vuelven al estado inicial. A partir de ese momento, comienza la etapa de determinación en donde las células adquieren irreversiblemente la capacidad de cesar la división celular y expresar las características del estado diferenciado, aún en ausencia del agente inductor. A partir de las 72 horas se observa un porcentaje importante de células que expresan marcadores eritropoyéticos y a las 96 horas de tratamiento más del 90% de las células están diferenciadas (Marks and Rifkind, 1978; Reuben et al., 1976).



La inducción de la diferenciación de las células MEL está acompañada por numerosos cambios que son también característicos de la diferenciación de células eritroides normales. Entre ellos se destacan la inducción de la expresión de marcadores eritroides como las α y β globinas, los grupos heme, la anhidrina carbónica, los receptores de la espectrina y de la transferina, entre otros. Además, se producen cambios morfológicos similares a los observados en células eritroides diferenciadas: la relación de volumen entre núcleo y citoplasma decrece, la cromatina se condensa y el tamaño celular disminuye. La diferenciación culmina con el cese de la división celular y la pérdida de tumorigenicidad (Tsiftoglou et al., 2003a; Tsiftoglou et al., 2003b; Volloch and Housman, 1982).

1.3. Mecanismos de diferenciación en células MEL: cambios a nivel molecular.

Aunque han transcurrido más de treinta años desde el descubrimiento del sistema de diferenciación inducido de las células Friend, se desconoce el mecanismo utilizado por los distintos agentes inductores para iniciar la determinación de células eritroleucémicas. Una de las hipótesis más aceptadas es que los inductores activan diversas rutas de señalización. En la hematopoyesis normal los distintos factores de crecimiento interactúan con los receptores de membrana de las células precursoras provocando una activación/represión selectiva de genes que controlan a su vez la proliferación, diferenciación y apoptosis (Nicola, 1989). Epo, por ejemplo, activa la ruta de señalización PKC y la transcripción de c-myc y SCL (Hoffman et al., 2002; Mason-Garcia and Beckman, 1991; Nielsen et al., 1996). Por otro lado, Epo promueve la fosforilación del producto del gen SCL (Prasad et al., 1995) mientras que GATA-1 y Epo asociados fomentan la supervivencia de células eritroides regulando la expresión de Bcl-Xc (Gregory et al., 1999). Aparentemente, esta regulación está invalidada en eritroleucemias impidiendo la respuesta a los distintos factores de crecimiento para generar células maduras (Cantor and Orkin, 2002; Graf, 2002; Tenen, 2003; Zhu and Skoultchi, 2001). Existen evidencias que indican que algunos agentes inductores provocan la diferenciación de células eritroleucémicas a través de PKC (Rane and Reddy, 2002).

Además de los mecanismos que se desencadenan a través de las rutas de señalización, ocurren otros eventos que podrían influir en la diferenciación eritroleucémica tales como las alteraciones que se producen en la arquitectura de la membrana celular, la activación del transporte de iones de Ca^{2+} durante la pre-determinación, los cambios en las fases del ciclo celular, etc (Tsiftoglou et al., 2003b). Todos estos estímulos dan lugar sin duda a cambios selectivos en la expresión génica.

Es característico, por ejemplo, la caída en los niveles de expresión de varios protooncogenes como c-myc, c-myb y PU.1 durante las etapas tempranas de la determinación (Ramsay et al., 1986; Rao et al., 1997). Se ha propuesto que estos genes podrían regular negativamente elementos indispensables para la diferenciación eritropoyética y que su silenciamiento permitiría la expresión de estos elementos. De hecho, la expresión constitutiva de cualquiera de estos tres oncogenes inhibe la diferenciación inducida por HMBA o DMSO (Oikawa et al., 1999; Rao et al., 1997; Yamada et al., 1997).

Durante la última década, los esfuerzos por comprender las bases moleculares de la diferenciación eritropoyética llevó a la identificación de varios factores de transcripción linaje-específicos que incluyen a GATA-1, Scl/Tal-1, Ekf, Rb1 y NF-E2, entre otros (Migliaccio and Migliaccio, 1998; Orkin, 1995). En algunos casos, estos genes son esenciales en etapas muy tempranas del desarrollo, mientras que en otros actúan en células determinadas (Orkin and Zon, 1997). La expresión de algunos de estos genes durante la diferenciación de células MEL no presenta grandes variaciones como en los casos de GATA-1 y Scl/Tal-1, o se incrementa en etapas muy avanzadas como en Ekf y NF-E2, lo cual sugiere que ninguno de estos factores está regulando la entrada en diferenciación. Por otra parte, se han descrito cambios de expresión de genes relacionados en mayor o menor grado con la salida del ciclo celular, observándose en la mayoría de los casos una inactivación gradual como consecuencia de la división celular terminal (Krimer et al., 1993; LopezFernandez et al., 1997; Matushansky et al., 2000; Matushansky et al., 2003). Si bien es cierto que la salida del ciclo celular es un requisito indispensable para que las células puedan diferenciarse, la inactivación de estos genes no es suficiente para inducir la diferenciación.

La hipótesis de la existencia de un “gen maestro” que regula la determinación hacia un linaje específico como se propuso para Myo-D en el linaje muscular, no ha encontrado correspondencia en el linaje eritroide. Actualmente, es aceptado que la

expresión génica linaje–específica se consigue a través de la acción conjunta de factores de transcripción específicos y generales, lo que lleva finalmente a determinar que una célula pluripotencial se diferencie hacia un linaje celular determinado (Orkin, 2000).

1.4. Identificación de genes implicados en la diferenciación inducida en células MEL.

Uno de los objetivos del laboratorio en donde se desarrolló el presente trabajo de tesis es la identificación de genes implicados en los estadios tempranos de la diferenciación inducida en células tumorales. Durante las primeras horas del tratamiento de células MEL DS-19 con el agente inductor HMBA (pre-determinación) es cuando, probablemente, se producen los cambios esenciales que disparan las etapas de determinación previas a la diferenciación celular. Con el objeto de aislar genes que modifican su expresión durante la predeterminación de células MEL se llevaron a cabo experimentos de hibridación diferencial de una librería de cDNA proveniente de RNA aislado de células MEL tratadas durante 8 horas con HMBA 5 mM. Después de 2 rondas de hibridación diferencial con sondas complejas de cDNA provenientes de células MEL indiferenciadas o predeterminadas (tratadas con HMBA durante 8 horas) se obtuvieron distintos clones que expresaban genes de forma diferencial. Los genes se clasificaron como activados cuando su expresión aumentaba en células MEL determinadas y genes inactivados cuando su expresión disminuía (Figura 2) (Krimmer et al., 1993; Vanegas et al., 1997; Vanegas et al., 2003). Entre las secuencias aisladas en el laboratorio como genes activados se identificó el gen *clk*/*STY* que codifica para una proteína quinasa de doble acción capaz de fosforilar residuos de serina/treonina así como de tirosina (Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991).

1.5. El gen *clk*/*STY*.

Clk/*STY* es una proteína que pertenece al grupo de proteínas quinasa LAMMER que reciben este nombre por el motivo de aminoácidos “EHLAMMERILG” que está

altamente conservado en todos sus miembros. Los miembros de la familia LAMMER descritos hasta la fecha se indican en la Tabla I.

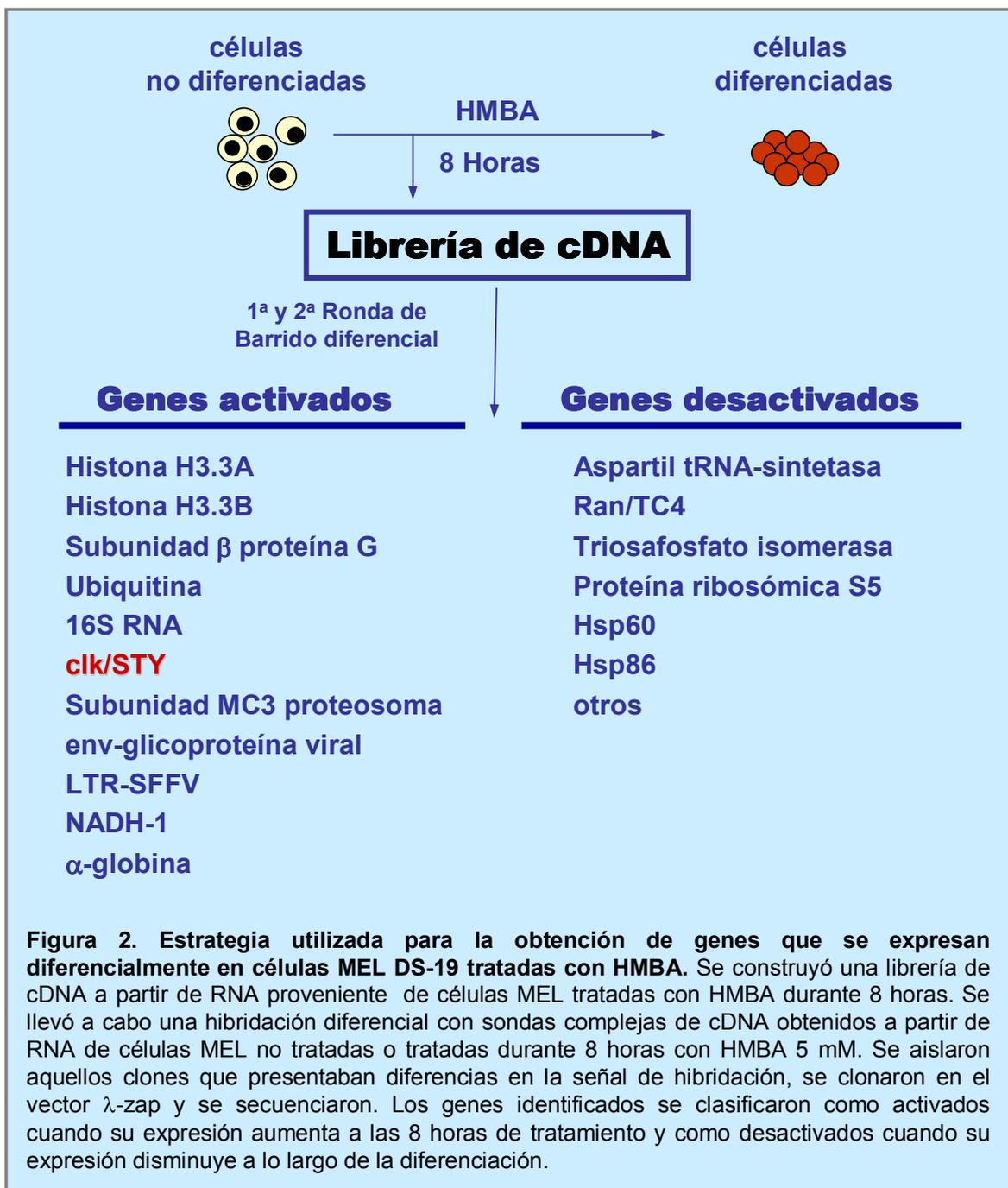


Tabla I: Proteínas que incluyen el dominio LAMMER

Organismo	Proteínas LAMMER	Citas
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Lkh1	(Park et al., 2003)
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	KNS1	(Padmanabha et al., 1991)
<i>Arabidopsis</i>	AFC1, AFC2 y AFC3	(Bender and Fink, 1994)
Tabaco	PK12	(Sessa et al., 1996)
<i>Drosophila</i>	<i>Doa</i>	(Rabinow and Birchler, 1989)
Ratón	clk/STY, clk2, clk3 y clk4	(Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991; Nayler et al., 1997)
Rata	clk3	(Becker et al., 1996)
Humano	clk/STY, clk2, clk3 y clk4	(Hanes et al., 1994; Johnson and Smith, 1991; Schultz et al., 2001)

Los distintos miembros de la familia LAMMER han sido implicados en procesos de control del crecimiento y diferenciación celular. Mutaciones en el gen *Doa* de *Drosophila* son letales en el embrión y conducen a defectos en la diferenciación, incluyendo anomalías en la segmentación, formación del ojo y desarrollo neuronal (Yun et al., 1994). AFC1 de *Arabidopsis* puede complementar los mutantes de señales de traducción de levaduras vía el factor de transcripción STE 12 (Bender and Fink, 1994). La expresión exógena de la proteína PK12 de tabaco produce retraso en el crecimiento de la raíz y la hoja de *Arabidopsis* (Savaldi-Goldstein et al., 2003). Recientemente, Muraki y colaboradores localizaron en la base de datos del genoma de *Xenopus*, una proteína homóloga a la familia de proteínas clk, denominada xclk. La inyección dorsal del mRNA de xclk produce anomalías morfológicas en el mesodermo y ectodermo, sugiriendo que xclk afectaría al desarrollo normal del embrión (Muraki et al., 2004). En células de mamíferos se ha observado que la sobreexpresión de clk/STY induce la diferenciación de células PC12 hacia un linaje neuronal (Myers et al., 1994).

Las distintas quinasas LAMMER han sido relacionadas con la fosforilación de proteínas SR, proteínas ricas en serinas y argininas y componentes esenciales de la maquinaria de *splicing*, y con la regulación del *splicing* alternativo (Savaldi-Goldstein et al., 2003). Se ha descrito por ejemplo que pK12 y AFC2 son capaces de unirse y fosforilar a las proteínas SR *in vitro* (Golovkin and Reddy, 1999; Savaldi-Goldstein et

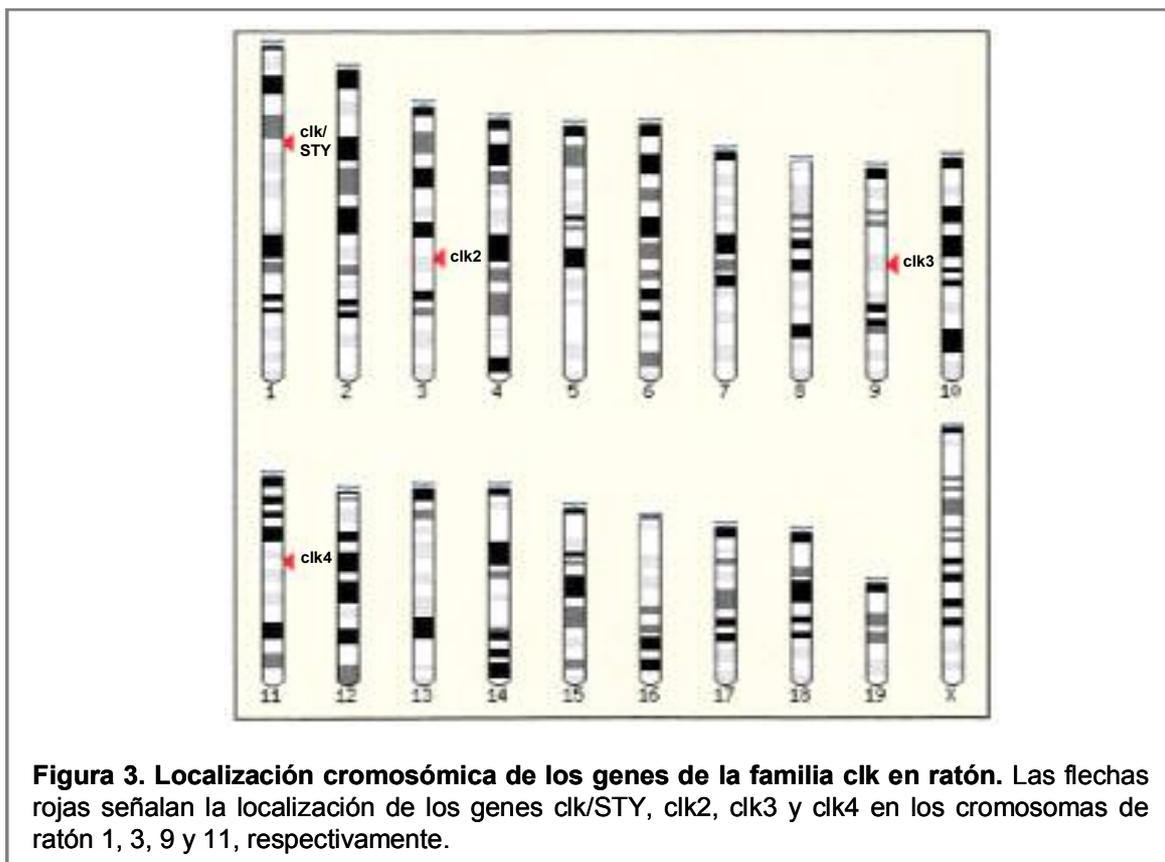
al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que la expresión de PK12 en *Arabidopsis* es capaz de modular el *splicing* alternativo de genes endógenos (Savaldi-Goldstein et al., 2003). En *Drosophila*, la pérdida de función de Doa afecta la diferenciación sexual mediante la alteración del *splicing* de determinados genes específicos, detectándose una hipofosforilación en las proteínas SR (Du et al., 1998).

Clk/STY participa en procesos de *splicing* constitutivo y alternativo, regulando la actividad y compartimentalización de las proteínas SR, para lo cual contiene una región amino-terminal enriquecida en dipéptidos RS capaz de interactuar con distintas proteínas SR (Colwill et al., 1996a; Stojdl and Bell, 1999). Se ha sugerido además, que clk/STY es capaz de autorregularse recurriendo a un *splicing* alternativo, generando una proteína catalíticamente activa o una isoforma truncada (Duncan et al., 1995).

Poco se conoce de la actividad de clk/STY durante la diferenciación. Se ha visto que clk/STY fosforila y activa la fosfatasa PTP-1B así como a su homóloga en levadura, YPTP1 (Moeslein et al., 1999). El incremento de proteínas fosfatasas ocurre curiosamente durante la diferenciación de células MEL (Kume et al., 1994); es más, la expresión exógena mediada por un vector de expresión inducible de la tirosina fosfatasa $\beta 2$ induce diferenciación en células MEL (Kume et al., 1996). Myers y colaboradores por su parte, observaron que cuando se sobreexpresa clk/STY en la línea neuronal PC12 se induce una diferenciación similar a la que se observa al tratar las células PC12 con NGF (Myers et al., 1994). Asimismo, se ha observado que la expresión de clk/STY se incrementa en células embrionarias (EC) inducibles a diferenciarse con ácido retinoico o con DMSO hacia el linaje neuronal o muscular, respectivamente (Howell et al., 1991). Estos datos en conjunto podrían apoyar la hipótesis que señala a clk/STY como modulador de la expresión génica mediante mecanismos diferentes a la actividad transcripcional: *splicing* alternativo, fosforilación de factores específicos, etc (Stojdl and Bell, 1999).

1.6. Familia de proteínas quinasas clk.

En mamíferos, además de clk/STY, se han descrito otros miembros de la subfamilia clk (clk2, clk3 y clk4) (Hanes et al., 1994; Nayler et al., 1997). En la Figura 3 se muestra la localización cromosómica de los cuatro miembros de la familia clk en ratón.



El dominio C-terminal, donde se localiza la actividad catalítica quinasa, está altamente conservado en los cuatro genes (Figura 4). El dominio N-terminal por el contrario, es más heterogéneo, contiene regiones ricas en residuos de serina y arginina y la señal de localización nuclear. El estudio comparado de las secuencias de las cuatro proteínas clk permitió observar una mayor similitud entre clk/STY y clk4, por un lado, y entre clk2 y clk3, por otro (Nayler et al., 1997).

Al igual que clk/STY, los otros miembros de la familia clk, son capaces de fosforilar residuos de serina, treonina y tirosina de proteínas SR (Lee et al., 1996; Nayler et al., 1997). En el caso de clk/STY y clk2, se ha descrito que son capaces de fosforilar y activar la tirosín fosfatasa PTP-1B (Moeslein et al., 1999). Asimismo, se ha observado que el residuo ser-141 del exón 4 de clk2, altamente conservado en los otros miembros de la familia clk, es un sitio de autofosforilación implicado en la localización nuclear de las proteínas clk (Nayler et al., 1998).

clk/STY	MRHSKRTYCPDWDERDWDYGTWRSSSSHKRKK-RSHSSAREQKRCR-YDHSKTTDSYYLE	58
clk4	MRHSKRTHCPDWSRE-SWGHEYSYSGSHKRR-RSHSSTQENRHCKPHHQFKDSDCHYLE	58
clk2	MPHPRRYHSSERGSRG-SYHEHYQSRKHKRRRSRSWSSSSDRTRRRRREDSYHVRSSSY	59
clk3	MHCKRYRSP-----PDPYLTYRWKRRRSYSREHEGRLRYPSRREPPRRRSRSH	52
	* * : * . . . : : * * : : * . . .	
clk/STY	SRSINEKAYHSRRYVDEYR-NDYMG-YEPGHPYGEPSRYQMSSKSSGRSGRSSYSKSH	116
clk4	ARCLNERDYRDRRYIDEYR-NDYCEGYVPRHYHRDVESTYRIHCSKSSVRSRRSSPK-RK	116
clk2	DDHSSDRRLYDRRYCGSYRRNDYSRDRGEAYDTRFRQSYEYHRENSSYSRQRSSRR-KH	118
clk3	DRIPYQRRYREHRSDTYRCEERSPSFGEDCYGSSRSRHRRRSRERAPYRTRKHAHCHK	112
	: : . : * . * * : : * : : : : :	
clk/STY	RSRHHTSQHSHGKSHRRKRSRSVEDDEEGHLICQSGDVLARS	176
clk4	RNRPCAS-HQSHSKSHRRKRSRSIEDDEEGHLICQSGDVLARS	175
clk2	RRRRRRSRTRFSRSSHSSRRRAKSVEDDAEGHLIYHVGDWLQER	178
clk3	RRTRSCSSASSRSQSSKRSRSVEDDKEGHLVCRIGDWLQER	172
	* * * : . . . : : * : * * * : : * * * * : * * * :	
clk/STY	CIDHKVGGRRVAVKIVKNVDRYCEAAQSEIQVLEHLNTTDPHSTFRVCVQMLEWFEHRGHI	236
clk4	CIDHGMGLHVAVKIVKNVGRYREAAARSEIQVLEHLNSTDPNSVFRVCVQMLEWFDHGHV	235
clk2	CVDHRRGGTRVALKIKNVEKYKEAARLEINVLEKINEKDPDNKNCVQMFDFDYHGHM	238
clk3	CLDHARGKSQVALKIIRNVGKYREAAARLEINVLLKIKEKDKENKFLCVLMSDFWVFNHGHM	232
	* : * * . . : * * : * * : * * * : * * * : * * : * * : * * : * * :	
clk/STY	CIVFELLGLSTYDFIKENSFLPFRMDHIRKMAYQICKSVNFLHSNKLTHTDLKPENILFV	296
clk4	CIVFELLGLSTYDFIKENSFLPFQIDHIRQMAYQICQSVNFLHNNKLTHTDLKPENILFV	295
clk2	CISFELLGLSTDFDKDNLYLPYPIHQVRHMAFQLCQAVKFLHDNKLTHTDLKPENILFV	298
clk3	CIAFELLGKNTFEFLKENNFQPYPLPHVRHMAYQLCHALRFLHENQLTHTDLKPENILFV	292
	** * * * * . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
clk/STY	KSDYTEAYNPKMKRDERTIVNPDIKVVDFGSATYDDEHSTLVSTRHYRAPEVILALGWS	356
clk4	KSDYVVKYNSKMKRDERTLKNTRDIKVVDFGSATYDDEHSTLVSTRHYRAPEVILALGWS	355
clk2	NSDYELTYNLEKKRDERSVKSTAVRVDFGSATFDHEHSTIVSTRHYRAPEVILELQV	358
clk3	NSEFETLYNEHKSCEEKSVKNTSIRVADFGSATFDHEHSTIVSTRHYRPPPEVILELQV	352
	: * : : * * . . : * : : . . : * : * * * : * : * * : * : * * * * * * * :	
clk/STY	QPCDVWSIGCILEEYLGFTVFSTHDSREHLAMMERILGPLPKHMIQKTRKRRYFHHDR	416
clk4	QPCDVWSIGCILEEYLGFTVFQTHDSKEHLAMMERILGPIPAHMIQKTRKRRYFHHNQL	415
clk2	QPCDVWSIGCILEEYVGFVTFQTHDNREHLAMMERILGVPVSRMIRKTRKQYFYRGR	418
clk3	QPCDVWSIGCILEEYRGTFLVQTHENREHLVMMKILGPIPSHMIHRTRKQYFYKGG	412
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :	
clk/STY	DWDEHSSAGRYVRRCKPLKEFMLSQDAEHELLFDLIGKMLEYDPAKRITLKEALKHPFF	476
clk4	DWDEHSSAGRYVRRCKPLKEFMLCHDEEHEKLFDLVRRMLEYDPAKRITLDEALQHPFF	475
clk2	DWDENTSAGRYVRENCKPLRRYLTSEAEDHHLFDLIENMLEYEPAKRITLGEALQHPFF	478
clk3	VWDENSSDGRYVKENCKPLKSYMLQDLEHVLFDLRRMLEYDPAQRITLAEALLHPFF	472
	* * * : * * * * . . * * * : : . : * * * * : * * * : * * : * * * * * * :	
clk/STY	YPLKKHT-----	483
clk4	DLKRR-----	481
clk2	ACLRTEPPNTKLDSSRDISR	499
clk3	AGLTPEERS---FHSSRNPSR	490
	* .	

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas clk/STY, clk2, clk3 y clk4. Análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas clk realizado en el programa Clustal del EMBL-EBI. La región de aminoácidos representados en azul corresponde al dominio quinasa. En gris se marcan los aminoácidos codificados por el exón 4. El dominio LAMMER se señala con una barra. El símbolo “*” indica residuos idénticos, “:” sustituciones conservadas y “.” sustituciones semi-conservadas.

1.7. La familia *clk* y el *splicing* alternativo.

Los datos que aportaron la secuenciación del genoma humano demostraron que el número total de genes (aproximadamente 30.000) era significativamente menor al esperado (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). La comparación con otros genomas puso en evidencia además, que el número de genes no difiere demasiado entre organismos, desde levaduras hasta el hombre. Es obvio, por lo tanto, que la complejidad de un organismo no está determinada por las diferencias en el número de genes. Los organismos superiores utilizan diferentes mecanismos para generar una diversidad proteica a partir de un número limitado de genes. Uno de los mecanismos que ayudan a dicha diversidad es el *splicing* alternativo, proceso por el cual los exones pueden incluirse o excluirse de un pre-mRNA y generar así distintas y múltiples isoformas (Caceres and Kornblihtt, 2002; Smith and Valcarcel, 2000). En la actualidad, se estima que en el 60% de los genes humanos se lleva a cabo un *splicing* alternativo de uno o más exones (Modrek and Lee, 2003). De las formas posibles de *splicing* alternativo la exclusión de un exón es la más común, en donde, durante el *splicing*, la exclusión de exones específicos ocurre en diferentes tejidos o diferentes estadios de la diferenciación (Miriami et al., 2003; Modrek et al., 2001). Los genes que codifican para las proteínas quinasas *clk* representan un ejemplo característico de *splicing* alternativo que acarrea la exclusión/inclusión de un exón dando lugar a dos isoformas funcionalmente distintas, una completa cuyo producto es una proteína potencialmente activa y una truncada que carece del dominio catalítico quinasa (Duncan et al., 1995; Duncan et al., 1997; Hanes et al., 1994).

En la presente tesis doctoral se analiza especialmente la relación entre las formas activa y truncada de las distintas proteínas *clk* durante la diferenciación de células MEL. En los últimos años se han descrito varias proteínas relacionadas con la maquinaria de *splicing* que, como *clk*, mediante el *splicing* alternativo producen dos isoformas, una completa y una truncada (Blanchette and Chabot, 1999; Jumaa et al., 1997; Jumaa and Nielsen, 1997; Le Guiner et al., 2001; Rueter et al., 1999; Sureau et al., 2001; Wollerton et al., 2004). Como veremos posteriormente en los apartados de resultados y discusión, estos datos nos han llevado a sugerir un nuevo nivel de regulación de la expresión génica.

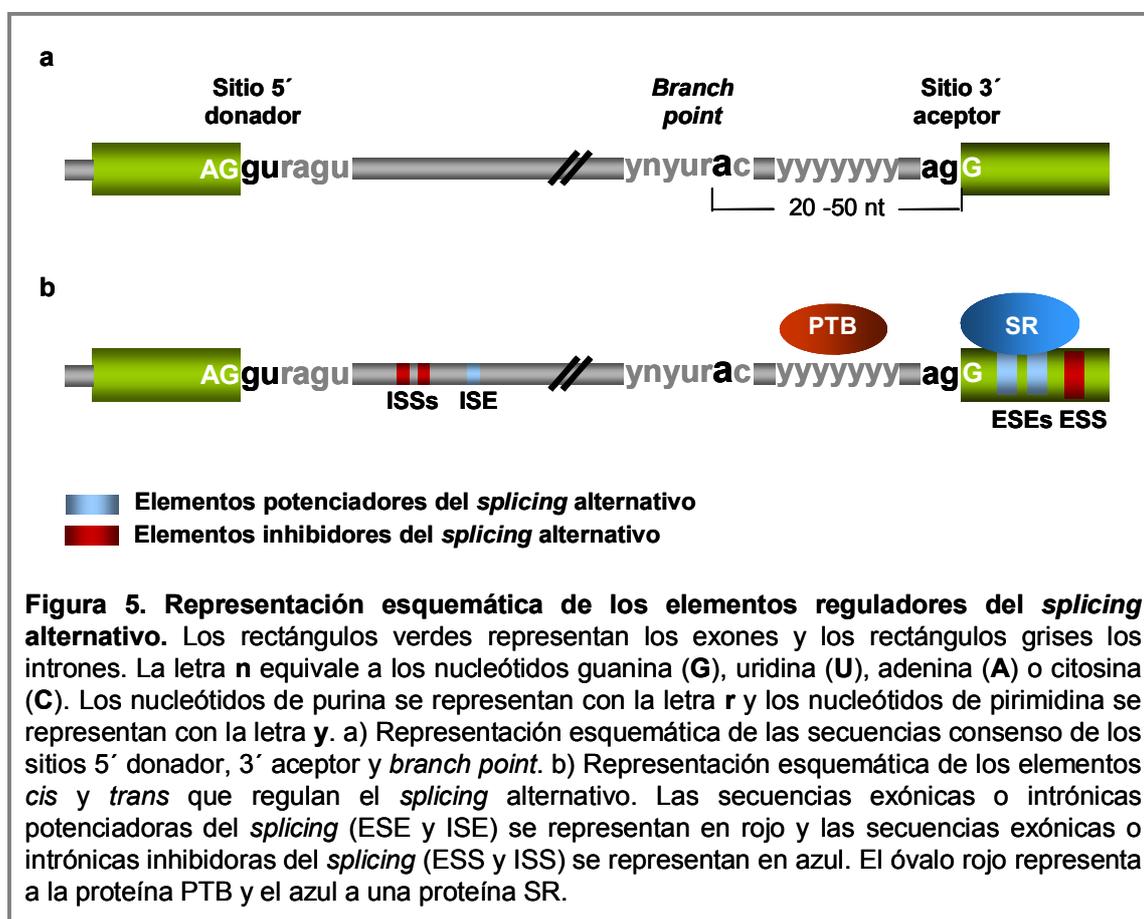
1.7.1. Elementos reguladores de *splicing*.

En vertebrados, los exones son normalmente secuencias cortas, de entre 50 y 300 nucleótidos, flanqueados por intrones que pueden medir hasta 500.000 nucleótidos, con un tamaño medio de aproximadamente 3.000 nucleótidos (Lander et al., 2001). El reconocimiento de los exones es un paso crítico que determina la correcta traducción de una proteína (Faustino and Cooper, 2003). Para realizar dicho reconocimiento existen secuencias conservadas que marcan las fronteras entre exones e intrones en los sitios de *splicing*. En mamíferos, el sitio de *splicing* 5' o "donador" es una secuencia invariable de dos nucleótidos "gu" en el contexto "AG/guragu" ("l", límite exón-intrón; R = G ó A). El sitio de *splicing* 3' o "aceptor" está definido por tres elementos: a) el *branch point*, cuya secuencia "ynyurac" (Y = C ó U; N = A, G, U ó C) contiene un residuo de adenosina invariable, normalmente localizado entre 18 y 40 nucleótidos corriente arriba del sitio 3' del intrón; b) una región de polipirimidinas de tamaño variable, localizada entre el *branch point* y el sitio 3' del intrón y c) el sitio de *splicing* 3' o "aceptor" formado por el dinucleótido invariable "ag" en el contexto "yag/N". Todas estas señales sirven de sitios de unión a distintos factores de *splicing* encargados de catalizar la eliminación de los intrones, e.g. las U snRNPs (small nuclear ribonuclear proteins).

Todos estos elementos de reconocimiento son necesarios pero no suficientes para el *splicing* alternativo. La regulación, en estos casos, está mediada por un balance entre distintos factores que actúan en *trans* uniéndose a elementos en *cis* influyendo, positiva o negativamente, en la ordenación de los exones. Las secuencias ESEs ("exonic splicing enhancers") son un ejemplo de potenciadores de *splicing* que sirven como sitios de asociación a las proteínas SR promoviendo así el reclutamiento de la maquinaria de *splicing* y/o antagonizando la actividad de elementos silenciadores (Figura 5) (Cartegni et al., 2002; Graveley, 2001; Smith and Valcarcel, 2000).

El mecanismo de actuación de las secuencias ESEs está todavía sin resolver (Bourgeois et al., 1999; Cote et al., 1999; Selvakumar and Helfman, 1999). Se ha sugerido que las proteínas SR interactúan con el factor de *splicing* U2AF, a través de los dominios RS, y se asocian a sitios adyacentes a la zona de polipirimidinas, lo cual induce a la utilización de los sitios de *splicing* 3' (Zuo and Maniatis, 1996). Alternativamente, se ha sugerido que las proteínas SR unidas al co-activador de

splicing SRm160/300 activa los sitios de splicing 5' ayudando a reclutar al factor U1 snRNP (Blencowe, 2000).



Antagonizando los efectos potenciadores de las secuencias ESEs se han descrito proteínas que reprimen el proceso de *splicing*. La mayoría de las secuencias silenciadoras forman parte de intrones (ISSs o *intrinsic splicing silencers*) aunque también se han descrito en exones (ESSs o *exonic splicing silencers*) (Chew et al., 2000; Kan and Green, 1999; Smith and Valcarcel, 2000). Una de las proteínas silenciadoras mejor caracterizadas es PTB (*polypyrimidine track binding protein*), identificada en extractos nucleares de células HeLa como una proteína de unión a intrones con dominios polipirimidínicos ricos en uridina (García-Blanco et al., 1989). Helfman y colaboradores demostraron que los sitios de unión de la proteína PTB eran necesarios en la exclusión del exón 7 de la isoforma de β -tropomiosina y propusieron que la proteína PTB actúa como represora de la inclusión de determinados exones (Mulligan et al., 1992). Estudios posteriores han implicado a la proteína PTB en la

regulación del *splicing* alternativo de α - y β -tropomiosina, fibronectina, *c-src*, receptor $\gamma 2$ de GABA_A y actinina (Chan and Black, 1997; Gromak et al., 2003; Liu et al., 2002; Mulligan et al., 1992; Norton, 1994; Southby et al., 1999). La inhibición de la expresión de PTB, utilizando RNA interferente (Wagner and Garcia-Blanco, 2002) y mutaciones dominantes negativas (Charlet et al., 2002), han confirmado que es una proteína capaz de reprimir el *splicing* alternativo *in vivo*. La existencia de sitios de unión a PTB, “tctt(c)” y en menor medida las secuencias “ttctc(ct)” (Cote et al., 2001) y ctctct (Chou et al., 2000), garantizan el silenciamiento del *splicing* cuando están presentes en intrones adyacentes al exón regulado (Gooding et al., 1998; Perez et al., 1997; Singh et al., 1995). Recientemente, Shen y colaboradores han demostrado que es suficiente un solo sitio de unión a PTB para inhibir el *splicing* alternativo de los exones M1 y M2 de IgM (Shen et al., 2004).

Según se admite actualmente, por lo tanto, el *splicing* alternativo es el resultado de un equilibrio entre fuerzas positivas y negativas que junto a una maquinaria constitutiva representa un nuevo nivel de regulación de la expresión génica. Clk/STY, así como los otros miembros de la familia clk, podrían formar parte de ese mecanismo de regulación. Los datos que aportamos en esta Tesis Doctoral ayudan a reforzar esta hipótesis.

2. Objetivos

Uno de los objetivos del laboratorio en donde se ha llevado a cabo la presente tesis doctoral es la identificación y caracterización de genes implicados en la diferenciación eritropoyética. Como modelo de trabajo se han utilizado células eritroleucémicas, que aunque inmortalizadas por la integración de un complejo vírico, son capaces de desbloquear el programa de diferenciación. En el presente trabajo se aisló e identificó el gen que codifica para la proteína quinasa clk/STY como un gen cuya expresión aumenta a lo largo de la diferenciación inducida. Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

- Analizar la expresión de clk/STY a lo largo de la diferenciación de células MEL inducida con HMBA. Caracterizar las diferentes isoformas del pre-mRNA de clk/STY y analizar en cada caso su patrón de expresión.

- Aislar otros miembros de la familia clk. Caracterizar la estructura y analizar su expresión a lo largo de la diferenciación de células MEL.

- Generar transfectantes estables de clk/STY, analizar los efectos de la sobreexpresión del gen a lo largo de la diferenciación y estudiar el posible papel regulador de clk/STY sobre el *splicing* alternativo de las isoformas de clk2, clk3 y clk4.

- Analizar la potencialidad de la familia clk para actuar como posibles reguladores de la expresión génica a través de una autorregulación del *splicing* alternativo.

- Estudiar la localización celular de clk/STY y SC-35 en células prediferenciadas y diferenciadas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivos celulares.

3.1.1.- Líneas celulares.

MEL DS-19 (*murine erythroleukemia*). Línea celular cedida por el laboratorio del Dr. Arthur Skoultchi del *Albert Einstein College of Medicine* de Nueva York. Deriva de una de las líneas originales establecidas por Charlotte Friend a partir de tumores subcutáneos de ratones infectados con el complejo vírico Friend ((Friend et al., 1966; Marks and Rifkind, 1978)) formado por el SFFV ("Spleen Focus Forming Virus") y el MuLV ("Murine Leukemia Virus").

MEL-R línea celular establecida en nuestro laboratorio a partir de MEL DS-19. Las células MEL-R se seleccionaron mediante pases sucesivos, en presencia de HMBA 5 mM, durante 4-8 semanas.

3.1.2.- Transfectantes estables derivados de MEL DS-19.

MEL DS-19 pEBBpuro Transfectante estable derivado de MEL DS-19 que contiene integrado el vector de expresión pEBBpuro que confiere resistencia a puromicina.

MEL DS-19 pEBBpurclk/STY Transfectante estable derivado de MEL DS-19 que contiene integrado el vector de expresión pEBBpurclk/STY

MEL DS-19 pEBBpurclk/STY^{tr} Transfectante estable derivado de MEL DS-19 que contiene integrado el vector de expresión pEBBpurclk/STY^{tr}.

3.1.3.- Condiciones de cultivo.

Las líneas celulares MEL DS-19, MEL-R, así como las líneas transfectadas derivadas, se mantuvieron en medio de cultivo básico Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO BRL laboratories). El medio se complementó con los antibióticos penicilina a una concentración 100 U/ml (GIBCO) y estreptomina a una concentración 100 µgr/ml (GIBCO) y suero fetal bovino (GIBCO y Eurolone) previamente inactivado a 55°C, a una concentración final del 10% (v/v). Los cultivos de las líneas celulares transfectadas se complementaron con 5 µgr/ml de puromicina (Sigma). Los cultivos de las células MEL-R se llevaron a cabo en presencia de N, N'-Hexamethylene-bis-

acetamida (HMBA) (Sigma) 5 mM. Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda en presencia de CO₂ al 5%.

3.1.4.- Ensayos de diferenciación.

3.1.4.1. Tratamiento con HMBA.

Las células MEL son líneas celulares inmortalizadas capaces de entrar en un programa de diferenciación bajo la acción de un agente inductor. A lo largo de este trabajo se utilizó como agente inductor el N, N'-Hexamethylene-bis-acetamida (HMBA) (Sigma), disuelto en agua destilada estéril a una concentración final de 5 mM (Reuben et al., 1976). El tratamiento con HMBA se llevó a cabo en cultivos celulares en crecimiento exponencial a una concentración de 2-3x10⁵ células/ml, recogiendo muestras entre las 0 y 120 horas. La incubación se realizó bajo las mismas condiciones descritas para el mantenimiento de los cultivos celulares.

3.1.4.2. Ensayo de benzidina.

Las células MEL diferenciadas se detectaron mediante el ensayo de benzidina (Gusella et al., 1976; Marks and Rifkind, 1978). La benzidina es un agente químico que reacciona con los grupos heme de la hemoglobina produciendo una coloración azul en las células diferenciadas. Para realizar estos ensayos se mezclaron volúmenes iguales de una suspensión celular y de una solución 77,7 mM de dihidrocloruro de benzidina (Sigma) conteniendo 0,3% de peróxido de hidrógeno (Merck). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó un conteo celular distinguiendo las células teñidas (diferenciadas) de las no teñidas (no diferenciadas). Para realizar preparaciones citológicas permanentes se recogieron 1x10⁶ células MEL a diferentes tiempos de tratamiento con HMBA, se lavaron con PBS 1x y se trataron con benzidina. Las células se centrifugaron a 700 rpm sobre un portaobjetos utilizando una citocentrífuga (Cytospin 3 SHANDON). Se agregó una gota del medio de montaje EUKITT (O. Kindler GmbH 86), se colocó un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.

3.1.5.- Cinéticas de crecimiento y viabilidad.

Las cinéticas de crecimiento de los cultivos se realizó contabilizando las células con ayuda de una cámara de Neubauer, a intervalos de 24 horas durante al menos 3

días. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión del colorante de azul de tripano. Se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión celular y de azul de tripano al 0,5% disuelto en PBS 1x (Sigma) y se cuantificó el número de células no teñidas (vivas) y de células teñidas de azul (muertas). En ambos casos se realizaron contajes de al menos 3 muestras de cultivos independientes.

3.1.6.- Tratamiento con cicloheximida.

Los cultivos de células MEL y MEL-R creciendo en fase exponencial se incubaron en presencia de cicloheximida (CALBIOCEM) 0,5 μ gr/ml en medio DMEM complementado con suero y antibióticos durante 6 horas. Las células tratadas se utilizaron para ensayos de inmunohistoquímica y RT-PCR.

3.2. Transfecciones con vectores de expresión.

3.2.1.- Transfecciones estables con cationes lipídicos.

Se utilizaron 3-5 μ gr de DNA plasmídico en 0,1 ml de medio DMEM sin suero (solución A). Se mezclaron 50 μ l de lipofectina (GIBCO) con 0,1 ml de medio DMEM sin suero (solución B) y se incubó 30-45 minutos a temperatura ambiente. Se mezclaron la solución A con la solución B y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió la mezcla (A+B) a 5×10^6 células MEL DS-19 resuspendidas en 0,7 ml de medio DMEM sin suero y se incubó durante 6 horas a 37°C en un incubador de CO₂. Se llevaron a cabo diluciones distribuyendo las células uniformemente en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 y 1×10^3 células por pocillo. Se incubó a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. La selección de los transfectantes se llevó a cabo en medio DMEM completo con puromicina a una concentración final de 5 μ gr/ml. Los clones seleccionados se transfirieron a frascos de cultivo para su amplificación.

3.2.2.- Transfecciones transitorias mediante electroporación.

En este caso las transfecciones se llevaron a cabo utilizando el procedimiento de la nucleofección desarrollado por Amaxa (Cell Line Nucleofector™ Kit V). Se transfectaron 5 μ gr de DNA plasmídico en 1×10^6 células creciendo en fase exponencial. Se mezclaron el suplemento de Cell Line Nucleofector™ Kit V (amaxa) con la solución

V Nucleofector™. Posteriormente, las células se resuspendieron en esta solución a una concentración final de 1×10^4 células/ml y se añadió el DNA plasmídico. La muestra se electroporó utilizando el programa T-16 del *Nucleofector™* (Amaxa). A continuación, se distribuyeron las células en placas de 12 pocillos un volumen final de 2 ml/pocillo. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda en presencia de CO₂ al 5%.

3.3. Preparación y análisis de DNA.

3.3.1.- Extracción y purificación de DNA plasmídico.

Se transformaron bacterias *Escherichia Coli* de la cepa DH5αF' con los plásmidos correspondientes, según el protocolo de Hanahan ((Hanahan, 1986)). Se amplificaron los cultivos en medio selectivo y se aisló el DNA plasmídico utilizando los kits de extracción *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) *Jetstar* (GENOMED) o *Wizard Plus* (Promega).

3.4. Preparación y análisis de RNA.

3.4.1.- Extracción y purificación de RNA.

Para aislar y purificar RNA total se utilizó el *Kit* de extracción Ultraspec-II RNA (BIOTECHX) o el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies). En ambos casos se emplearon $1-2 \times 10^7$ células por mililitro de solución de lisis. Se trató el homogeneizado con cloroformo y se recuperó la fase acuosa conteniendo el RNA. En el caso del RNA extraído con Ultraspec II se purificó con la resina RNA Tack y se resuspendió en agua tratada con DEPC. El RNA aislado con Trizol se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua tratada con DEPC. Se realizó una valoración espectrofotométrica del RNA total, considerando que 1 O.D. a 260 nm equivale a 40 µgr/ml de RNA. El grado de pureza con respecto a las proteínas contaminantes se obtuvo a partir de la relación O.D. 260/280 = 1,8-2. Las muestras fueron almacenadas a -70°C en agua tratada con DEPC.

3.4.2.- Transferencia a soportes sólidos.

Se disolvieron alicuotas de 20 μ gr de RNA total en una solución desnaturizante (formamida 50%, formaldehído 6%, ácido bórico 0,5M, borato de sodio 50 mM, sulfato de sodio 100 mM, EDTA 10 mM y glicerol 50%). Se calentó la muestra durante 5 minutos a 65°C y se fraccionó en geles de agarosa al 1,2 % con bromuro de etidio 0,5 μ gr/ml y formaldehído 3% en tampón borato (ácido bórico 0,5 M, borato de sodio 50 mM, sulfato de sodio 100 mM y EDTA 10 mM). Se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Zeta-probe (Bio-Rad) en SSC 10x y se fijó el RNA exponiendo la membrana a 1200 μ Julios en un *Stratalinker UV Crooslinker*.

3.4.3.- Hibridación con sondas marcadas.

3.4.3.1. Marcaje con sustratos fluorescentes.

Las membranas se prehibridaron en una solución salina NaPO₄ 0,5 M, SDS 7%, BSA 1% y 300 μ gr/ml de DNA de esperma de salmón desnaturizado durante al menos 3 horas a 65°C en un horno de hibridación de rotación continua. Se añadió la sonda marcada con fluoresceína N⁶-dATP siguiendo las instrucciones del *Random Primer Fluorescein Kit* comercializado por *NEN Life Sciences Products*, previamente desnaturizada y se hibridó durante 12-18 horas a 65°C. Se lavó dos veces a temperatura ambiente con NaPO₄ 40 mM y SDS 1% durante 10 minutos y a 65°C durante 60-90 minutos en la misma solución. Para la detección de la sonda marcada con fluoresceína se equilibró la membrana con una solución Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 y NaCl 0,15M. Se bloqueó durante 1 hora en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,15 M y 0,5% (p/v) del reactivo bloqueante y se incubó con el anticuerpo antifluoresceína *antifluorescein -AP* (NEN Life Science Products) durante 60 minutos. Se realizaron lavados con Tris-HCl 0,1 M pH 7,5/NaCl 0,15 M y a continuación con Tris-HCl 0,1 M pH 9,5/NaCl 0,1 M. Se trató la membrana con el reactivo quimioluminiscente CDP-*Star* (NEN Life Science Products) en Tris-HCl 0,1 M pH 9,5/NaCl 0,1 M y se expuso durante distintos tiempos hasta 3 días con películas AGFA Curix RP2.

3.4.3.2. Marcaje con precursores radiactivos

Los fragmentos de DNA se marcaron radiactivamente con 40 μ Ci de ³²P-dCTP siguiendo el protocolo del *kit Ready-to-go DNA Labelling Beads (-dCTP)*(Amersham Biosciences). Se separó el precursor radiactivo no incorporado de la sonda marcada con columnas Sephadex G-50 (Pharmacia). Se prehibridó en una solución que

contenía SDS 0,1x, Formamida 50%, SSC 5x, Buffer fosfato pH 7,2 o NaPO₄ pH 6,8 50 mM, Denhardt 5x, Pirofosfato 0,1x y 300 µgr/ml de DNA de esperma de salmón desnaturizado, durante al menos 3 horas a 42°C en un horno de hibridación de rotación continua. Se agregó la sonda previamente desnaturizada a la solución de hibridación a una concentración de 1x10⁷ cpm/ml y se hibridó durante 16-20 horas a 42°C. Se lavó dos veces en una solución SSC 2x/ SDS 0,1x a temperatura ambiente, una vez en las soluciones: SSC 1x/ SDS 0,1x, SSC 0,5x/ SDS 0,1x, SSC 0,1x/ SDS 0,1x y dos veces en SSC 0,1x/ SDS 0,1x a 55°C. Las membranas se expusieron a distintos tiempos con películas AGFA Curix RP2.

3.4.4.- RT-PCR.

Se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de RNA total de células MEL y MEL-R utilizando oligo dT₁₅ 2,25 mM, dNTPs 0,5 mM, Rnase Inhibitor o SUPERase IN 0,5 U/µl (AMBION) y 0,5 U de transcriptasa reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*)(Amersham). Las condiciones utilizadas en la reacción enzimática fueron: 10 minutos a 25°C, 30-45 min a 42°C y 15 minutos a 99⁰C. La amplificación del cDNA por PCR se llevó a cabo utilizando cebadores a una concentración de 0,5 µM, Cl₂Mg 2mM, dNTPs 0,2 mM y 5 U de Taq Polimerasa (Perkin Elmer) o 2,5 U de RecombiTaq (LINUS). Los cebadores utilizados se detallan a continuación:

clk/STY

clk1-93R: 5' ATG AGA CAT TCA AAG AGA ACT 3'

clk1-619FCI: 5' TCC ACC ACT TTT CCG AAA GCA C 3'

clk1-404NotI: 5' ATA GTT TAG CGG CCG CAA GTA TCA ACA ATT TCA T 3'

Sty93RBamHI: 5' CGC GGA TCC ATG AGA CAT TCA AAG AGA ACT 3'

Sty1560NotI: 5' ATA GTT TAG CGG CCG CCG TAT GCT TTT TAA GTG G 3'

clk2

clk2-513: 5' CTG CAC AAC TCG GCC CGA ATG 3'

clk2sSmaI: 5' TCC CCC GGG ATG CCC CAT CCC CGA AGG TAC CA 3'

clk2asNotI: 5' TAT AGC GGC CGC TCA CCG ACT GAT ATC CCG ACT GGA GTC 3'

clk3

clk3-ini: 5' ATG CAT CAC TGT AAG CGA TAC CG 3'

clk3-458: 5' AAG CAC TCC ACC ACC TTG CCA AA 3'

clk3sSmaI: 5' TCC CCC GGG GAG ACG ATG CAT CAC TGT AAG 3'

clk3asNotI: 5' TAT AGC GGC CGC GCT GGC CTG CAC CTG TCA TCT GCT GGG 3'

clk4

clk4-181: 5' GAA GCT TCG CAC TCT GTT GAA GAG 3'

clk4-365-Rv: 5' TCC TGC TCC TGA CTG AGG ATT 3'

clk4-480: 5' GCA CTC TAC AAC TTT GCC AAA GGC 3'

clk4sEcoRI: 5' CGG AAT TCA TGC GGC ATT CCA AAC GAA CTC 3'

clk4asNotI: 5' TAT AGC GGC CGC CCT GAC TCC CAC TCA TTT CCT TTT TAA 3'

gapdh

g3pdh5': 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'

g3pdh3': 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'

Tabla I. Descripción de las condiciones de las reacciones de PCR

	<i>cebadores</i>	<i>Desnaturalización</i>	<i>Anillamiento</i>	<i>Síntesis</i>	<i>Ciclos</i>
clk/STY N-terminal	clk1-93R clk1-619FCI	94°C 30''	55°C 1'	72°C 1'	30
clk2 N-terminal	clk2sSmaI clk2-513	94°C 30''	55°C 1'	72°C 1'	30
clk3 N-terminal	clk3-ini clk3-458	94°C 30''	55°C 1'	72°C 1'	30
clk4 N-terminal	clk4sEcoRI clk4-480	94°C 30''	65°C 1'	72°C 1'	30
gapdh	g3pdh5' g3pdh3'	94°C 30''	50°C 30''	72°C 30''	20
clk/STY	clk1-93RBamHI clk1-1560NotI	94°C 1'	50°C 1'	72°C 2'	40
clk/STY^{tr}	clk1-93RBamHI clk1-404NotI	94°C 30''	55°C 1'	72°C 1'	30
clk2	clk2sSmaI clk2asNotI	94°C 30''	55°C 1'	72°C 2'	35
clk3	clk3sSmaI clk3asNotI	94°C 30''	55°C 1'	72°C 2'	35
clk4	clk4s EcoRI clk4asNotI	94°C 30''	55°C 1'	72°C 2'	35

clk4 (+ 2' + 4)	clk4-181 clk4-480	94°C 30''	65°C 1'	72°C 1'	30
clk4 (+ 2' - 4)	clk4-181 clk4-365Rv	94°C 30''	65°C 1'	72°C 1'	30

Los fragmentos de DNA de la zona N-terminal de clk/STY, clk2, clk3 y clk4 así como gapdh se resolvieron en geles de agarosa al 1,8% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se capturaron con un transiluminador Gel Doc 2000 (Bio Rad) y se cuantificaron mediante el programa *Quantity One*.

Los productos de PCR clk4 (+ 2' + 4), clk4 (+2' - 4) se resolvieron en geles de PAGE al 5% teñidos con bromuro de etidio.

3.5. Preparación y análisis de proteínas.

3.5.1.- Purificación de proteínas.

La extracción de proteínas totales de células MEL se llevó a cabo a partir de 5-10x10⁶ células totales. Las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se lisaron en NaCl 150 mM, NP-40 1%, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, DOC 1% y SDS 0,1%. Cada muestra se incubó en un agitador orbital a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente se trataron las muestras durante 10 minutos a 95°C y se sonicaron en frío. Para separar las proteínas de los restos celulares se centrifugaron las muestras a 14500 rpm a 4°C. En algunos casos, el sobrenadante se concentró con columnas Microcon YM-3 (Amicon). Los extractos proteicos se cuantificaron siguiendo las instrucciones del sistema *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) y se almacenaron a -70°C.

3.5.2.- Transferencia e hibridación de proteínas.

La separación electroforética se realizó en una solución Tris 25 mM, Glicina 0,192 mM y SDS 1x, bajo condiciones reductoras, en geles de SDS-poliacrilamida al 10% utilizando el sistema de separación electroforética y electrotransferencia Mini-Protean (Bio-Rad). El gel se electrotransfirió a una membrana de PVDF (Immun-Blot PVDF Membrane Bio-Rad) utilizando una solución Tris 25 mM y Glicina 0,192 mM. La membrana se bloqueó a temperatura ambiente con leche descremada en polvo al 5% en TBST 1x (Tris 20 mM, NaCl 137 mM y Tween-20 0,1 %), se lavó con TBST 0,1% y

se incubó en una bolsa termosellada con el anticuerpo monoclonal de rata anti-HA *High affinity* a una dilución de 1:500 (Roche) en la solución de bloqueo. La membrana se lavó con TBST 0,1% y se incubó en una bolsa termosellada con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (DAKO) diluido a 1:1000 en una solución de bloqueo. Se lavó con TBST 0,1%, se reveló utilizando el *Kit* comercial *SuperSignal^R West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) y se expuso utilizando películas AGFA Curix RP2.

3.6. Inmunohistoquímica.

Las células se lavaron 2 veces con PBS 1x a 4°C y a continuación se fijaron y permeabilizaron en formaldehído 2%, LPC 100 µg/µl (L- α -Lysophosphatidyl choline), PBS 1x. Tras 1 hora de bloqueo en BSA 1% en PBS 1x las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti *splicing factor* SC-35 (SIGMA) o con el anticuerpo monoclonal anti HA High Affinity (Boehringer) en una dilución 1:1000 en PBS/BSA 1%. Las muestras se lavaron 2 veces en PBS 1x y se incubaron con el anticuerpo de cabra anti IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa 488 o Alexa 546 o con el anticuerpo de cabra anti IgG de rata unido al fluoróforo CY2 a una concentración de 10 µg/µl. Nuevamente se lavaron las muestras 2 veces en PBS 1x, se centrifugaron a 700 rpm en un portaobjetos utilizando una citocentrífuga (Cytospin 3 SHANDON) y se montaron con Mowiol 40-88 (Aldrich). Las imágenes se capturaron en un microscopio con cámara CCD o con un microscopio confocal ultraspectral Leica con rango de excitación ultravioleta y visible TC5-SD2-AOBS-UV utilizando el objetivo HCXPLAPO CS100 x/1,4-0,70.

4. Resultados

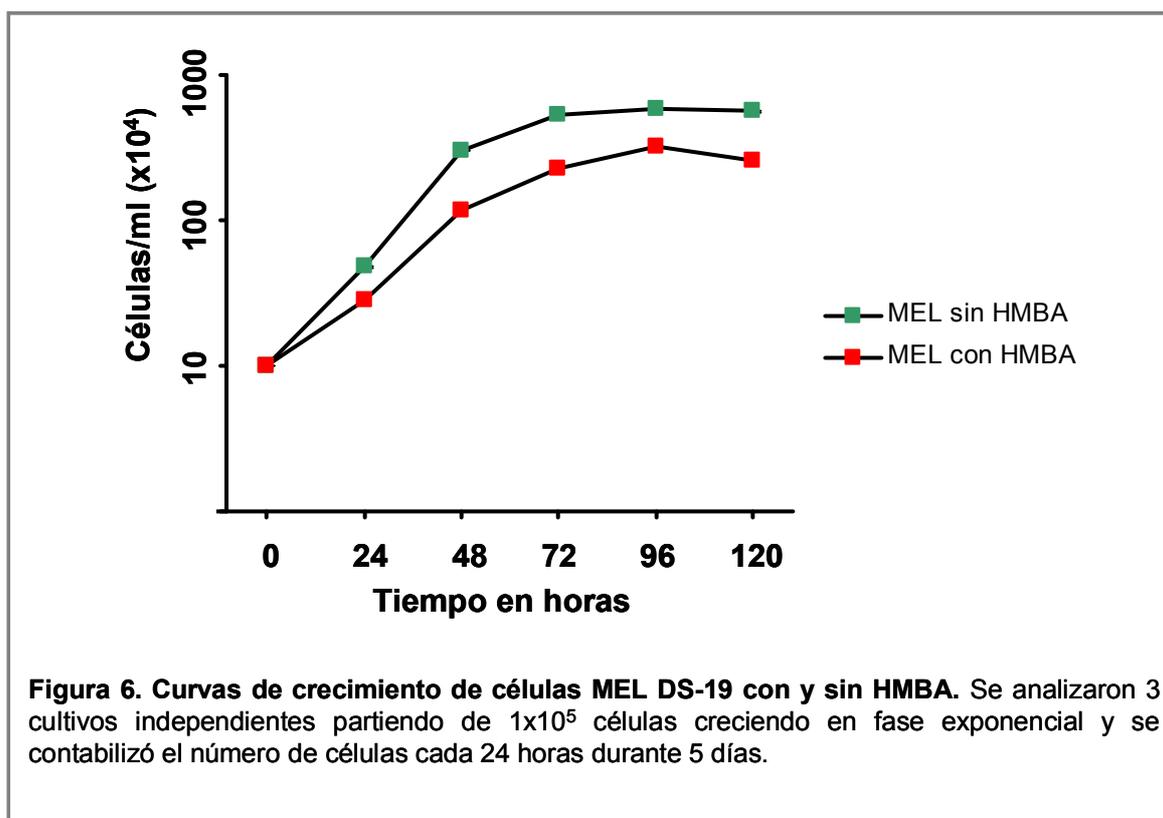
4.1. Características de células MEL DS-19 en cultivo.

La línea celular MEL ("*murine erythroleukemia cell line*") o células Friend son células derivadas de progenitores eritroides cuya diferenciación ha sido interrumpida o bloqueada por la integración del complejo vírico Friend formado por los virus SFFV ("*spleen focus forming virus*") y el F-MuLV ("*Friend murine leukemia virus*") (Friend et al., 1966). Un gran número de compuestos químicos como el HMBA ("N, N'-Hexamethylene-bis-acetamida"), son capaces de hacer que las células superen el bloqueo e inducir las a reiniciar el programa de diferenciación [Marks, 1978 #33]. La posibilidad de inducir la diferenciación unido a una fácil detección de las células hemoglobinizadas convierten a las células MEL en un sistema idóneo para estudiar la reprogramación de células tumorales hacia la diferenciación y división terminal.

En este apartado de resultados describimos los distintos parámetros que caracterizan a las células MEL utilizadas en nuestro laboratorio incluyendo crecimiento celular, capacidad de diferenciación y supervivencia en presencia del agente inductor de diferenciación.

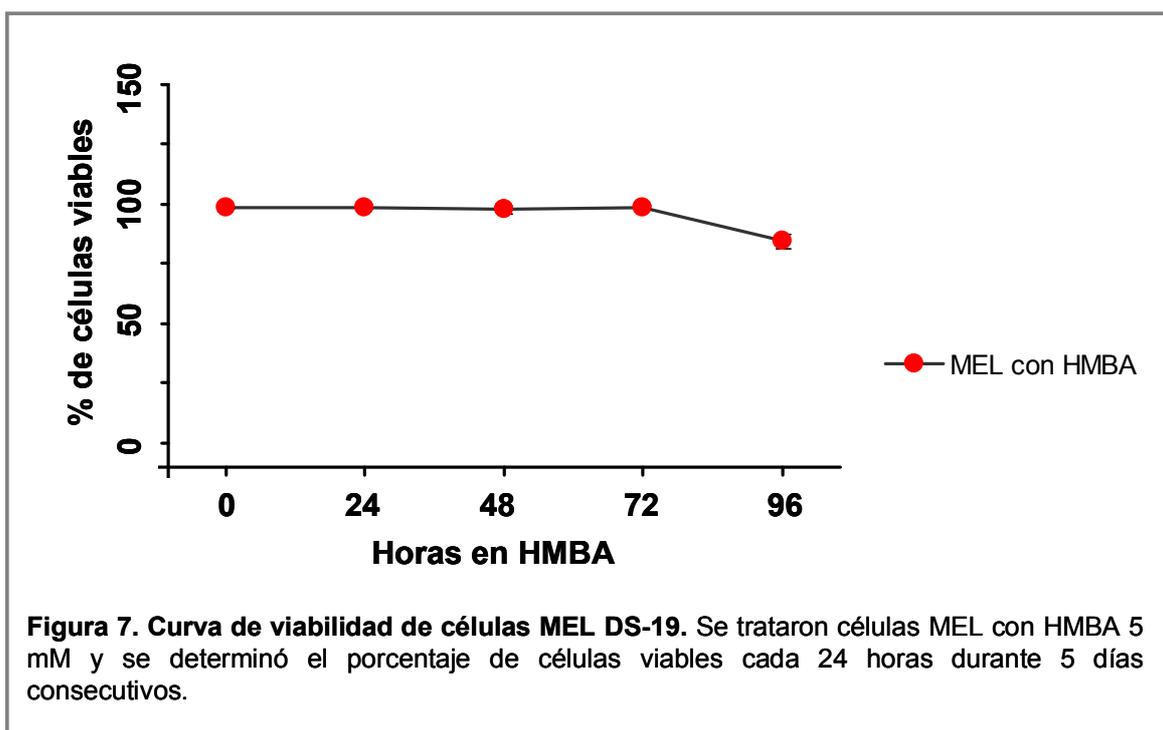
4.1.1. Cinética de crecimiento de MEL DS-19 en cultivos con y sin HMBA.

Para determinar la cinética de crecimiento de las células MEL se partió de 3 cultivos independientes creciendo en fase exponencial a partir de 1×10^5 células /ml. Cada 24 horas se tomaron alícuotas y se calculó el número de células por mililitro de cada cultivo. Con el objeto de determinar si el compuesto químico HMBA afectaba al crecimiento celular se llevaron a cabo experimentos similares en cultivos tratados con 5 mM de HMBA, los resultados de ambos se representan en la Figura 6. Se estableció que el tiempo de duplicación en los cultivos sin HMBA alcanza valores de entre 9 -11 horas. En presencia del agente inductor el tiempo de duplicación aumenta levemente, aunque los valores siguen un patrón similar en ambos casos. Entre las 72 y las 96 horas los valores se estabilizan, probablemente debido a la saturación de los cultivos.



4.1.2. Estudio de la viabilidad celular de MEL DS-19 a lo largo de la diferenciación inducida con HMBA.

Para comprobar que el tratamiento de las células MEL con HMBA no afectaba a la viabilidad celular se llevaron a cabo experimentos utilizando el método de exclusión de azul de tripano. Se trataron tres cultivos independientes creciendo en fase exponencial con HMBA 5mM. Cada 24 horas, durante 5 días consecutivos, se contabilizó el número de células teñidas (muertas) frente al número de células no teñidas (vivas). Durante los 4 primeros días de tratamiento el número de células vivas fue mayor al 97% (Figura 7). A partir del quinto día la viabilidad celular disminuyó levemente obteniéndose un 16% de células muertas. Estos resultados indicaron que el HMBA no afecta significativamente a la viabilidad celular.

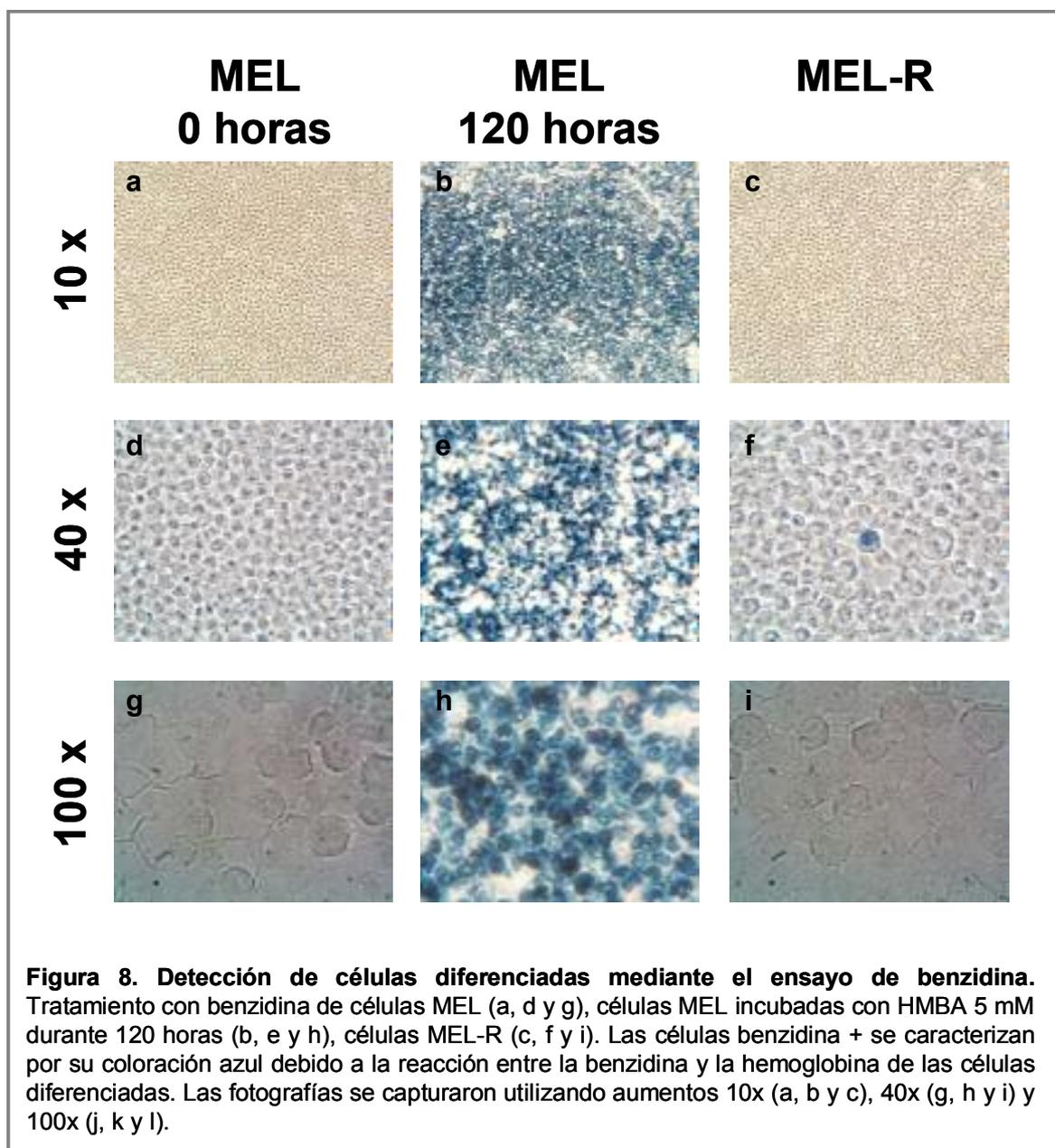


4.1.3. Estudio de la diferenciación celular inducida por HMBA en células MEL DS-19.

4.1.3.1. Determinación de células diferenciadas mediante ensayos con benzidina.

Para determinar el número de células diferenciadas se utilizó el ensayo de benzidina, descrito en materiales y métodos. La benzidina es un compuesto químico que reacciona con los grupos heme de la hemoglobina y produce una coloración azulada en células hemoglobinizadas. En la Figura 8, se muestran ejemplos de ensayos con benzidina de células MEL no tratadas, células tratadas con HMBA durante 120 horas y células MEL-R. La línea celular MEL-R deriva del clon DS-19 que ha perdido la capacidad de diferenciarse en presencia de HMBA. Fue establecida en el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis mediante pases sucesivos de cultivos en presencia de HMBA (Fernández de Nestosa, M.J., Tesis doctoral en curso). En células MEL diferenciadas con HMBA se observaron cambios morfológicos característicos de las últimas etapas de la diferenciación de las líneas eritroides como son una disminución en el tamaño celular, la presencia de núcleos más densos y una menor

relación núcleo/citoplasma. En la línea celular MEL-R se observó un aumento del tamaño celular con respecto al de las células MEL parentales.

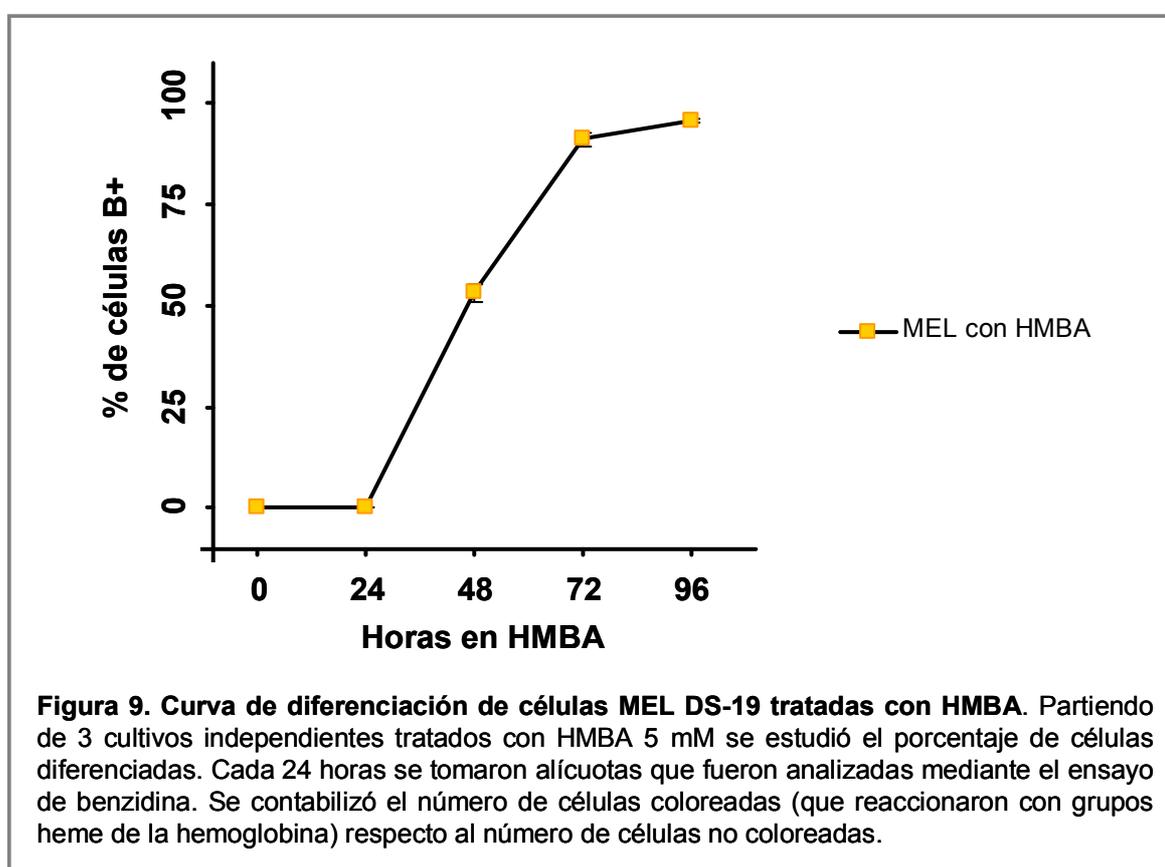


Con el objeto de determinar el porcentaje de diferenciación celular inducido por el agente inductor se partió de 3 cultivos independientes creciendo en fase exponencial (2×10^5) en presencia de HMBA 5 mM. Cada 24 horas se contabilizó el número de células diferenciadas (benzidina +) frente al número de células no diferenciadas (benzidina -) (Tabla II y Figura 9).

Tabla II. Porcentaje de células MEL DS-19 diferenciadas a lo largo del tratamiento con HMBA

	% células B+				
	Horas en HMBA				
	0	24	48	72	96
MEL 1	0,02	0,02	54,83	88,93	95,65
MEL 2	0,04	0,05	53,91	92,57	96,15
MEL 3	0,07	0,09	50,75	91,68	95,48

Se mantuvieron 3 cultivos independientes con HMBA 5 mM a lo largo de 96 horas. Cada 24 horas se contabilizó el número de células diferenciadas B+ utilizando el ensayo de benzidina.



El porcentaje de diferenciación espontánea fue menor del 1%. No se observó un incremento significativo de células benzidina + durante las primeras 24 horas de tratamiento, etapas que coinciden con las fases de pre-determinación y determinación en los cuales no se observan todavía características del fenotipo eritroide. Después de 48 horas de tratamiento el porcentaje de células diferenciadas constituye más de la mitad de la población aumentando drásticamente hasta llegar a más de un 95% a las

96 horas. Estos resultados coinciden mayoritariamente con los datos obtenidos en nuestro y en otros laboratorios en donde se han utilizado diferentes clones derivados de células MEL (Rekhtman et al., 1999; Vanegas et al., 1997; Vanegas et al., 2003).

4.1.3.2. Modulación de la expresión de β -globina a lo largo de la diferenciación.

El fenotipo eritroide de las células MEL en las últimas etapas de diferenciación se manifiesta con la expresión de genes marcadores característicos del linaje eritropoyético. Los genes que codifican para la α y β globinas constituyen un ejemplo inequívoco de diferenciación de este linaje celular. Con el objeto de comprobar el grado de diferenciación de las células MEL DS-19 a lo largo del tratamiento con HMBA se llevó a cabo un análisis en *Northern blot* utilizando como sonda el cDNA completo correspondiente al gen de la β -globina de ratón (Figura 10).

Se observó que las células MEL indiferenciadas así como las células tratadas durante la pre-determinación (0-24 horas) no expresaban cantidades significativas de β globina. A partir de las 24 horas se detectó la presencia de niveles bajos de β globina que aumentaron gradualmente hasta alcanzar valores máximos a las 96 horas, momento que coincide con la presencia en los cultivos de más de un 90% de células MEL benzidina positivo.

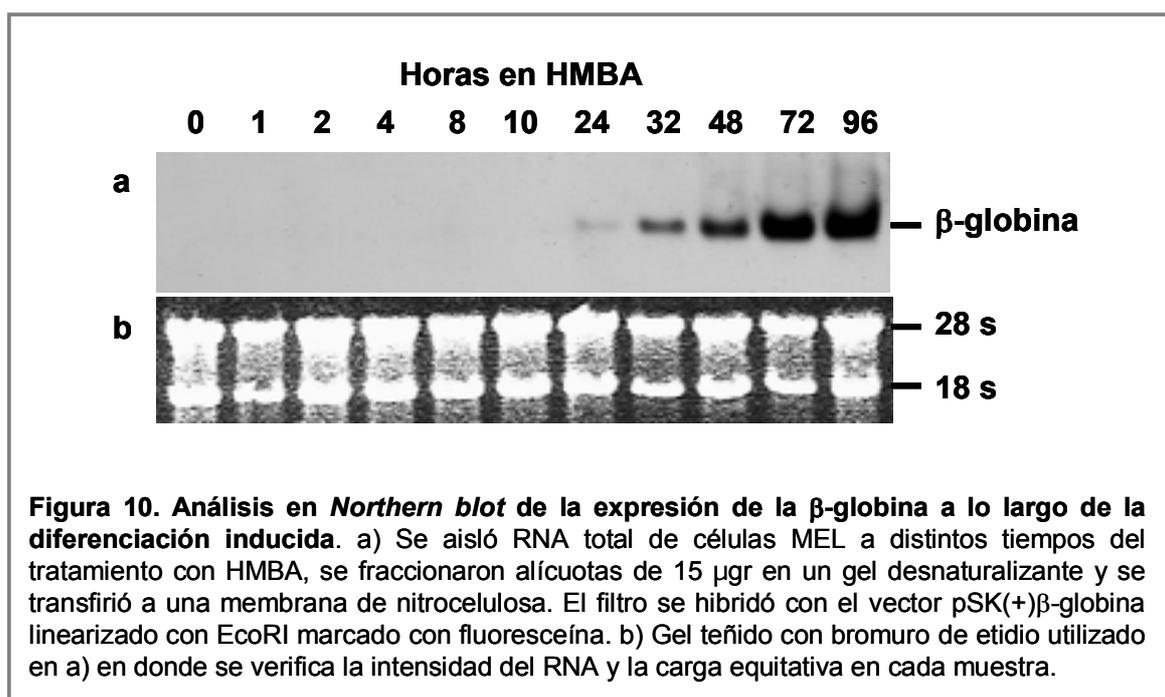


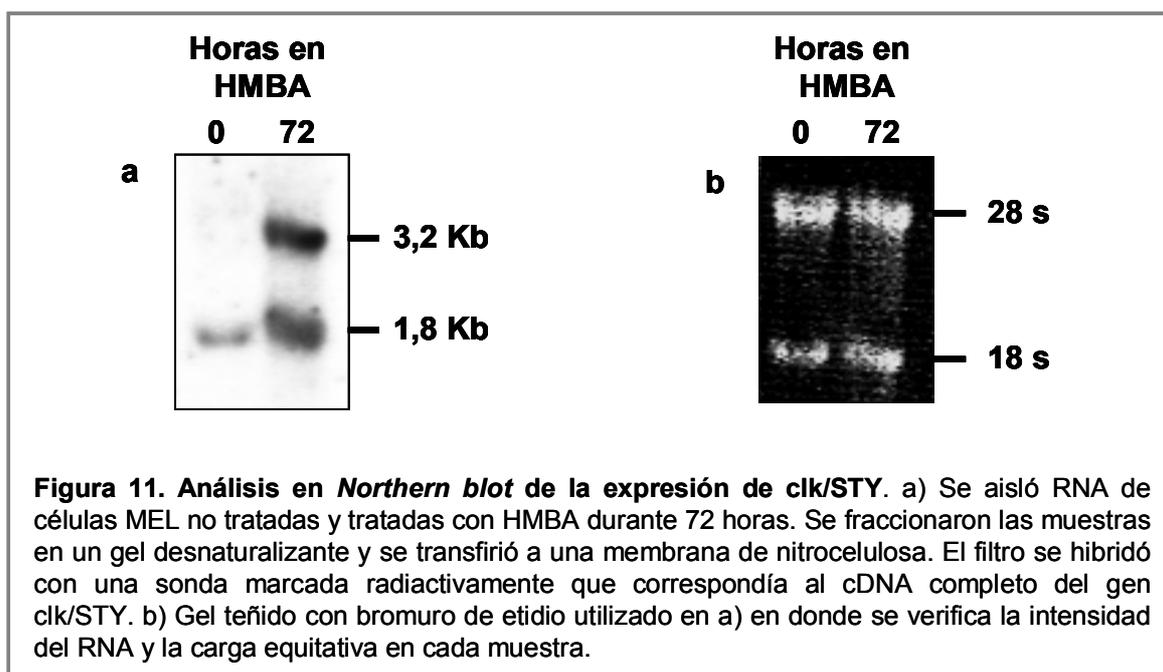
Figura 10. Análisis en *Northern blot* de la expresión de la β -globina a lo largo de la diferenciación inducida. a) Se aisló RNA total de células MEL a distintos tiempos del tratamiento con HMBA, se fraccionaron alícuotas de 15 μ gr en un gel desnaturante y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. El filtro se hibridó con el vector pSK(+) β -globina linearizado con EcoRI marcado con fluoresceína. b) Gel teñido con bromuro de etidio utilizado en a) en donde se verifica la intensidad del RNA y la carga equitativa en cada muestra.

4.2. Clk/STY.

4.2.1. Aislamiento e identificación.

Entre los clones obtenidos mediante 2 rondas de hibridación diferencial de una librería de cDNA de células MEL DS-19, tal como se describe en el apartado 1.4. de introducción, se aisló el clon denominado MEL Dt5 catalogado entre los genes “activados” (Figura 2). La secuencia del inserto de 900 pb, correspondiente al cDNA clonado, fue comparada con la base de datos del EMBL/GenBank y reveló una homología del 95% con el mRNA que codifica para la proteína clk/STY de ratón. El clon MEL Dt5 contenía parte del cDNA de clk/STY correspondiente a la región 3’ no codificante junto con 300 pb de la zona codificante. En los experimentos que se describen a continuación se utilizó el cDNA completo de clk/STY de ratón cedido por el Dr. J. C. Bell del Ottawa Regional Cancer Center, Canada y el Dr. T. Pawson del Mount Sinai Hospital de Toronto, Canada.

Con el objeto de analizar la expresión del gen clk/STY en células MEL no diferenciadas y diferenciadas se realizó un análisis en *Northern blot*. Se fraccionaron alícuotas de RNA aislado de células MEL no tratadas y tratadas durante 72 horas con HMBA 5 mM y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El filtro se hibridó con el cDNA completo de clk/STY marcado radiactivamente (Figura 11).



Los resultados indicaron que clk/STY se expresa a través de dos transcritos de 3,2 Kb y 1,8 Kb. En células MEL con HMBA se observó un incremento de la expresión de ambos transcritos. Esto nos permitió corroborar que clk/STY correspondía a un gen activado durante la diferenciación.

4.2.2. Expresión a nivel de mRNA del gen clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida con HMBA.

Con el objeto de analizar la modulación de la expresión de clk/STY a lo largo de la diferenciación se llevó a cabo un análisis en *Northern blot* de una serie consecutiva de muestras de RNA aislado de células indiferenciadas (0 horas) y células tratadas con HMBA entre 1 y 120 horas (Figura 12).

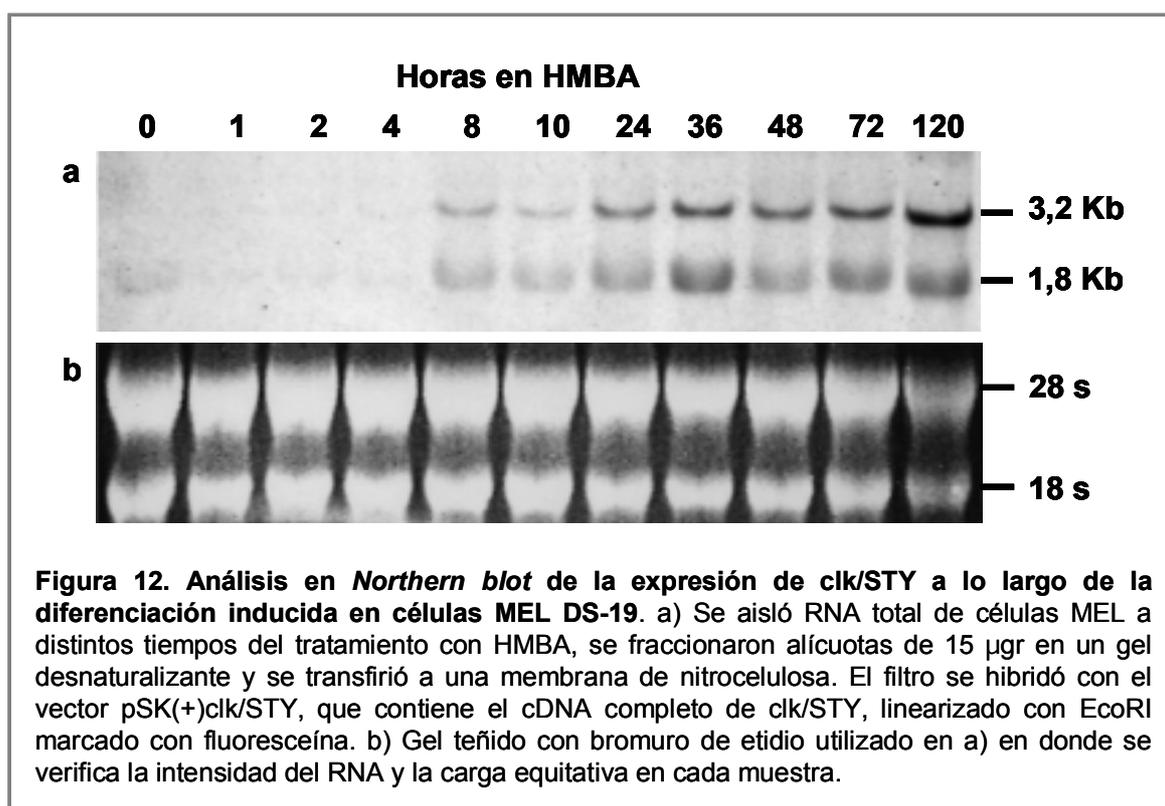


Figura 12. Análisis en *Northern blot* de la expresión de clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida en células MEL DS-19. a) Se aisló RNA total de células MEL a distintos tiempos del tratamiento con HMBA, se fraccionaron alícuotas de 15 µgr en un gel desnaturante y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. El filtro se hibridó con el vector pSK(+)clk/STY, que contiene el cDNA completo de clk/STY, linearizado con EcoRI marcado con fluoresceína. b) Gel teñido con bromuro de etidio utilizado en a) en donde se verifica la intensidad del RNA y la carga equitativa en cada muestra.

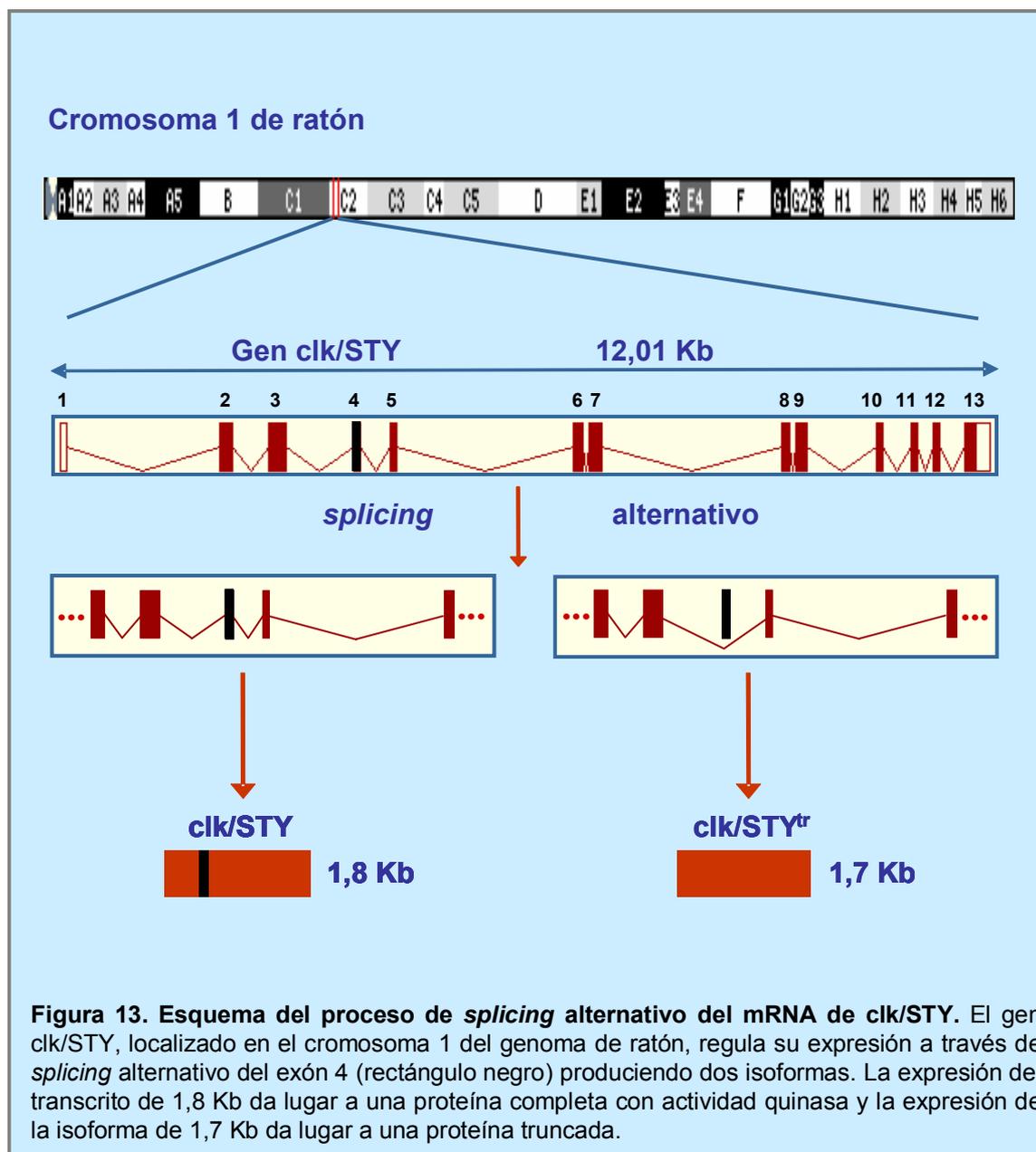
Previamente se comprobó que el porcentaje de células diferenciadas (B+) del cultivo que dio origen a las distintas muestras de RNA superaba el 90% a las 120 horas de tratamiento. La hibridación de la serie se llevó a cabo con el plásmido pSK(+)clk/STY que contiene el cDNA completo de clk/STY linearizado con EcoRI y marcado, en este caso, con fluoresceína. La autorradiografía reveló la presencia de los

dos transcritos de 3,2 y 1,8 Kb descritos en el apartado anterior. Sin embargo, en células indiferenciadas (0 horas) y hasta las 8 horas de tratamiento con HMBA, los niveles de expresión se mostraron muy bajos, y fue necesario una sobreexposición de la membrana para poder visualizarlos. A partir de las 8 horas los niveles de expresión de *clk/STY* se incrementaron gradualmente, hasta llegar a valores máximos en las muestras expuestas 5 días con HMBA. Estos resultados nos permitieron concluir que la expresión a nivel de mRNA de *clk/STY* se activa durante el periodo de predeterminación, aumentando progresivamente a lo largo de la diferenciación eritropoyética.

Por otra parte, gracias a la hibridación no radiactiva se pudo observar que la banda de 1,8 Kb presentaba un patrón difuso, a diferencia de la nitidez que se observa normalmente empleando esta metodología y que se observó por ejemplo en la banda de 3,2 Kb (Figura 12). Esto podría deberse a la presencia de más de una banda perteneciente a transcritos de tamaños similares. Duncan y colaboradores (Duncan et al., 1995) demostraron que *clk/STY* lleva a cabo el *splicing* alternativo de un exón cuyo tamaño es de aproximadamente 91 pb, dando lugar a dos transcritos de 1,7 y 1,8 Kb, respectivamente. La banda difusa de 1,8 Kb que se observa en la Figura 12 podría englobar estas dos isoformas. La banda de 3,2 Kb, por otra parte, correspondería a un transcrito inmaduro de *clk/STY*, previamente descrito (Duncan et al., 1995). De hecho, en los numerosos intentos llevados a cabo para aislar otras posibles isoformas de *clk/STY* no se obtuvo en ningún caso clones de tamaño mayor a 1,8 Kb .

4.2.3. Estudio de la expresión de los transcritos, productos del *splicing* alternativo, de *clk/STY* en MEL DS-19 indiferenciadas y diferenciadas.

Los resultados anteriores junto a los descritos por otros autores (Duncan et al., 1995) permitieron determinar que *clk/STY* se expresa a través de dos transcritos de 1,7 y 1,8 Kb, respectivamente. Ambos transcritos se diferencian por la exclusión o inclusión de un exón originalmente denominado exón B (Duncan et al., 1995). Un estudio de la secuencia completa de *clk/STY* en la base de datos del genoma de ratón (*Mouse Genome Sequencing Consortium*, <http://www.ensembl.org>) nos permitió establecer que dicho exón corresponde al exón 4 de un total de 13 exones que conforman la secuencia completa del gen (Figura 13).



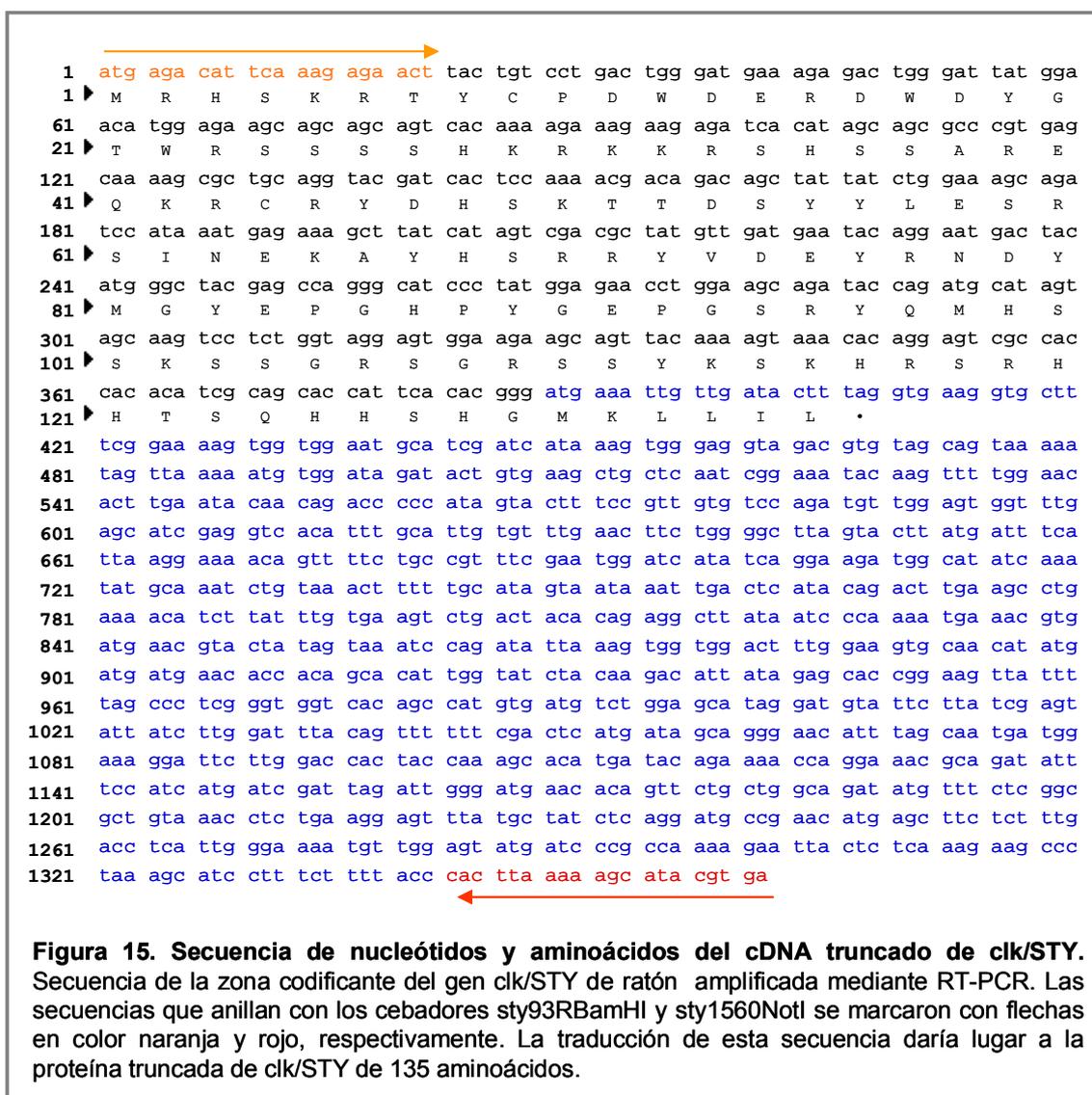
El transcrito de 1,8 Kb incluye el exón 4 dando lugar a la proteína quinasa *clk/STY* completa (Figura 13 y 14). Por el contrario, el transcrito de 1,7 Kb excluye el exón 4 provocando un cambio en el marco de lectura y, en consecuencia, la aparición de un codón de parada prematuro, produciendo una proteína truncada carente del dominio quinasa (Figura 13 y 15).

```

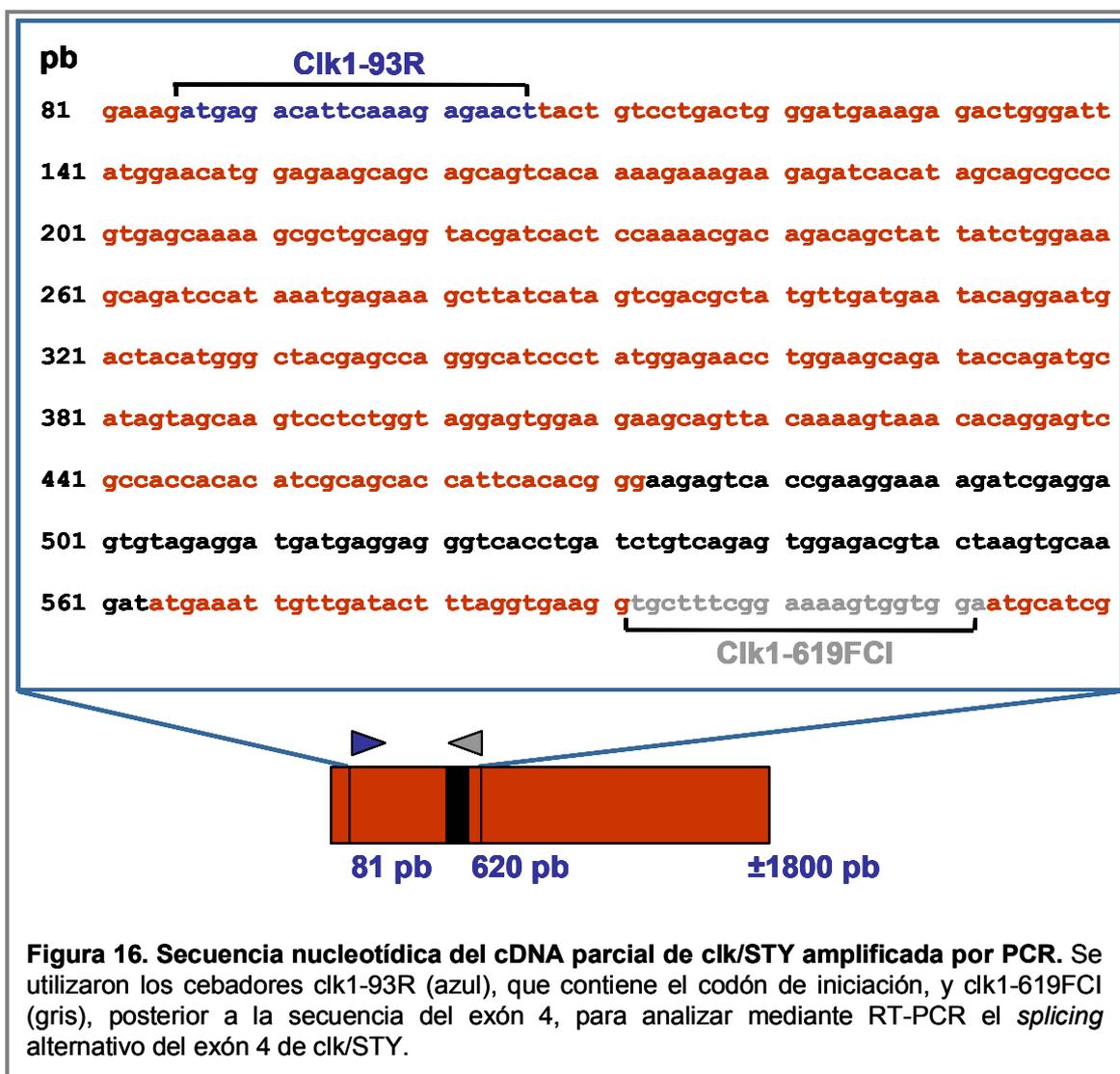
1  atg aga cat tca aag aga act tac tgt cct gac tgg gat gaa aga gac tgg gat tat gga
1  ▶ M R H S K R T Y C P D W D E R D W D Y G
61  aca tgg aga agc agc agt cac aaa aga aag aag aga tca cat agc agc gcc cgt gag
21  ▶ T W R S S S S H K R K K R S H S S A R E
121  caa aag cgc tgc agg tac gat cac tcc aaa acg aca gac agc tat tat ctg gaa agc aga
41  ▶ Q K R C R Y D H S K T T D S Y Y L E S R
181  tcc ata aat gag aaa gct tat cat agt cga cgc tat gtt gat gaa tac agg aat gac tac
61  ▶ S I N E K A Y H S R R Y V D E Y R N D Y
241  atg ggc tac gag cca ggg cat ccc tat gga gaa cct gga agc aga tac cag atg cat agt
81  ▶ M G Y E P G H P Y G E P G S R Y Q M H S
301  agc aag tcc tct ggt agg agt gga aga agc agt tac aaa agt aaa cac agg agt cgc cac
101 ▶ S K S S G R S G R S S Y K S K H R S R H
361  cac aca tcg cag cac cat tca cac ggg aag agt cac cga agg aaa aga tcg agg agt gta
121 ▶ H T S Q H H S H G K S H R R K R S R S V
421  gag gat gat gag gag ggt cac ctg atc tgt cag agt gga gac gta cta agt gca aga tat
141 ▶ E D D E E G H L I C Q S G D V L S A R Y
481  gaa att gtt gat act tta ggt gaa ggt gct ttc gga aaa gtg gtg gaa tgc atc gat cat
161 ▶ E I V D T L G E G A A F G K V V E C I D H
541  aaa gtg gga ggt aga cgt gta gca gta aaa ata gtt aaa aat gtg gat aga tac tgt gaa
181 ▶ K V G G R R V A V K I V K N V D R Y C E
601  gct gct caa tcg gaa ata caa gtt ttg gaa cac ttg aat aca aca gac ccc cat agt act
201 ▶ A A Q S E I Q V L E H L N T T D P H S T
661  ttc cgt tgt gtc cag atg ttg gag tgg ttt gag cat cga ggt cac att tgc att gtg ttt
221 ▶ F R C V Q M L E W F E H R G H I C I V F
721  gaa ctt ctg ggg ctt agt act tat gat ttc att aag gaa aac agt ttt ctg ccg ttt cga
241 ▶ E L L G L S T Y D F I K E N S F F L P F R
781  atg gat cat atc agg aag atg gca tat caa ata tgc aaa tct gta aac ttt ttg cat agt
261 ▶ M D H I R K M A Y Q I C K S V N F L H S
841  aat aaa ttg act cat aca gac ttg aag cct gaa aac atc tta ttt gtg aag tct gac tac
281 ▶ N K L T H T D L K P E N I L F V K S D Y
901  aca gag gct tat aat ccc aaa atg aaa cgt gat gaa cgt act ata gta aat cca gat att
301 ▶ T E A Y N P K M K R D E R T I V N P D I
961  aaa gtg gtg gat ttt gga agt gca aca tat gat gat gaa cac agc aca ttg gta tct
321 ▶ K V V D F G S A T Y D D E H H S T L V S
1021  aca aga cat tat aga gca ccg gaa gtt att tta gcc ctc ggg tgg tca cag cca tgt gat
341 ▶ T R H Y R A P E V I L A L G W S Q P C D
1081  gtc tgg agc ata gga tgt att ctt atc gag tat tat ctt gga ttt aca gtt ttt tcg act
361 ▶ V W S I G C I L I E Y Y L G F T V F S T
1141  cat gat agc agg gaa cat tta gca atg atg gaa agg att ctt gga cca cta cca aag cac
381 ▶ H D S R E H L A M M E R I L G P L P K H
1201  atg ata cag aaa acc agg aaa cgc aga tat ttc cat cat gat cga tta gat tgg gat gaa
401 ▶ M I Q K T R K R R Y F H H D R L D W D E
1261  cac agt tct gct ggc aga tat gtt tct cgg cgc tgt aaa cct ctg aag gag ttt atg cta
421 ▶ H S S A G R Y V S R R C K P L K E F M L
1321  tct cag gat gcc gaa cat gag ctt ctc ttt gac ctc att ggg aaa atg ttg gag tat gat
441 ▶ S Q D A E H E L L F D L I G K M L E Y D
1381  ccc gcc aaa aga att act ctc aaa gaa gcc cta aag cat cct ttc ttt tac cca ctt aaa
461 ▶ P A K R I T L K E A L K H P F F Y P L K
1441  aag cat acg tga
481 ▶ K H T .

```

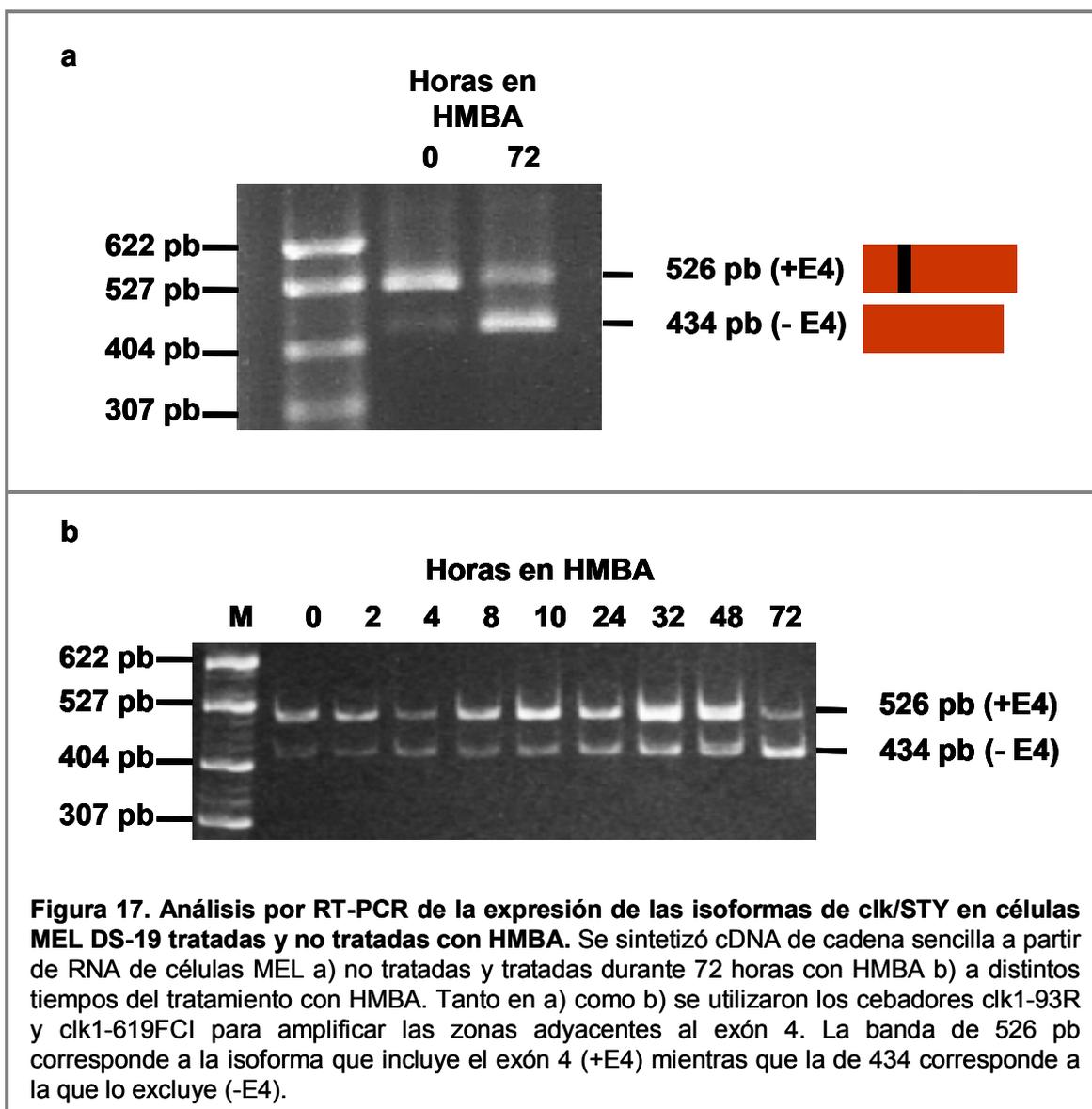
Figura 14. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del cDNA completo del gen *clk*/STY de ratón. Secuencia de la zona codificante del gen *clk*/STY de ratón amplificada mediante PCR del plásmido pSK*clk*/STY. Las secuencias que anillan con los cebadores *sty*93RBamHI y *sty*1560NotI se marcaron con flechas en color naranja y rojo, respectivamente. La traducción de esta secuencia da lugar a la proteína completa de *clk*/STY de 483 aminoácidos. La secuencia del exón 4 se resalta en fondo gris. En color azul se destaca el dominio quinasa de *clk*/STY. Los aminoácidos subrayados destacan el dominio LAMMER.



En los ensayos de *Northern blot* descritos en el apartado anterior se observó un aumento de la expresión de clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida. No se pudo determinar, sin embargo, si los cambios eran debidos en igual medida a los transcritos de las 2 isoformas de clk/STY. Para estudiar la modulación de la expresión de ambos transcritos en células MEL prediferenciadas y diferenciadas se realizaron ensayos de RT-PCR. Como molde de la reacción de PCR se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de RNA de células MEL no tratadas y tratadas durante 72 horas con HMBA. Para la reacción de amplificación del cDNA se utilizó en el extremo 5' el cebador clk1-93R que anilla con el codón de iniciación ATG y en el extremo 3' el cebador clk1-619FCI que anilla con una secuencia del mRNA de clk/STY posterior al exón 4 (Figura 16).



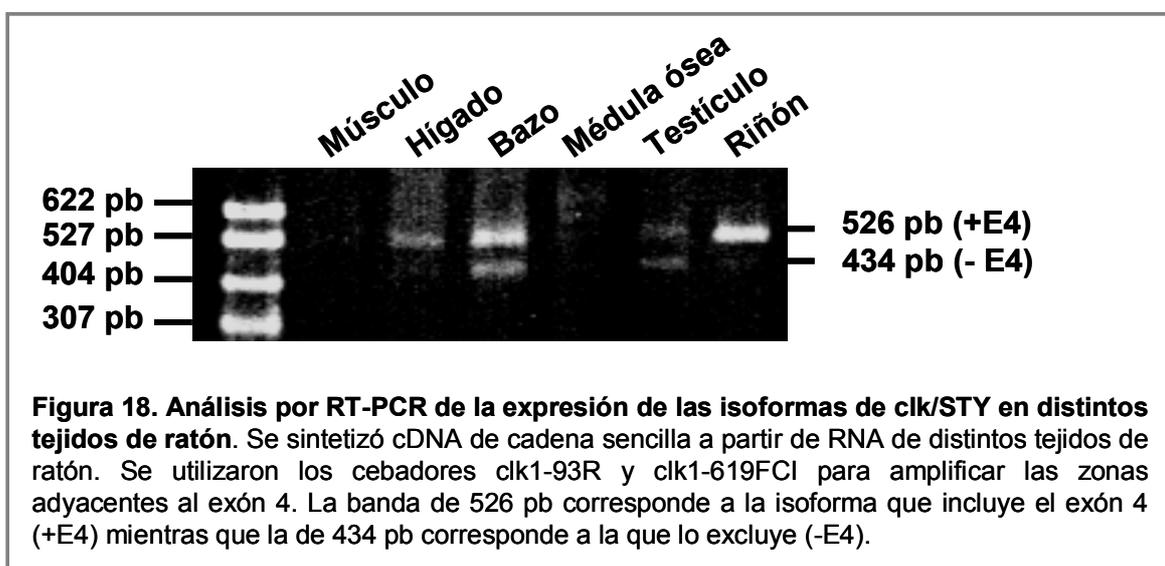
Las 2 bandas esperadas tendrían un tamaño de 526 y 434 pb según incluyeran o no el exón 4, respectivamente. Tanto a 0 como a 72 horas se observaron las dos bandas producto del *splicing* alternativo (Figura 17a). Sin embargo, la relación de concentraciones entre ambas isoformas cambiaba según la muestra. En células MEL no diferenciadas (0 horas) la banda de 526 pb era más intensa que la de 434 pb. La situación revertía en células MEL inducidas (72 horas), cuando la banda más intensa correspondía a la de 434 pb. Estos resultados indicaron que la expresión del mRNA de clk/STY en células MEL diferenciadas era debido mayoritariamente al transcrito que excluye el exón 4. Por el contrario, en células MEL no diferenciadas la isoforma más abundante es la derivada del transcrito que incluye el exón 4.



Con el objeto de analizar la modulación de la expresión de las dos isoformas de clk/STY a lo largo de la diferenciación, se llevó a cabo un análisis por RT-PCR similar al anterior, pero utilizando en este caso, células MEL tratadas a distintos tiempos con el agente inductor (Figura 17b). Durante la determinación y en las etapas tempranas de la diferenciación la relación entre ambas isoformas fue similar al de las células indiferenciadas. Sin embargo, se observó una dramática transición a favor de la banda de 434 pb a las 72 horas, cuando más del 80% de las células están diferenciadas. Estos resultados nos permitieron determinar que la exclusión del exón 4 está fuertemente potenciada en las últimas etapas de la diferenciación.

4.2.4. Estudio de la expresión de los transcritos de 1,7 y 1,8 Kb de *clk/STY* en distintos tejidos de ratón.

Se ha descrito que la expresión de *clk/STY* a nivel de RNA en tejidos de ratón adulto es ubicua aunque los niveles de expresión varían según el tejido (Ben-David et al., 1991; Duncan et al., 1995; Howell et al., 1991; Nayler et al., 1997). Para analizar la expresión de los transcritos 1,7 y 1,8 Kb, producto del *splicing* alternativo, en distintos tejidos de ratón se llevó a cabo una reacción de RT-PCR (Figura 18). Se sintetizó cDNA de cadena sencilla de RNA aislado de músculo, hígado, bazo, médula ósea, testículo y riñón de ratón adulto. Para la reacción de amplificación por PCR se utilizaron en el extremo 5' el cebador *clk1-93R* que anilla con una secuencia que incluye el codón de iniciación ATG y en el extremo 3' el cebador *clk1-619FCI* que anilla con una secuencia posterior al exón 4. Se comprobó que *clk/STY* se expresa en todos los tejidos, aunque los niveles de expresión son distintos. Los niveles más bajos corresponden a músculo y médula ósea, que contrastan con los obtenidos en bazo y riñón. Por otra parte, se observó que la relación entre los transcritos que incluyen o no el exón 4 varía entre los distintos tejidos. Así, por ejemplo, en testículo las dos bandas presentan valores similares; sin embargo en bazo se observa una diferencia a favor de la banda de 526 pb. En riñón y en hígado predominó mayoritariamente el transcrito que incluye el exón 4. Estos resultados permitieron concluir que los niveles de expresión de *clk/STY*, así como la relación entre los dos transcritos producto de *splicing* alternativo, varían en los distintos tejidos.



4.3. Caracterización y análisis de *clk2*, *clk3* y *clk4*.

Clk/STY fue inicialmente descrito como una proteína quinasa de doble especificidad, capaz de fosforilar residuos de serina/treonina así como de tirosina (Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991; Johnson and Smith, 1991). Posteriormente, fue incluida en la subfamilia LAMMER junto con otros miembros que poseen una estructura altamente conservada, localizada en el subdominio X de la zona catalítica de las quinasas (Hanes et al., 1994; Yun et al., 1994). Además de *clk/STY*, se han descrito en vertebrados hasta el momento otros 3 miembros de la familia, *clk2*, *clk3* y *clk4*. Por sus características estructurales y funcionales estas proteínas, incluyendo a *clk/STY*, podrían considerarse un subgrupo aparte dentro de las proteínas LAMMER. Con el objeto de determinar si la expresión de *clk2*, *clk3* y *clk4* seguía el mismo patrón de expresión que *clk/STY*, clonamos y caracterizamos cada uno de los cDNAs correspondientes. Posteriormente, llevamos a cabo en cada caso, un estudio de la expresión en células MEL diferenciadas.

4.3.1. Clonaje y caracterización de *clk2*, *clk3* y *clk4*.

El clonaje de los cDNAs completos de *clk2*, *clk3* y *clk4* se llevó a cabo mediante protocolos de RT-PCRs. Se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de RNA aislado de células MEL, mediante una transcripción reversa seguida por una reacción de PCR. Se utilizó la información de las secuencias correspondientes de la base de datos del EMBL/*Genbank* para diseñar cebadores específicos capaces de anillar en ambos extremos de cada secuencia. En el caso de *clk2* se utilizó en el extremo 5' el cebador *clk2sSmaI* que contiene el codón ATG de iniciación y en el extremo 3' el cebador *clk2asNotI* que contiene el codón TGA de terminación. El producto amplificado se clonó en el vector pSTBlue-1 y se secuenció íntegramente. La secuencia del cDNA obtenido se representa en la Figura 19. El análisis de la misma reveló que el cDNA obtenido correspondía al mRNA que codifica para la forma completa de la proteína *clk2*.

La reacción de PCR para *clk3* se llevó a cabo utilizando en el extremo 5' el cebador *clk3sSmaI* que contiene el codón ATG de iniciación y en el extremo 3' el cebador *clk3asNotI* que contiene el codón TGA de terminación. Se clonó y secuenció, como en el caso de *clk2*, y analizada la secuencia se comprobó que el cDNA clonado

1	atg ccc cat ccc cga agg tac cat	tcc tca gag cga ggt agc cgg ggg agt tac cac gaa
1	M P H P R R Y H S S E R G S R G S Y H E	
61	cac tat cag agc cga aag cat aag cga aga aga agt cgc tcc tgg tca agt agc agt gac	
21	H Y Q S R K H K R R R S R S W S S S S D	
121	cgg aca agg cgg cgg cgg agg gag gac agc tac cac gtt cgg tcc cga agc agc tat gat	
41	R T R R R R R E D S Y H V R S R S S Y D	
181	gac cat tcg tcc gat cgg cgg ctg tac gat cgg cgg tac tgt ggc agc tac agg cgc aat	
61	D H S S D R R L Y D R R Y C G S Y R R R N	
241	gac tac agc cgg gac aga ggg gag gct tac tac gac aca gac ttt cgg cag tcc tat gaa	
81	D Y S R D R G E A Y Y D T D F R Q S Y E	
301	tac cat cga gag aac agc agt tac cga agc cag cgc agc agc cga agg aaa cac aga agg	
101	Y H R E N S S Y R S Q R S S R R K H R R	
361	cgg agg aga cgg agc cgg aca ttc agc cgc tca tct tca cag	cac agc agc cgg aga gcc
121	R R R R S R T F S R S S S Q	H S S R R A
421	aag agt gta gag gac gac gct gag ggc cac ctc atc tac cac gtc ggg gac tgg cta caa	
141	K S V E D D A E G H L I Y H V G D W L Q	
481	gag cga tat gaa att gta agc acc tta gga gaa ggg acc ttc ggc cga gtt gtg cag tgt	
161	E R Y E I V S T L G E G T F G R V V Q C	
541	gtg gac cat cgc agg ggc gga aca cga gtt gcc ctg aag atc att aag aat gtg gag aag	
181	V D H R R G G T R V A L K I I K N V E K	
601	tac aag gaa gca gcc cga cta gaa atc aac gtg ctg gag aaa atc aat gag aaa gat cct	
201	Y K E A A R L E I N V L E K I N E K D P	
661	gac aac aag aac cta tgt gtc cag atg ttt gac tgg ttt gac tac cat ggc cac atg tgt	
221	D N K N L C V Q M F D W F D Y H G H M C	
721	atc tcc ttt gag ctt ctg ggc ctt agc acc ttc gat ttc ctc aaa gac aac aac tac ctg	
241	I S F E L L G L S T F D F L K D N N Y L	
781	ccc tac ccc atc cac caa gtg cgc cac atg gcc ttc cag ctc tgc cag gcc gtc aag ttc	
261	P Y P I H Q V R H M A F Q L C Q A V K F	
841	ctc cat gat aac aag ttg aca cat acg gac ctc aaa cct gaa aat att ctg ttt gtg aat	
281	L H D N K L T H T D L K P E N I L F V N	
901	tca gac tac gaa ctc acc tac aac cta gag aag aag cga gat gag cgc agt gta aag agc	
301	S D Y E L T Y N L E K K R D E R S V K S	
961	aca gcc gtg cgg gtg gtg gac ttc ggc agt gcc acc ttt gac cac gaa cac cat agc acc	
321	T A V R V V D F G S A T F D H E H H S T	
1021	att gtc tcc act cgc cat tac cga gcc ccc gag gtc atc ctg gag ttg ggc ttg tca cag	
341	I V S T R H Y R A P E V I L E L G W S Q	
1081	cca tgc gat gta tgg agc ata ggc tgc atc atc ctt gag tac tac gtt ggc ttc acc ctc	
361	P C D V W S I G C I I L E Y Y V G F T L	
1141	ttc cag acc cat gac aac aga gag cat cta gcc atg atg gaa agg atc ctg ggt cct gtc	
381	F Q T H D N R E H L A M M E R I L G P V	
1201	cct tct cgg atg atc aga aag aca aga aaa cag aaa tgt ttt tat cgg ggt cgc ctg gat	
401	P S R M I R K T R K Q K C F Y R G R L D	
1261	tgg gat gag aac acc tca gcc ggg cgc tac gtt cgt gag aac tgc aaa cct ctg cgg cgg	
421	W D E N T S A G R Y V R E N C K P L R R	
1321	tat ctg acc tca gag gca gag gac cac cac cag ctc ttc gat ctg att gaa aat atg cta	
441	Y L T S E A E D H H Q L F D L I E N M L	
1381	gag tat gag cct gct aag cgg ctg acc tta ggt gaa gcc ctt cag cat cct ttc ttc gcc	
461	E Y E P A K R L T L G E A L Q H P F F A	
1441	tgc ctt cgg act gag cca ccc aac acc aag ttg tgg gac tcc agt cgg gat atc agt cgg	
481	C L R T E P P N T K L W D S S R D I S R	
1551	tga	
501	.	

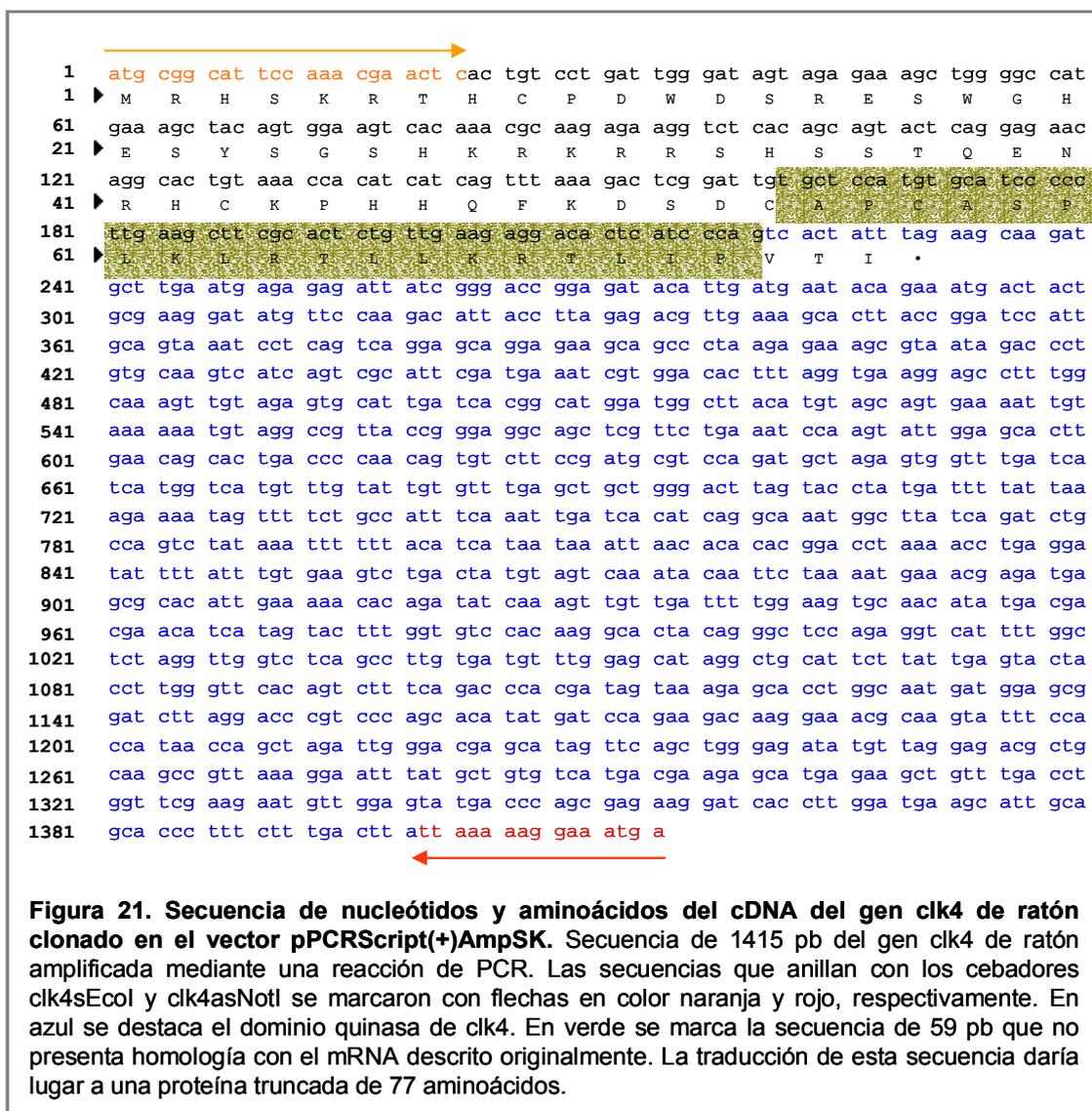
Figura 19. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del cDNA completo del gen *clk2* de ratón clonado en el vector pSTBlue-1. Secuencia de 1554 pb del gen *clk2* de ratón amplificada mediante una reacción de PCR. Las secuencias que anillan con los cebadores *clk2sSmaI* y *clk2asNotI* se marcaron con flechas en color naranja y rojo, respectivamente. La traducción de esta secuencia da lugar a la proteína completa de *clk2* de 499 aminoácidos. En gris se destaca la secuencia del exón 4. En azul se destaca el dominio quinasa de *clk*/STY. Los aminoácidos subrayados destacan el dominio LAMMER.

1	atg cat cac tgt aag cga tac cgt	tcc cca gag cca gac cca tac ctg agc tac cgc tgg
1	▶ M H H C K R Y R S P E P D P Y L S Y R W	
61	aag agg agg cgg tct tac agt cgg gag cat gaa ggt cga cta cga tac cca tcc cga agg	
21	▶ K R R R S Y S R E H E G R L R Y P S R R	
121	gag cct ccc cca cgg aga tca cgg ccc aga agc cat gat cgt ata ccc tac cag cgg agg	
41	▶ E P P P R R S R P R S H D R I P Y Q R R	
181	tac cgg gaa cac cgt gac agt gat acg tat cgg tgt gaa gag cgg agc cca tct ttt gga	
61	▶ Y R E H R D S D T Y R C E E R S P S F G	
241	gag gac tgc tat ggg tct tca cgt tct cga cat cgg aga cgg tca cga gag agg gcg ccg	
81	▶ E D C Y G S S R S R H R R R S R E R A P	
301	tac cgt acc cgc aag cat gcc cac cac tgt cac aaa cgc cgt acc agg tct tgt agc agt	
101	▶ Y R T R K H A H H C H K R R T R S C S S	
361	gct tcc tcg aga agc caa cag agc agt aag cgc agc agc cgg agt gtg gaa gat gac aag	
121	▶ A S S R S Q Q S S K R S S R S V E D D K	
421	gag ggc cac ctg gtg tgc cgg gtc ggc gat tgg ctc caa gag cga tat gag atc gtg ggg	
141	▶ E G H L V C R V G D W L Q E R Y E I V G	
481	aac ctg ggt gaa ggc acc ttt ggc aag gtg gtg gag tgc ttg gac cat gcc aga ggg aag	
161	▶ N L G E G T F G K V V E C L D H A R G K	
541	tca cag gtt gcc ctg aag atc atc cgt aat gtg ggc aag tat cgg gaa gct gct cgt cta	
181	▶ S Q V A L K I I R N V G K Y R E A A R L	
601	gaa att aat gtt ctc aag aaa atc aag gag aaa gac aag gaa aat aag ttc ctt tgt gtc	
201	▶ E I N V L K K I K E K D K E N K F L C V	
661	ctg atg tct gac tgg ttc aac ttc cat ggt cat atg tgc atc gcc ttt gag ctc ctg ggc	
221	▶ L M S D W F N F H G H M C I A F E L L G	
721	aag aac acc ttt gag ttc ctg aag gag aac aac ttc cag cct tac ccc cta cca cat gtc	
241	▶ K N T F E F L K E N N F Q P Y P L P H V	
781	cgg cac atg gcc tac cag ctc tgt cat gcc ctt aga ttt cta cac gag aac cag ctg acc	
261	▶ R H M A Y Q L C H A L R F L H E N Q L T	
841	cac aca gac ttg aag cca gag aac atc ttg ttt gtg aat tct gag ttt gaa acc ctc tac	
281	▶ H T D L K P E N I L F V N S E F E T L Y	
901	aat gag cac aag agc tgc gag gag aag tca gtg aag aac acc agc atc cga gtg gca gac	
301	▶ N E H K S C E E K S V K N T S I R V A D	
961	ttt ggc agt gcc acg ttt gag cat gaa cat cac acc att gtg gcc acc cgt cac tac	
321	▶ F G S A T F D H E H H T T I V A T R H Y	
1021	cgc cca cct gag gtg atc ctt gag ctg ggc tgg gca cag ccc tgt gat gtc tgg agt atc	
341	▶ R P P E V I L E L G W A Q P C D V W S I	
1081	ggc tgc att ctc ttt gag tac tac cgt ggc ttt aca ctc ttc cag acc cat gaa aat aga	
361	▶ G C I L F E Y Y R G F T L F Q T H E N R	
1141	gaa cac ttg gtt atg atg gag aag att cta gga ccc atc cca tca cac atg atc cac cgt	
381	▶ E H L V M M E K I L G P I P S H M I H R	
1201	acc agg aag cag aaa tat ttc tac aaa ggg ggc ctg gtt tgg gat gag aac agc tot gat	
401	▶ T R K Q K Y F Y K G G L V W D E N S S D	
1261	ggg cgg tat gtg aag gag aac tgc aaa cct ctg aag agt tac atg ctg cag gac tcc ctg	
421	▶ G R Y V K E N C K P L K S Y M L Q D S L	
1321	gag cat gtg cag ctg ttt gac ctg atg agg agg atg tta gag ttc gac cct gct cag cgc	
441	▶ E H V Q L F D L M R R M L E F D P A Q R	
1381	atc aca ttg gca gaa gcc ttg ctg cac ccc ttc ttt gct ggc ctg acc cct gag gag cgg	
461	▶ I T L A E A L L H P F F A G L T P E E R	
1441	tcc ttc cac agc agc cgt aac ccc agc aga tga	
481	▶ S F H S S R N P S R •	

Figura 20. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del cDNA completo del gen clk3 de ratón clonado en el vector pSTBlue-1. Secuencia de 1473 pb del gen clk3 de ratón amplificada mediante una reacción de PCR. Las secuencias que anillan con los cebadores clk3sSmaI y clk3asNotI se marcaron con flechas en color naranja y rojo, respectivamente. La traducción de esta secuencia da lugar a la proteína completa de clk3 de 490 aminoácidos. En gris se destaca la secuencia del exón 4. En azul se destaca el dominio quinasa de clk3. Los aminoácidos subrayados destacan el dominio LAMMER.

correspondía al mRNA que codifica para la forma completa de la proteína clk3 (Figura 20).

Para amplificar clk4 se utilizaron en el extremo 5', el cebador clk4sEcoRI que contiene el codón ATG de iniciación y en el extremo 3' el codón clk4asNotI que contiene el codón TGA de terminación. En este caso se clonó en el vector pPCR-Script(+)-AmpSK y se secuenció. La secuencia obtenida se representa en la Figura 21.



Se comprobó la ausencia de 91 pb, correspondiente al exón 4, en cuyo caso el mRNA codificaría la proteína truncada. Por otra parte, se detectó un fragmento adicional de 59 pb, cuya secuencia no presentaba homología con el mRNA descrito originalmente. Estas características nos llevaron a realizar un análisis más profundo de clk4 que se describe en un apartado independiente (apartado 4.5. de resultados).

4.3.2. Expresión a nivel de mRNA de los genes *clk2*, *clk3* y *clk4* en células MEL indiferenciadas y diferenciadas.

Con el objeto de estudiar la expresión de *clk2*, *clk3* y *clk4* en células MEL se realizaron análisis en *Northern blot* de células MEL no tratadas y tratadas durante 120 horas con HMBA 5 mM. Los filtros se hibridaron con los cDNAs marcados radiactivamente correspondientes a los fragmentos PstI-XbaI del vector pSTBlue-*clk2* y BamHI-Hind III del vector pSTBlue-*clk3*. En el caso de *clk4*, se marcó radiactivamente el producto de PCR obtenido al amplificar, con los cebadores *clk4sEcoRI* y *clk4asNotI*, el cDNA obtenido de células MEL tratadas con HMBA durante 120 horas (Figura 22).

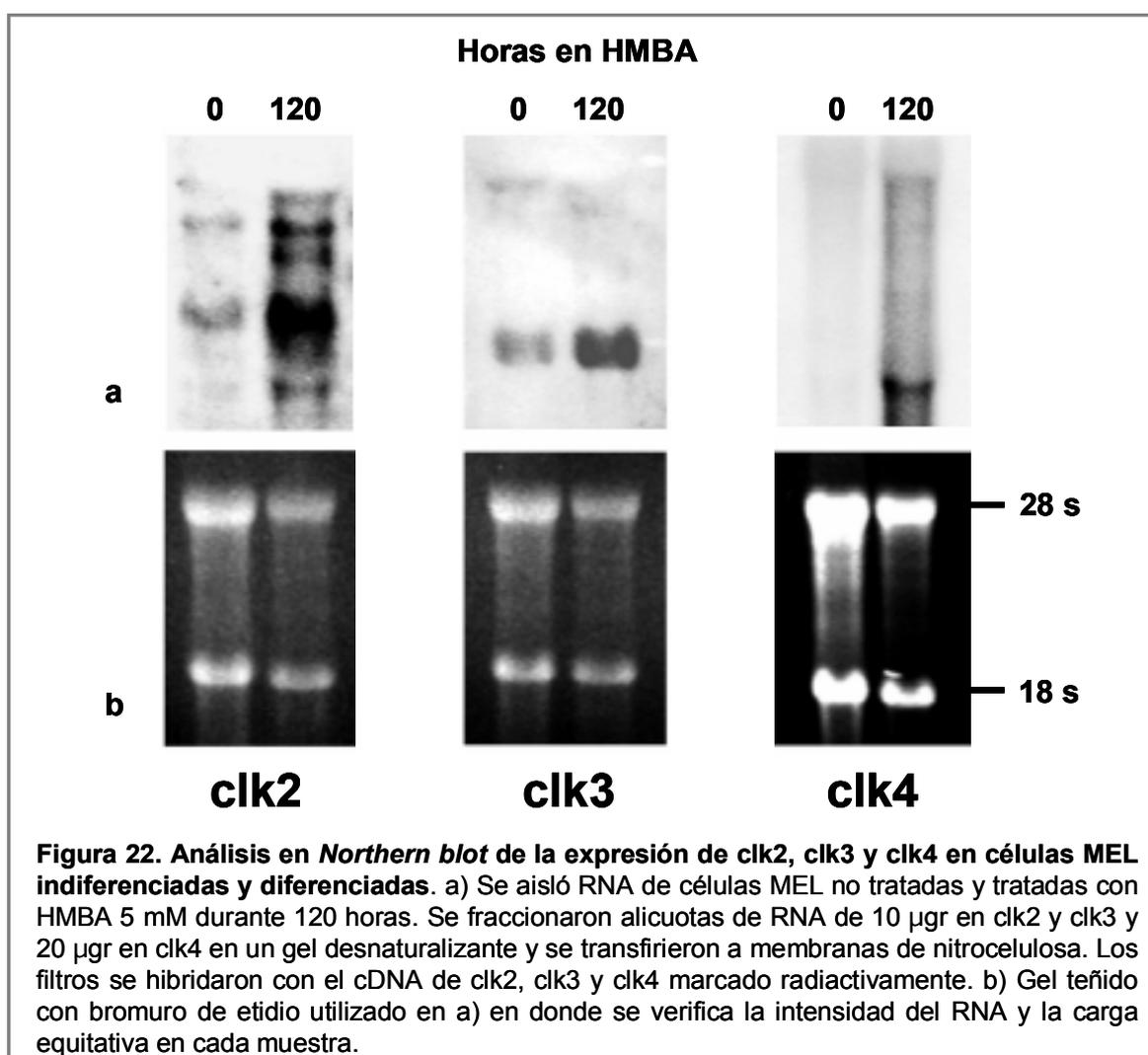


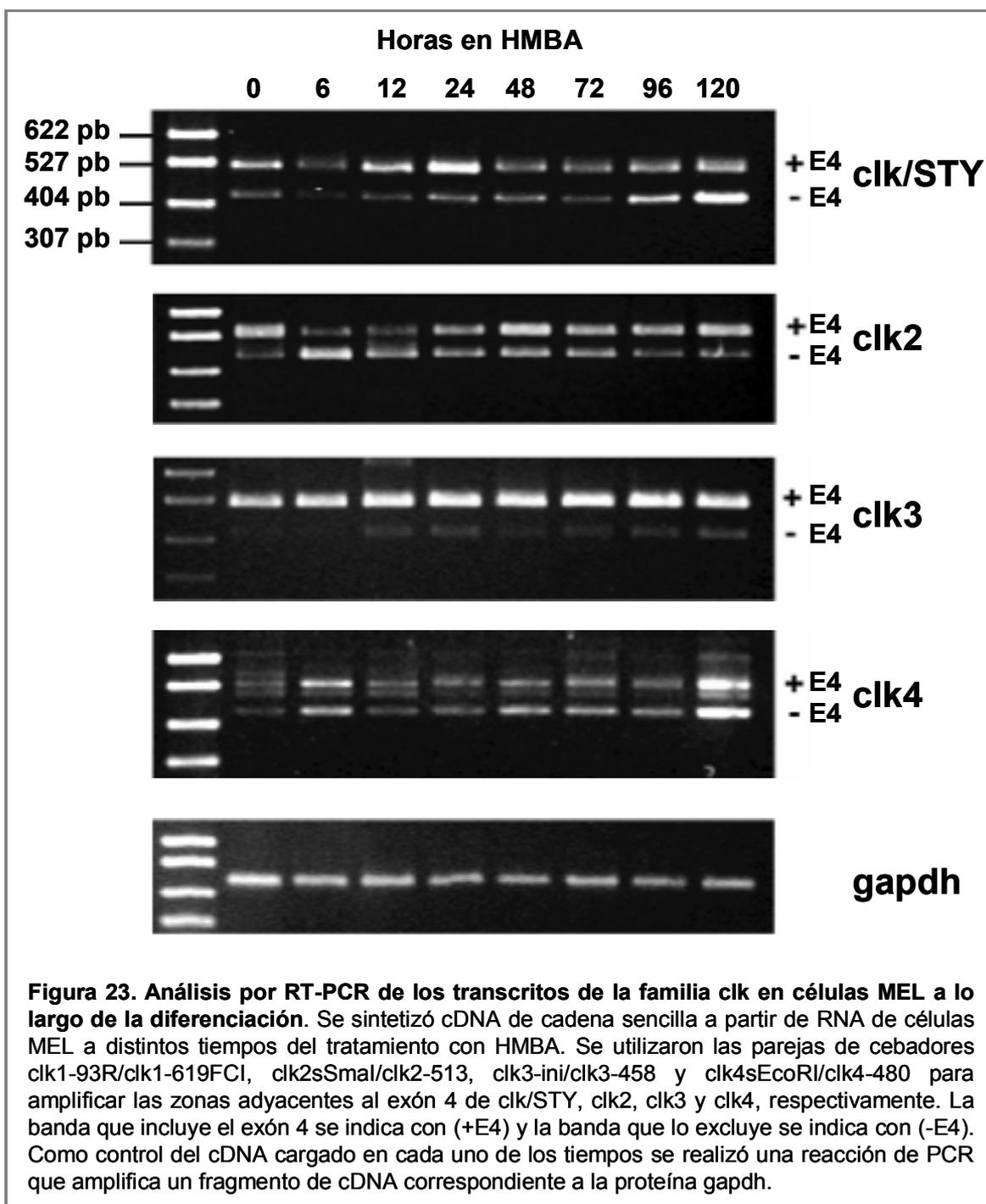
Figura 22. Análisis en *Northern blot* de la expresión de *clk2*, *clk3* y *clk4* en células MEL indiferenciadas y diferenciadas. a) Se aisló RNA de células MEL no tratadas y tratadas con HMBA 5 mM durante 120 horas. Se fraccionaron alícuotas de RNA de 10 μ gr en *clk2* y *clk3* y 20 μ gr en *clk4* en un gel desnaturante y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los filtros se hibridaron con el cDNA de *clk2*, *clk3* y *clk4* marcado radiactivamente. b) Gel teñido con bromuro de etidio utilizado en a) en donde se verifica la intensidad del RNA y la carga equitativa en cada muestra.

Se observó que la expresión de *clk2* y *clk3* es baja en células MEL prediferenciadas y aumenta significativamente después de 5 días de tratamiento con HMBA. En el caso de *clk4*, los niveles de expresión fueron extremadamente bajos. Sólo fue posible visualizar una señal de hibridación cuando se incrementó la cantidad de RNA total en cada muestra. No obstante, se observó un aumento de la señal de hibridación en las muestras correspondientes a las células diferenciadas respecto a las MEL prediferenciadas. Estos resultados permitieron concluir que, tal como ocurría con *clk/STY*, los niveles de expresión de *clk2*, *clk3* y *clk4* aumentan durante el proceso de diferenciación de células MEL.

4.3.3. Análisis de la expresión de los transcritos de la familia *clk*, producto de *splicing* alternativo, durante la diferenciación.

En base a la alta homología entre las secuencias de los miembros de la familia *clk* y de los resultados descritos en la literatura (Duncan et al., 1998; Nayler et al., 1997), era de esperar que *clk2*, *clk3* y *clk4* llevaran a cabo un *splicing* alternativo, de forma similar al observado en *clk/STY*. Para comprobar que esto tenía lugar y analizar al mismo tiempo un posible aumento de la expresión de las distintas isoformas a lo largo de la diferenciación, llevamos a cabo ensayos de RT-PCR. Como molde de la reacción de PCR se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de RNA de células MEL a distintos tiempos de la diferenciación inducida con HMBA. En la reacción de PCR se utilizaron cebadores específicos que anillan al codón de iniciación ATG en los cuatro *clks*, (*clk1-93R*, *clk2sSmaI*, *clk3-ini* y *clk4sEcoRI*) y en el extremo 3' cebadores específicos que anillan a secuencias posteriores al exón 4 de *clk/STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4*, respectivamente (*clk1-619FCl*, *clk2-513*, *clk3-458* y *clk4-480*). Como control del cDNA utilizado en cada uno de los tiempos se realizó una reacción de PCR que amplifica un fragmento de 451 pb de la proteína *gapdh*. Previamente, se comprobó que la expresión de *gapdh* no se modificaba en células MEL diferenciadas. Los productos de la reacción de PCR fueron resueltos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Figura 23).

En los cuatro miembros de la familia *clk* se observaron al menos dos bandas correspondientes a los transcritos que incluían/excluían el exón 4. La relación entre las



dos bandas, sin embargo, variaba entre los distintos clks y a lo largo de la diferenciación. Así, para clk/STY, se repitió el resultado obtenido previamente (apartado 4.2.3. y Figura 17) observándose que la banda superior de 527 pb, que incluye el exón 4, prevalece sobre la isoforma truncada en células MEL prediferenciadas, situación que se invierte al final de la diferenciación. Un alto nivel de la isoforma que excluye el exón

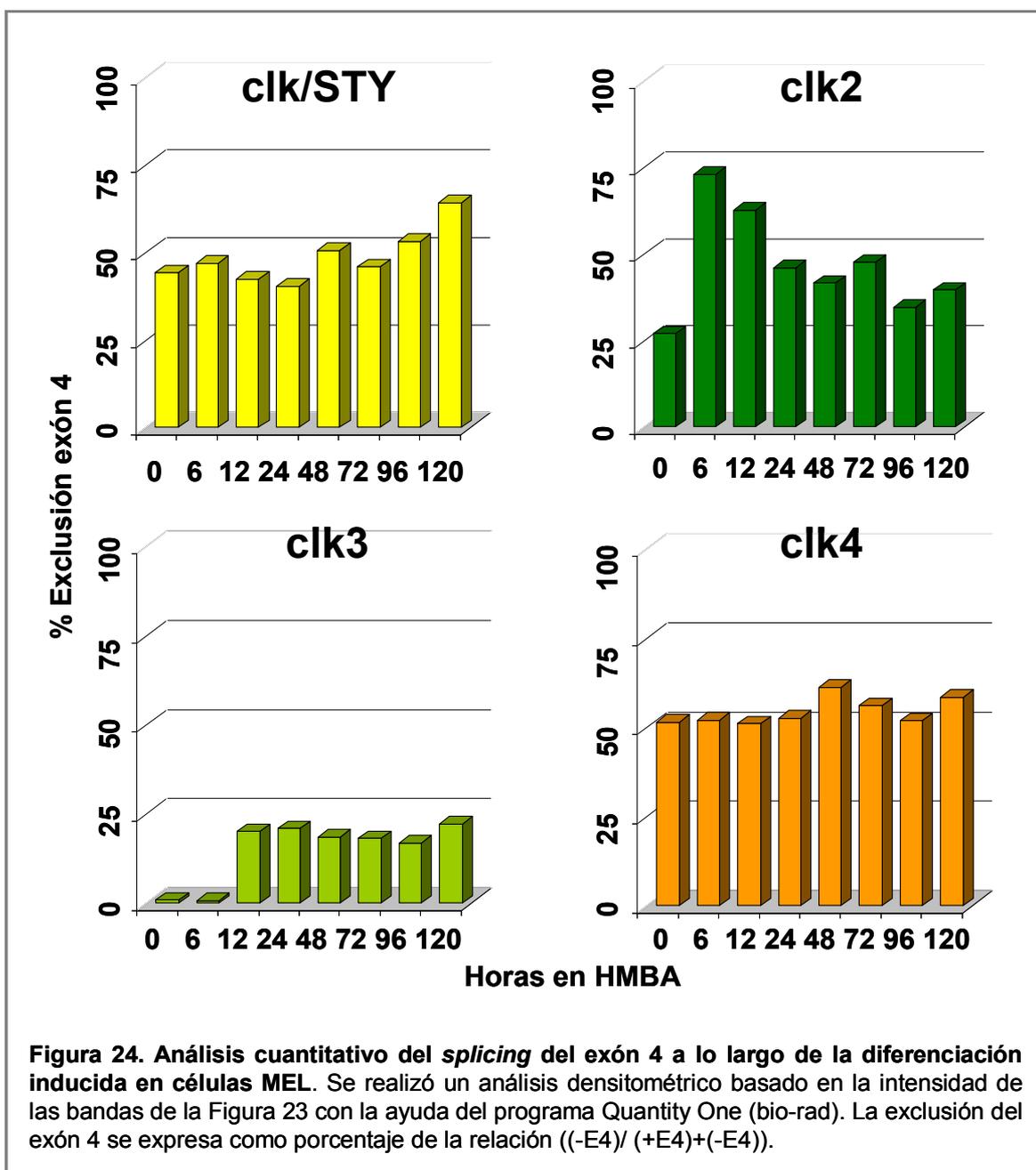
4 se observó asimismo en *clk4*, aunque en este caso, la relación entre ambas isoformas permanece constante en las diferentes muestras. Por otra parte, en *clk4* se observó la presencia de bandas adicionales, cuya amplificación ocurría incluso en condiciones de PCR altamente restrictivas. Como se pudo comprobar más tarde, la amplificación de estas bandas es el producto generado a partir de una nueva isoforma que describimos en el apartado 4.5.

La amplificación de *clk2* y *clk3* reveló que la forma dominante en ambos casos es aquella que incluye el exón 4, excepto durante los estadios de pre-determinación (6 y 12 horas) en *clk2*. La isoforma que excluye el exón 4 fue minoritaria en *clk3* a lo largo de toda la diferenciación.

Con el objeto de cuantificar el nivel de exclusión en cada uno de los casos se realizó un análisis densitométrico de cada uno de los geles representado en la Figura 23. La intensidad de las bandas se cuantificó con la ayuda del programa *Quantity One* (Bio-Rad). Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje del transcrito que excluye el exón 4 frente a la suma de los dos transcritos que incluyen/excluyen el exón 4: $(-E4)/(+E4)+(-E4)$ (Figura 24). En resumen, los resultados obtenidos en este apartado permitieron corroborar la presencia de las isoformas completa y truncada en todos los miembros de la familia *clk*, tanto en células MEL pre-diferenciadas como a lo largo de la diferenciación inducida. En los cuatro casos se observó un incremento de la forma truncada en los estadios tardíos de la diferenciación. Sin embargo, sólo se observó un cambio en la relación de las dos isoformas, a favor de la forma truncada, en el caso de *clk/STY*, y en menor medida en *clk4*. De la misma forma, la presencia de la forma truncada sólo alcanzó niveles significativamente altos en *clk/STY* y *clk4*.

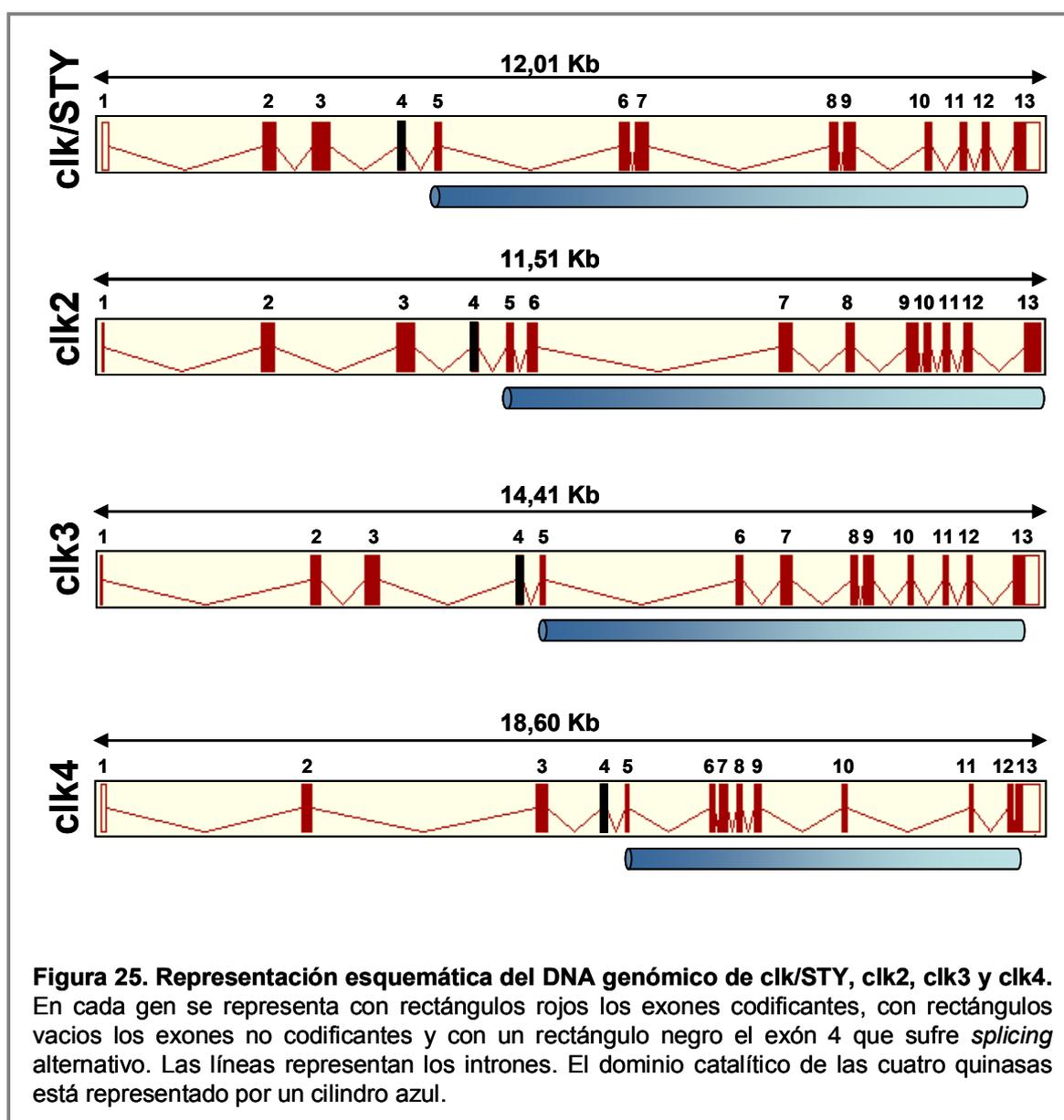
4.3.4. Análisis comparativo por homología de secuencia de los *clks*.

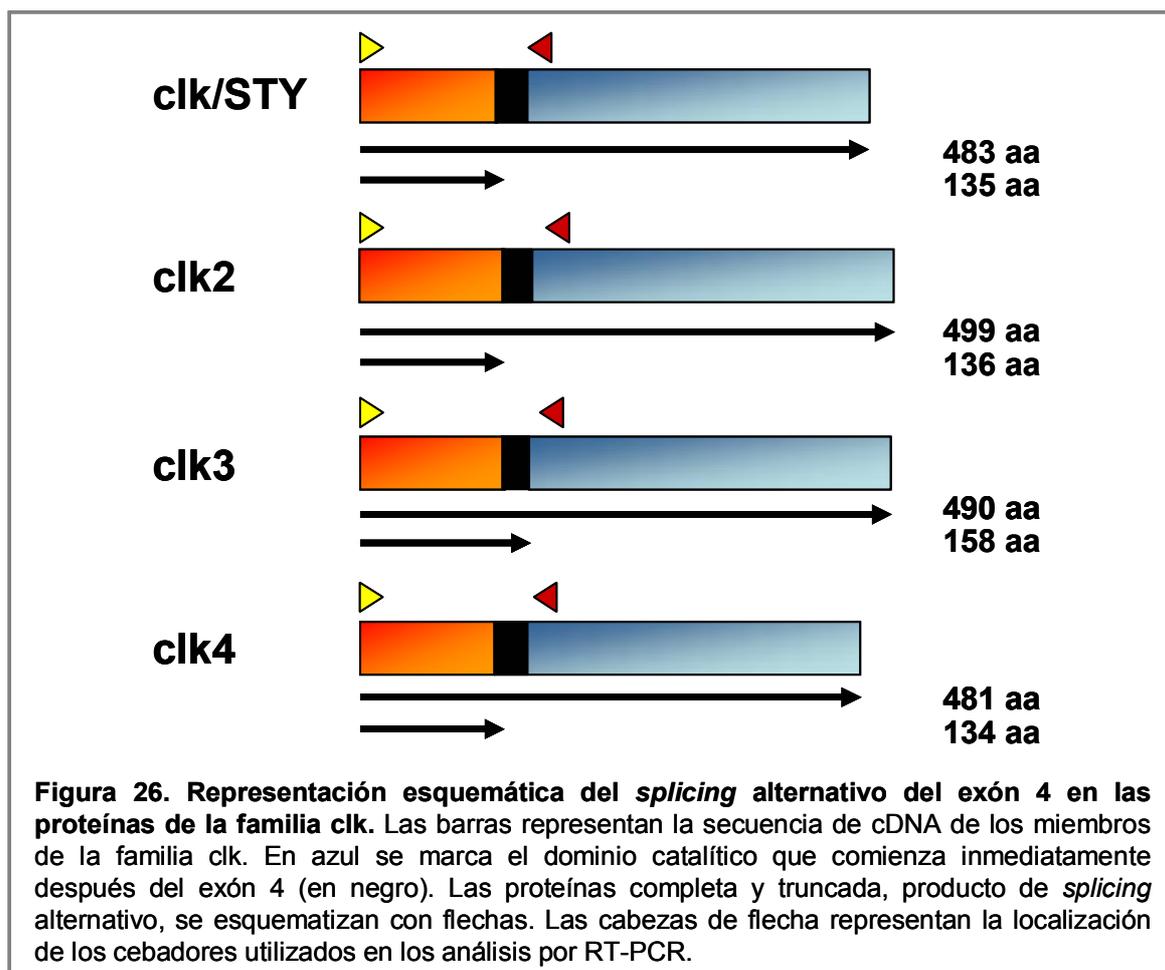
El alineamiento de las secuencias de los cuatro miembros de la familia *clk* nos permitió llevar a cabo un análisis comparativo y corroborar el alto grado de homología entre los distintos componentes (Figura 3). La Figura 25 representa las secuencias del DNA genómico de cada uno de los *clks* de ratón según figuran en la base de datos del Sanger Institute (<http://www.ensembl.org>). En los cuatro casos se han identificado 13 exones que codifican para las respectivas proteínas. El dominio quinasa está altamente



conservado mientras que el extremo N-terminal presenta una mayor variabilidad. El análisis comparativo permitió determinar que el *splicing* alternativo afectaría en todos los casos al exón 4. En la Figura 26 se representan los productos del *splicing* alternativo en cada uno de los clks. Se ha podido comprobar además, que la región donde se produce el *splicing* del exón 4 está altamente conservada (Tabla III). En la proteína completa, la unión entre el exón 4 y el exón 5 se produce entre un residuo de arginina y uno de tirosina que precede a la región catalítica de las proteínas. En las isoformas truncadas la unión entre el exón 3 y el exón 5 produce un cambio en el

marco de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro. El primer aminoácido codificado en la unión de ambos exones en los cuatro clks es un residuo de metionina. Estos resultados han permitido corroborar que la presencia de dos isoformas, una completa y una troncada, es una característica común a los cuatro miembros de las proteínas clk.



Tabla III. Secuencia de aminoácidos en la unión exón /exón de las proteínas *clk*

	Proteína completa exón 4 / exón 5	Proteína troncada exón 3 / exón 5
clk/STY	... S A R ₁₅₉ / Y E I V D S H G ₁₂₉ / M K L L I L •
clk2	... Q E R ₁₆₁ / Y E I V S S S S ₁₃₃ / M K L •
clk3	... Q E R ₁₅₅ / Y E I V G A S S ₁₂₉ / M R S W...R L P •
clk4	... R A R ₁₅₃ / Y E I V D S H S ₁₂₈ / M K S W T L •
	Inicio del dominio quinasa	

Los aminoácidos marcados en rojo indican residuos altamente conservados en los cuatro miembros de la familia *clk*. El subíndice en el residuo de arginina indica su posición en la proteína *clk/STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4*, respectivamente. La secuencia inicial del dominio quinasa se indica con una barra.

4.4. Estudio de la sobreexpresión de clk/STY y clk/STY^{tr} en células MEL DS-19.

4.4.1. Establecimiento de transfectantes estables en células MEL para clk/STY y clk/STY^{tr}.

Los resultados de los experimentos de RT-PCR descritos en el apartado 4.2.3. (Figuras 17 y 23) han permitido determinar que, aun cuando las isoformas que codifican para clk/STY y clk/STY^{tr} se expresan a lo largo de la diferenciación de células MEL, se produce un cambio en la relación entre ambos transcritos, prevaleciendo la forma truncada en estadios tardíos. Esta observación sugiere que dicha relación podría estar regulada durante el proceso de diferenciación. Para comprobar si un desequilibrio en la expresión de ambas isoformas afecta la expresión global de clk/STY y al proceso de diferenciación se establecieron líneas celulares estables a partir de MEL DS-19 capaces de sobreexpresar estas proteínas.

Se clonaron los cDNAs correspondientes a las isoformas que codifican para clk/STY y clk/STY^{tr} en el vector de expresión pEBBpuroHA, cedido por el Dr. Genhong Cheng del Departamento de Microbiología y Genética Molecular de la Universidad de Los Ángeles (UCLA). Se comprobó por secuenciación la fidelidad de las secuencias así como la correcta localización del marco de lectura respecto del epítipo HA. Se realizaron tres transfecciones independientes en células MEL DS-19 con los plásmidos pEBBpurclk/STY, dos transfecciones con pEBBpurclk/STY^{tr} y dos transfecciones control con el vector pEBBpuro. Del total de transfectantes seleccionados, según su capacidad para crecer en medio con puomicina, se seleccionaron a su vez aquéllos que expresaban clk/STY o clk/STY^{tr}. El número de clones obtenidos en cada caso se representa en la Tabla IV. De un total de 130 transfectantes estables obtenidos para clk/STY, se llevó a cabo el análisis en *Western blots* de 58, de los cuales 14 expresaban cantidades significativas de la proteína de fusión clk/STY-HA. En la Figura 27a se muestran algunos ejemplos de transfectantes que expresan (clk/STY-G9, clk/STY-A11, clk/STY-A7, clk/STY-B8 y clk/STY-A2) o no expresan (clk/STY-E1 y clk/STY-G2) clk/STY-HA.

Tabla IV. Transfectantes estables pEBBpurclk/STY y pEBBpurclk/STY^{tr}

	Seleccionados con puromicina	Caracterizados (Western anti-HA)	Positivos (Western anti-HA)
pEBBpurclk/STY	130	58	14
pEBBpurclk/STY ^{tr}	113	31	0
pEBBpuro	253	-	-

Se transfectaron células MEL con los plásmidos pEBBpurclk/STY y pEBBpurclk/STY^{tr} y se seleccionaron transfectantes estables en medio DMEM completo con puromicina. Se caracterizaron los clones que expresaban la proteína de fusión CLK/STY-HA o CLK/STY^{tr}-HA mediante ensayos de *Western blot*.

En el caso de los transfectantes clk/STY^{tr}, se obtuvo un total de 113 clones y se analizaron 31 mediante *Western blot*, todos los cuales resultaron negativos. El alto número de transfectantes viables indicaba que la falta de expresión de la proteína clk/STY^{tr} no se debía a la inserción del cDNA en sitios inadecuados. Para comprobar que la isoforma truncada se sobreexpresaba a nivel de RNA se realizaron ensayos de RT-PCR de cDNAs obtenidos de clones pEBBpurclk/STY^{tr} utilizando los cebadores clk1-93R y clk1-619FCI (Figura 16). Se observó que varios de los transfectantes, como clk/STY^{tr}-C4 y clk/STY^{tr}-F6, sobreexpresaban el transcrito correspondiente a la proteína truncada (Figura 27b). Los niveles de expresión observados en células indiferenciadas indicaba además que correspondía a la expresión exógena de pEBBpurclk/STY^{tr}. A modo de control, se utilizaron estos mismos cebadores en un ensayo de RT-PCR del RNA aislado de transfectantes clk/STY y se comprobó que el transcrito amplificado en este caso correspondía a la isoforma que codifica para clk/STY. Estos resultados indicaron que a diferencia de clk/STY, clk/STY^{tr} produce un mRNA que no se traduce eficazmente y, por lo tanto, no produce una proteína estable.

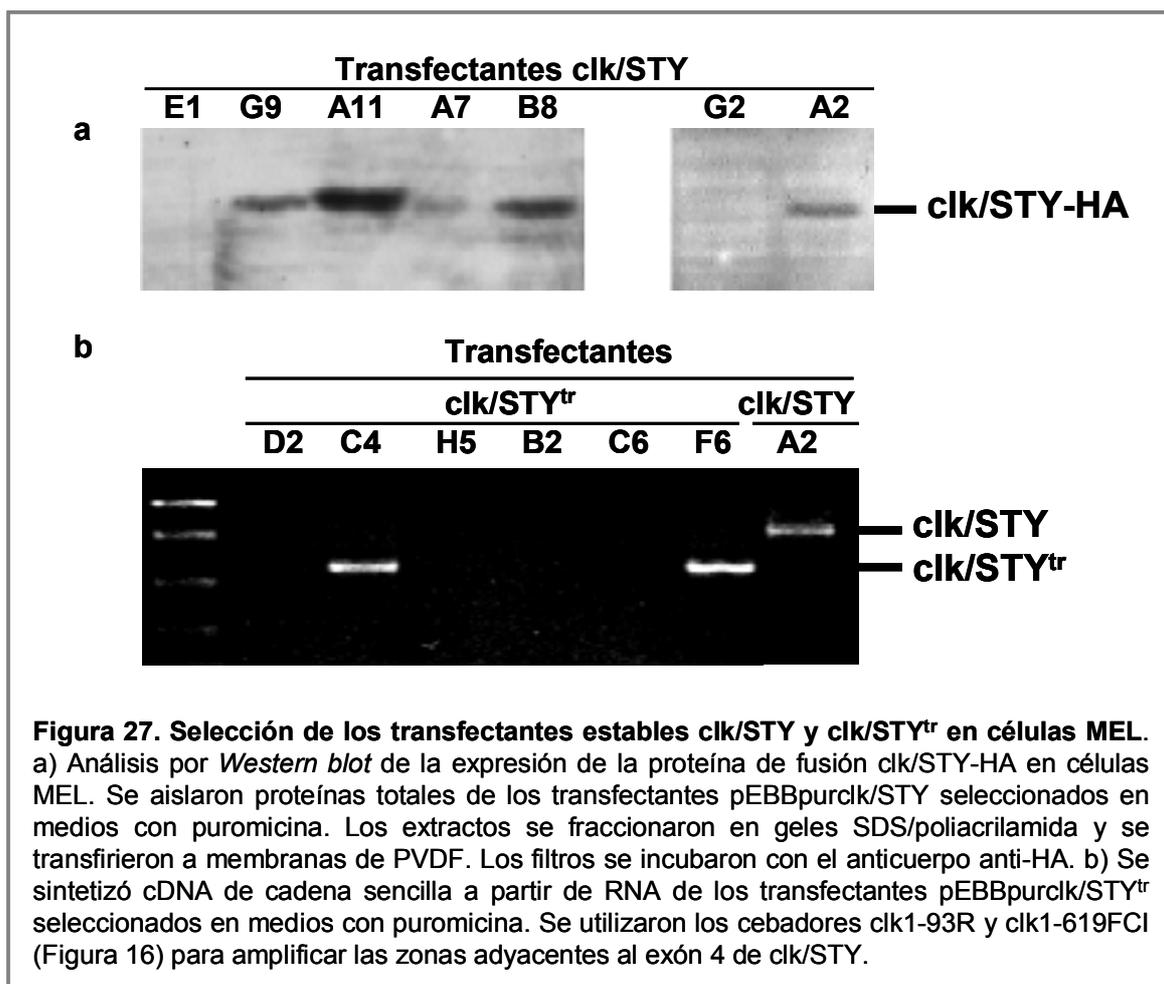


Figura 27. Selección de los transfectantes estables clk/STY y clk/STY^{tr} en células MEL.
 a) Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína de fusión clk/STY-HA en células MEL. Se aislaron proteínas totales de los transfectantes pEBBpurclk/STY seleccionados en medios con puromicina. Los extractos se fraccionaron en geles SDS/poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Los filtros se incubaron con el anticuerpo anti-HA. b) Se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de RNA de los transfectantes pEBBpurclk/STY^{tr} seleccionados en medios con puromicina. Se utilizaron los cebadores clk1-93R y clk1-619FCI (Figura 16) para amplificar las zonas adyacentes al exón 4 de clk/STY.

4.4.2. Inducción de la diferenciación en transfectantes pEBBpurclk/STY y pEBBpurclk/STY^{tr}.

Una vez caracterizados e identificados los transfectantes estables clk/STY y clk/STY^{tr}, y verificado su nivel de expresión, se determinó el efecto de su sobreexpresión sobre la diferenciación inducida con HMBA. La Tabla V muestra los resultados de la diferenciación llevada a cabo con los transfectantes estables y los controles. Se observó que el porcentaje de células B⁺ contabilizadas al final de la diferenciación no variaba significativamente entre los transfectantes y la línea parental. En varias ocasiones sin embargo, se detectó una aceleración de la diferenciación entre las 48 y las 72 horas de tratamiento. En estos casos, a las 48 horas de inducción se contabilizó más de un 50% de células B⁺ y a las 72 horas ya se había alcanzado el máximo valor de células diferenciadas.

Tabla V. Porcentaje de células diferenciadas en los transfectantes clk/STY y clk/STY^{tr}

	células B+				
	Horas en HMBA				
	0	24	48	72	96
clk/STY ^{tr} -C4	2,0	2,2	53,3	82,9	86,8
clk/STY ^{tr} -F6	0,3	1,0	75,1	96,3	92,9
clk/STY-A11	0,5	1,5	51,3	82,0	88,8
clk/STY-A2	0,4	0,5	47,1	85,5	87,8
pEBBpuro-H5	1,3	0,8	57,5	88,7	93,4
MEL	0,1	0,3	46,0	86,7	95,9

Se cultivó cada una de las líneas transfectantes pEBBpurclk/STY y pEBBpurclk/STY^{tr} en medio DMEM completo con puomicina y se incubó en presencia de HMBA 5 mM durante 4 días. Se tomaron muestras entre las 0 y 96 horas de tratamiento y se estimó en cada caso el porcentaje de células B+ mediante el ensayo de benzidina. Se utilizó como control un cultivo de células MEL DS-19 sin transfectar y un cultivo transfectado con el vector pEBBpuro.

En conjunto estos resultados indican que la sobreexpresión de clk/STY y clk/STY^{tr} produce un efecto que se traduce en una aceleración de la diferenciación en etapas intermedias. No obstante al final del proceso este efecto se diluye y no produce cambios en el porcentaje total de células diferenciadas que alcanzan valores similares al observado en la línea parental.

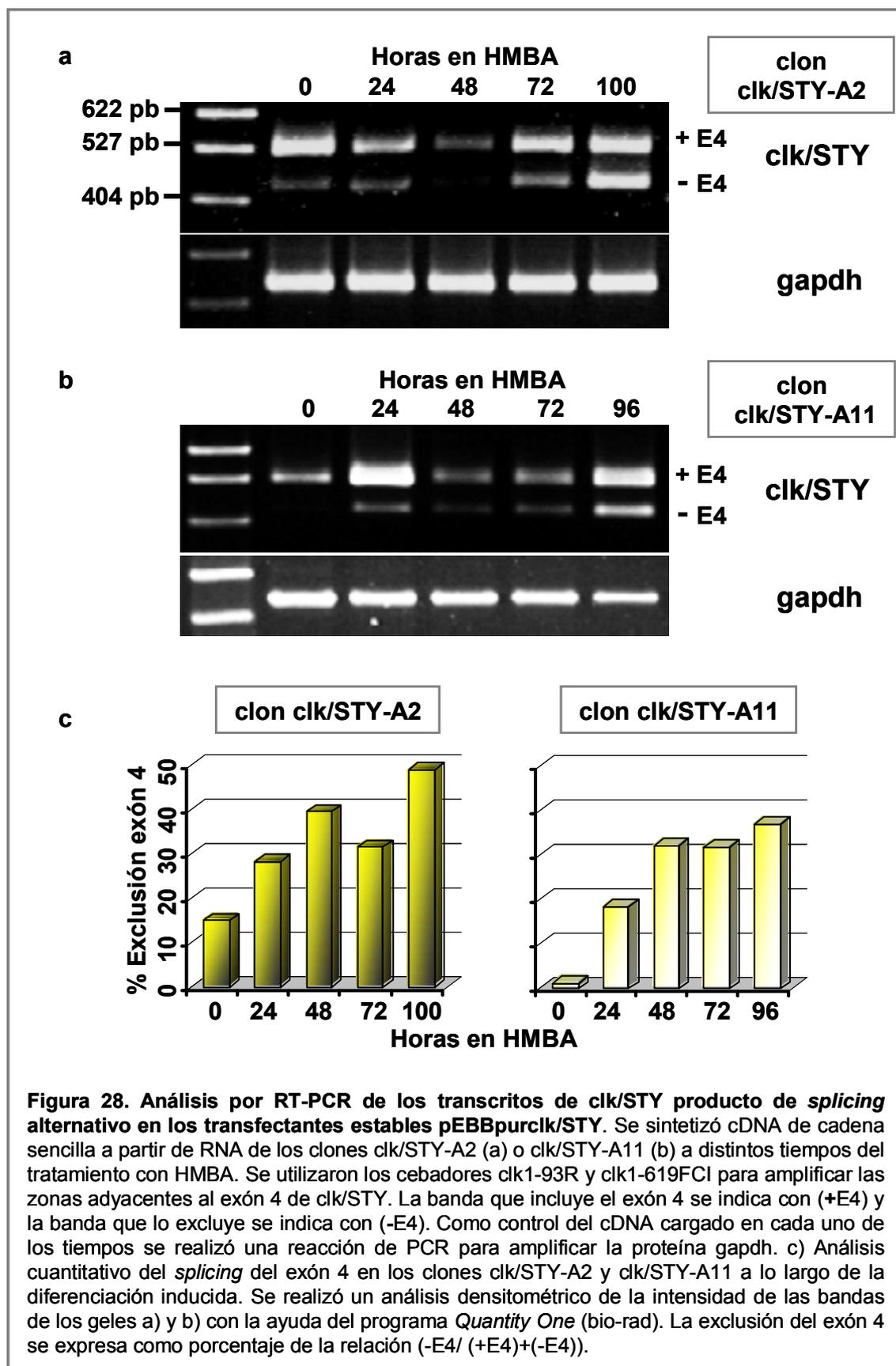
4.4.3. Análisis de la relación exclusión/inclusión del exón 4 en los transfectantes clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida.

El efecto de la sobreexpresión de clk/STY sobre el *splicing* alternativo del exón 4 era uno de los objetivos principales del capítulo de transfectantes estables. La capacidad de forzar la expresión de clk/STY, incluso al final de la diferenciación, podría servir para neutralizar la expresión del transcrito truncado, cuya expresión, como se analizó anteriormente, se incrementa en células diferenciadas. Esto debería resultar en una disminución en el porcentaje de exclusión del exón 4. Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a partir de RNA de los clones clk/STY-A11 y clk/STY-A2 a distintos tiempos

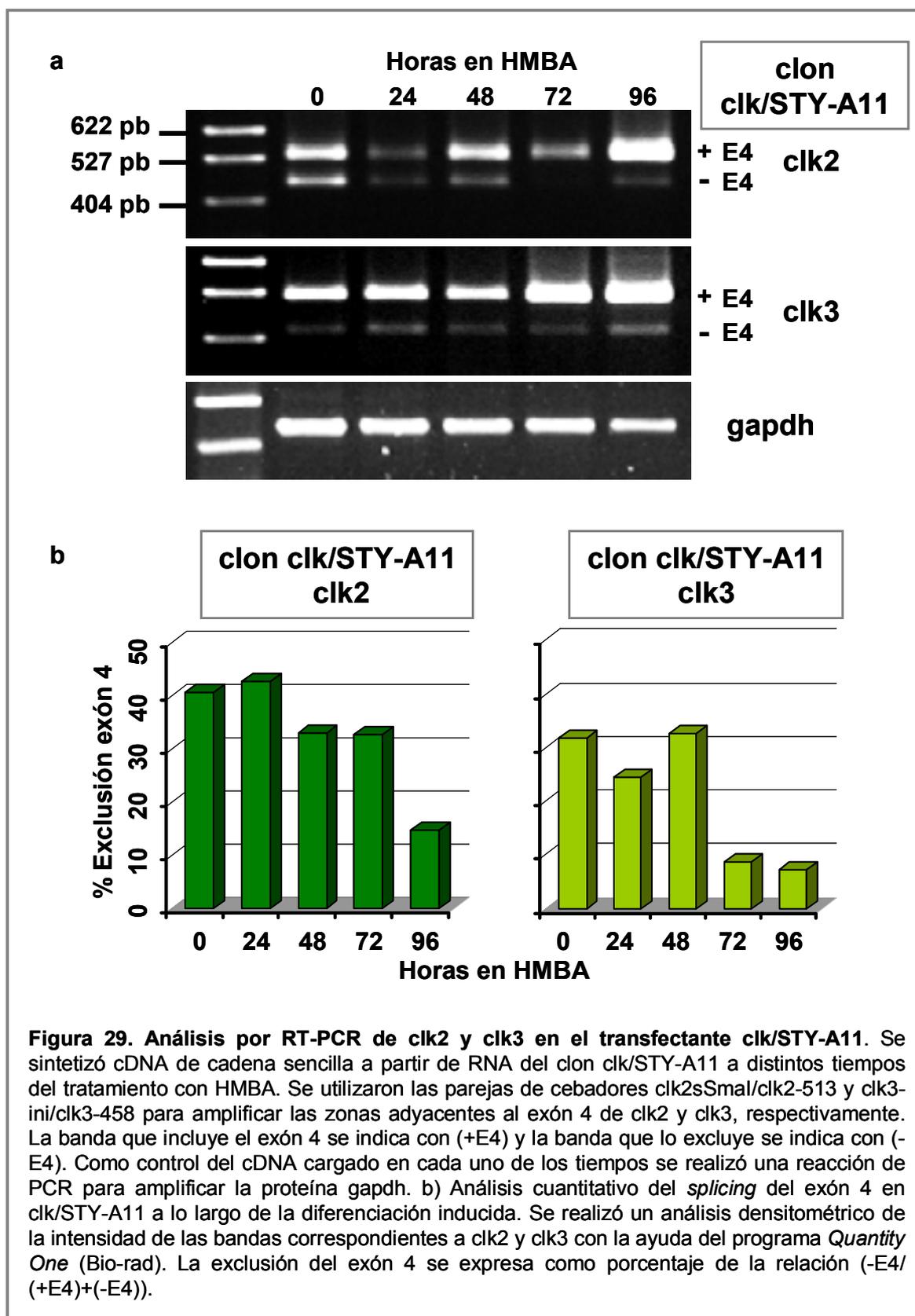
de la diferenciación utilizando los cebadores clk1-93R y clk1-619FCI como ya describimos en el apartado anterior 4.2.3. (Figura 28a y b). Tal como se esperaba, se observó que la banda superior de 527 pb de la isoforma completa prevaleció sobre la isoforma truncada en células pre-diferenciadas en ambos transfectantes. La intensidad de las bandas se cuantificó con la ayuda del programa *Quantity One* (Bio-Rad) y los datos obtenidos se expresaron como porcentaje del transcrito que excluye el exón 4 frente a la suma de los dos transcritos producto de *splicing* alternativo del mRNA de clk/STY (Figura 28c). Estos resultados, aunque similares a los observados en las líneas parentales, difieren en el porcentaje de la relación entre ambos transcritos (Figura 17 y 23). El porcentaje de exclusión observado en células MEL fue de aproximadamente un 45%, mientras que en los transfectantes A2 y A11 alcanzaron valores de 15 y 1%, respectivamente (Figura 28c). Esto es una consecuencia natural de la sobreexpresión de clk/STY exógeno en cada uno de los transfectantes. Sorprendentemente, a lo largo de la diferenciación se observó un aumento progresivo del porcentaje de exclusión del exón 4, tal como ocurría en células MEL parentales (Figura 17 y 23). El porcentaje de exclusión al final de la diferenciación, en los transfectantes A2 y A11, llegó a 48 y 36%, respectivamente. Estos datos suponen un aumento del 35 y 33% de los valores iniciales. Por otro lado, se acercan a los valores obtenidos en la línea parental (20% de aumento de exclusión, Figura 24). Estos resultados nos permiten concluir que la exclusión del exón 4 está favorecida a lo largo de la diferenciación de células MEL, aún en condiciones de sobreexpresión de la forma completa de clk/STY. La hipótesis de una autorregulación de clk/STY a través de sus dos isoformas queda reforzada con estos resultados.

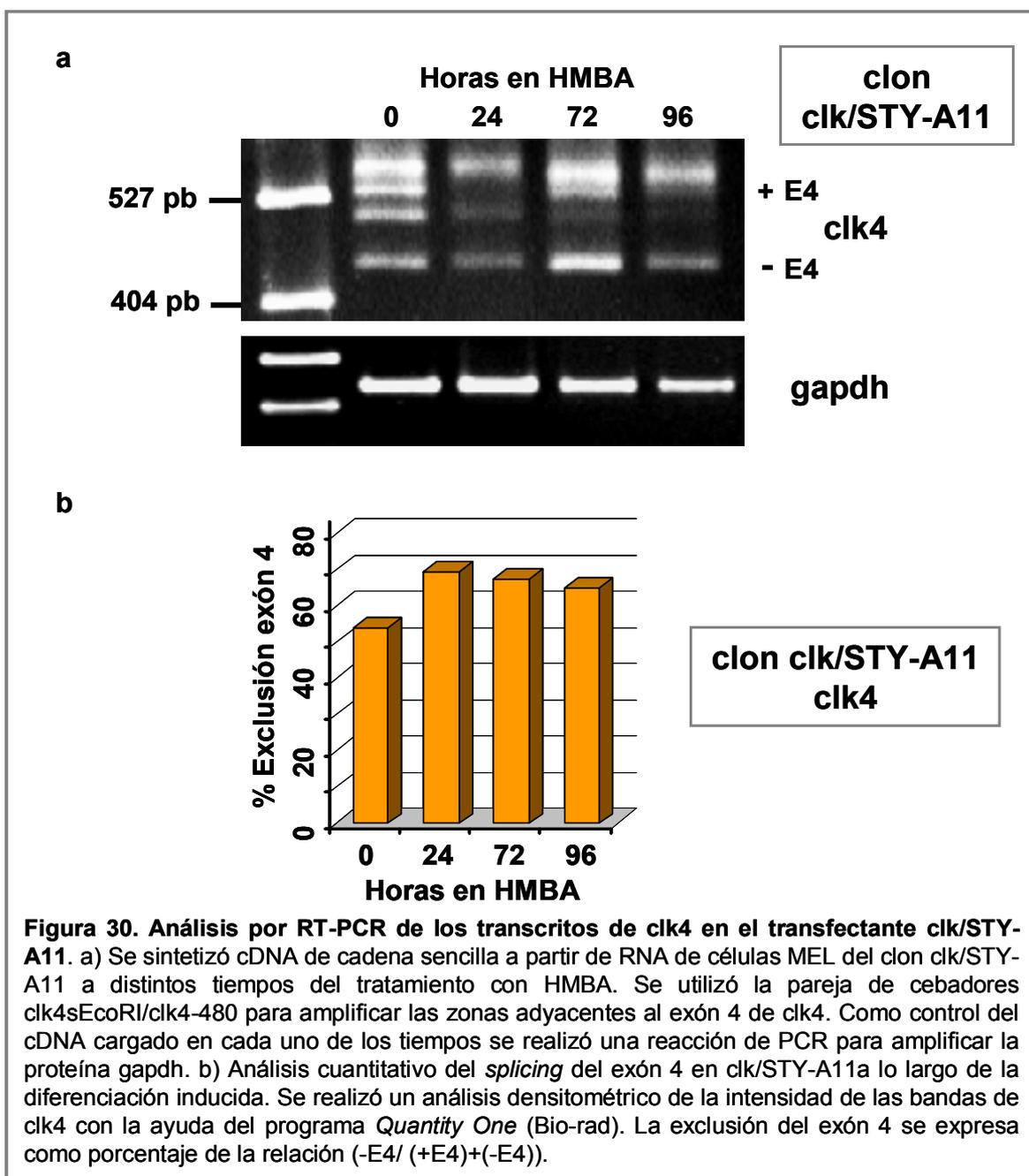
4.4.4. Estudio de la relación exclusión/inclusión del exón 4 de clk2, clk3 y clk4 en transfectantes clk/STY a lo largo de la diferenciación inducida.

La capacidad de autorregulación de clk/STY, tal como se sugiere en el apartado anterior, llevó a pensar que clk/STY podría a su vez regular la expresión de clk2, clk3 y clk4. Con el objeto de analizar la posible influencia de clk/STY sobre el *splicing* alternativo del exón 4 de los otros clks se realizaron ensayos de RT-PCR de los transfectantes que sobreexpresaban clk/STY. Utilizando el clon clk/STY-A11 a distintos



tiempos de diferenciación se construyeron cebadores adyacentes al exón 4 de *clk2*, *clk3* y *clk4*: *clk2sSmaI*, *clk3-ini* y *clk4sEcoRI* en el extremo 5' y *clk2-513*, *clk3-458* y *clk4-480* en el extremo 3' (Figuras 29a y 30a). Además, se cuantificó la intensidad de las bandas teñidas con bromuro de etidio con la ayuda del programa *Quantity One* (Bio-Rad) para obtener el porcentaje de exclusión del exón 4 (Figuras 29a y 30a). Los resultados obtenidos demostraron que la sobreexpresión de *clk/STY* modificaba el porcentaje de exclusión del exón 4 de *clk2* y *clk3*, al menos, en células pre-diferenciadas. Así, en células MEL, los porcentajes de exclusión fueron del 26% en *clk2* y del 0,8% en *clk3* (Figura 24), mientras que en *clk/STY-A11* alcanzaron valores del 40 y 31%, respectivamente. Sin embargo, a lo largo del tratamiento con HMBA el porcentaje de exclusión se acercó al de la línea parental. En todos los casos se observó que las isoformas que codifican para la proteína completa superaron a las formas truncadas (Figura 29). En el caso de *clk4*, el porcentaje de exclusión del exón 4 fue similar en el clon *clk/STY-A11* y en células MEL parentales (Figura 30).

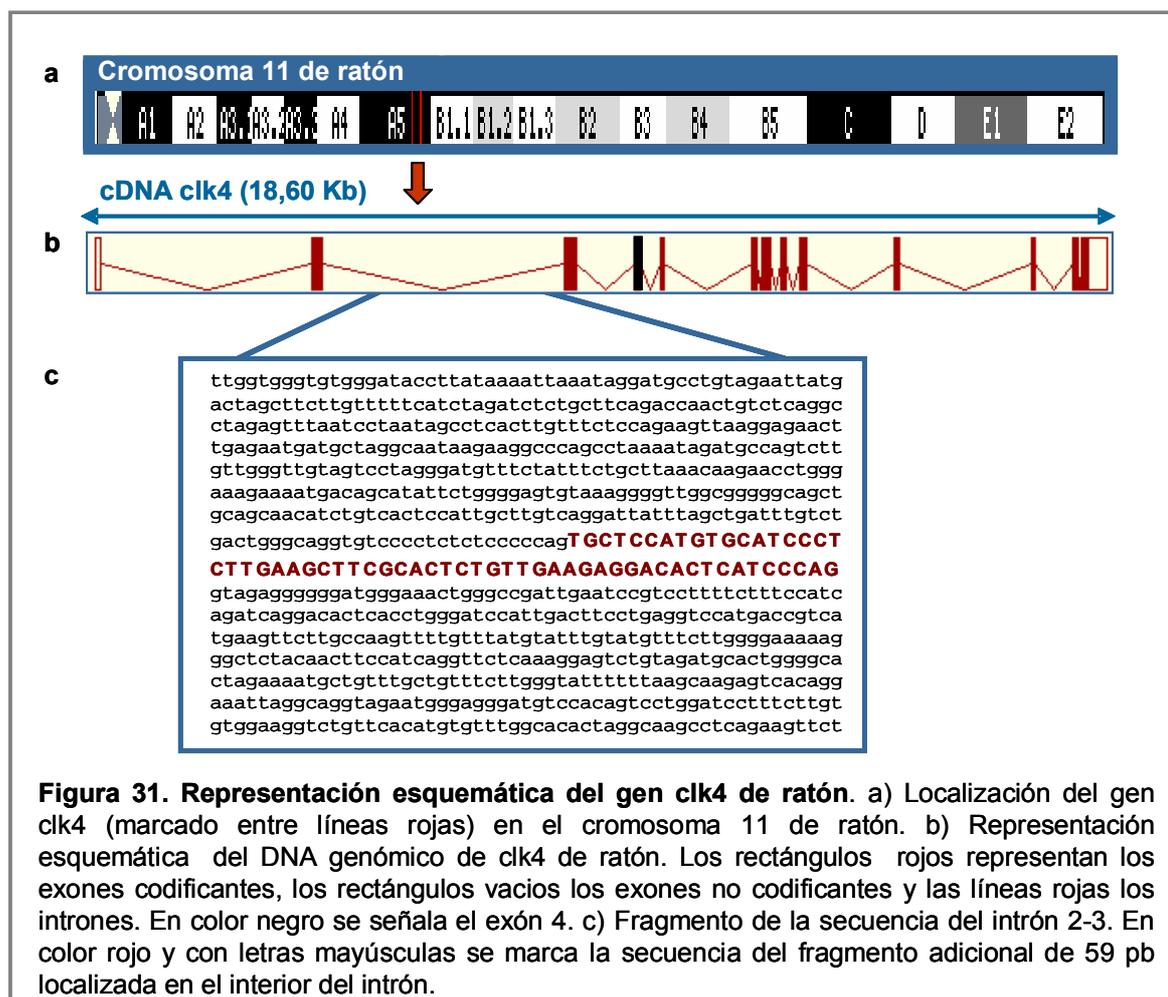




4.5. clk4: identificación de un exón adicional que determina una nueva isoforma.

4.5.1. Descripción de un exón adicional en el gen clk4.

Como se describió en el apartado 4.3.1., en un intento de clonar el cDNA de clk4, se amplificó un fragmento que carecía del exón 4 lo cual, en principio, indujo a pensar que se trataba del cDNA que codificaba para la proteína truncada. El cDNA clonado presentaba además un fragmento de 59 pb ausente en la secuencia del mRNA descrito previamente por Nayler y colaboradores (Número de acceso del *GenBank*: NM_007714) (Nayler et al., 1997). Con el objeto de determinar si este fragmento formaba parte del DNA genómico de clk4, se analizó en el cromosoma 11 de ratón la zona correspondiente al gen. De esta manera se comprobó que el fragmento adicional de 59 pb formaba parte del intrón que separa los exones 2 y 3 de clk4 (Figura 31).



Por otra parte, se observó que este fragmento estaba flanqueado por secuencias consenso características de los sitios de *splicing*. Así, se encontraron secuencias “ag” de los sitios aceptores en el extremo 3’ del intrón 2 y secuencias “gt” de los sitios donadores en el extremo 5’ del intrón 3, que limitan las uniones exón / intrón. En la Tabla VI se resumen los datos encontrados en las uniones exón / intrón de cada uno de los exones de *clk4*, incluyendo el fragmento de 59 pb. Estos resultados, unidos a los obtenidos por RT-PCR en donde se observaban bandas adicionales (Figuras 23, 30a y 32), sugerían que el fragmento de 59 pb podría conformar un exón previamente “ignorado” y al cual denominamos exón 2a.

Tabla VI. Secuencias consenso de *splicing* en las uniones exón / intrón del gen *clk4* de ratón

	Sitio aceptor	Tamaño pb	Sitio donante
Consenso	cag / G	...	AG / gtaagt
Exón 1	tgacgg / CGCGGA	99	GCGGAG / gtgagg
Exón 2	taacag / ATGCGG	161	GGATTG / gtaaat
Exón 2a	ccccag / TGCTCC	59	TCCCAG / gtagag
Exón 3	tcgcag / TCACTA	223	CATTCG / gtatga
Exón 4	ttccag / AAGAGC	91	CAAGAT / gtatag
Exón 5	ctttag / ATGAAA	67	CGGCAT / gtaagt
Exón 6	ttcaag / GGATGG	116	TGTCTT / gtaagt
Exón 7	ttttag / CCGATG	167	TAAATT / gtaagt
Exón 8	ttgtag / TTTTAC	95	AAAATG / gtaagt
Exón 9	ctctag / AAACGA	130	TTTTGG / gtagt
Exón 10	gaatag / CTCTAG	83	TTTCAG / gtatgt
Exón 11	ttttag / ACCCAC	80	GACAAG / gtgggc
Exón 12	ttgtag / GAAACG	91	TTAAAG / gtaaag
Exón 13	ctctag / GAATTT	488	TCTTGA / ccactt

Los nucleótidos que forman parte de los intrones se indican en letras minúsculas. En mayúsculas se indican los nucleótidos pertenecientes a los exones. En rojo se destacan los nucleótidos 100% conservados en las uniones exón / intrón.

Para confirmar esta hipótesis se llevó a cabo un análisis “*in silico*” utilizando una base de datos desarrollada por Michael Zhang y Adrian Krainer del Cold Spring Harbor Laboratory, Estados Unidos (http://cgsigma.cshl.org/new_alt_exon_db2/) que permite predecir la fidelidad y naturaleza de los sitios de *splicing*. En este caso, se utilizó la opción creada para la predicción de exones, basada en la comparación de posibles sitios de *splicing* con las secuencias consenso establecidas. Para calcular los valores correspondientes a los sitios donadores (sitios de *splicing* 5') se especificaron 3 nucleótidos en el exón y 6 nucleótidos en el intrón. Para calcular los valores de los sitios aceptores (sitios de *splicing* 3') se especificaron 12 nucleótidos en el intrón y un nucleótido en el exón correspondiente. Un encaje del 100% con el sitio aceptor de mamíferos “ttttcccag/G” da un resultado de 14,2. Un encaje del 100% para el sitio donador “AAG/gtaagt” da un resultado de 12,6. El encaje medio para exones constitutivos es de 7,9 y 8,1 para los sitios 3' y 5', respectivamente. Los resultados obtenidos para los distintos exones de *clk4*, así como para los de *clk*/*STY*, *clk2* y *clk3* se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII. Estudio de las secuencias consenso en los sitios de *splicing* 3' y 5' de los genes:

	clk/STY					
	Sitios aceptores			Sitios donadores		
	Intrón	Exón	Encaje	Exón	Intrón	Encaje
Consenso	yyyyy.ccccc.ag	G	14,2 (7,9)	A/CAG	gtaagt	12,6 (8,1)
Exón 1	tctgt.ccgca.cc	A	-18,2	AAG	gtaaga	11,3
Exón 2	tgtct.ttcac.ag	A	7,6	CAG	gtaaga	11,1
Exón 3	tttct.cctct.ag	C	9,7	GGG	gtatga	5,5
Exón 4	tgacg.tgtcc.ag	A	1,6	GAT	gtatag	0,7
Exón 5	cctct.ttttt.ag	A	8,9	AGT	gtaagt	7,0
Exón 6	tttct.taac.ag	G	9,8	TTT	gtaagt	5,8
Exón 7	acgtg.tttat.ag	C	2,3	ACT	gtaagt	7,0
Exón 8	tactt.tctcc.ag	T	8,1	ATG	gtgagc	8,3
Exón 9	tttgc.ttttc.ag	A	9,9	TAG	gttagt	6,9
Exón 10	tttgc.tttgc.ag	C	9,1	CCG	gtaagt	6,5
Exón 11	ttttt.atttc.ag	A	9,8	CAG	gtatgt	9,8
Exón 12	taact.gtttt.ag	G	1,3	AAG	gtaggc	7,6
Exón 13	tttct.gtttc.ag	G	9,3	TGT	ataaag	-10,0

clk2						
	Sitios aceptores			Sitios donadores		
	Intrón	Exón	Encaje	Exón	Intrón	Encaje
Consenso	yyyyy.ccccc.ag	G	14,2 (7,9)	A/CAG	gtaagt	12,6 (8,1)
Exón 1	cgctc.acggc.gg	C	-7,1	ACG	gtgagc	8,2
Exón 2	cttcc.tctcc.ag	A	12,0	AAG	gtaaga	11,3
Exón 3	gttat.ccaac.ag	C	4,6	TCA	gtgagt	5,9
Exón 4	ccccg.acagc.ag	C	3,0	GAT	gtacaa	0,7
Exón 5	ctttc.gtttc.ag	A	9,2	CAG	gtaaca	7,4
Exón 6	attac.cttac.ag	G	7,8	GAA	gtaagc	6,6
Exón 7	gtctc.tcccc.ag	C	9,0	AGT	gtgagt	6,8
Exón 8	tctcc.cctgc.ag	T	10,1	AAG	gtaaga	11,3
Exón 9	ctttg.ttcct.ag	A	8,6	TGG	gtaagg	7,6
Exón 10	tcctc.actac.ag	A	9,7	CAG	gtaaata	9,0
Exón 11	tttgt.ttctc.ag	A	9,6	AAG	gtgact	8,7
Exón 12	cttcc.cctcc.ag	A	12,3	CGG	gtgagc	7,9
Exón 13	gcctt.ccacc.ag	C	5,9	CTG	accccc	-26,2

clk3						
	Sitios aceptores			Sitios donadores		
	Intrón	Exón	Encaje	Exón	Intrón	Encaje
Consenso	yyyyy.ccccc.ag	G	14,2 (7,9)	A/CAG	gtaagt	12,6 (8,1)
Exón 1	gggga.gtggg.gc	C	-37,2	ACG	gtgagt	10,3
Exón 2	cttgt.ggcct.ag	A	2,9	AAG	gtgagt	12,4
Exón 3	ccctc.ttggc.ag	C	7,3	TCG	gtgagt	8,9
Exón 4	cgggtg.catgc.ag	A	3,8	GAT	gtacag	0,5
Exón 5	tcttt.ctcac.ag	A	12,0	CAG	gtgagc	10,1
Exón 6	cctcc.tctat.ag	A	9,7	GTT	gtgagt	5,9
Exón 7	ctttt.tctct.ag	C	10,1	GAT	gtaagt	8,2
Exón 8	tcctt.ctcct.ag	T	7,7	AAG	gtagac	4,1
Exón 9	ccttg.ccttc.ag	A	10,2	TTG	gtgagt	9,0
Exón 10	cttga.cttac.ag	A	8,1	CAG	gtatag	4,9
Exón 11	ggtct.tctgc.ag	A	7,6	CAG	gtaaga	11,1
Exón 12	ttgac.tttcc.ag	G	8,5	AAG	gtcagt	5,9
Exón 13	gtcct.tgagc.ag	A	3,2	TGA	caggtg	-23,7

clk4						
	Sitios aceptores			Sitios donadores		
	Intrón	Exón	Encaje	Exón	Intrón	Encaje
Consenso	yyyyy.ccccc.ag	G	14,2 (7,9)	A/CAG	gtaagt	12,6 (8,1)
Exón 1	gtagg.gtgac.gg	C	-14,4	GAG	gtgagg	9,9
Exón 2	tctcg.ttaac.ag	A	6,8	TTG	gtaaata	5,8
Exón 2a	tctct.ccccc.ag	T	10,3	CAG	gtagag	4,5
Exón 3	atgtg.ttcgc.ag	T	3,4	TCG	gtatga	5,2
Exón 4	ttgcc.gttcc.ag	A	7,1	GAT	gtatag	0,7
Exón 5	ccctt.acttt.ag	A	7,3	CAG	gtaagt	9,0
Exón 6	tttgt.tttca.ag	G	7,0	GAA	gtaagt	6,9
Exón 7	catct.ctttt.ag	C	5,7	AGT	gtaagt	7,1
Exón 8	tttcc.gttgt.ag	T	5,6	AAG	gtaagt	10,6
Exón 9	ttgtg.tctct.ag	A	7,3	TGG	gttagt	4,7
Exón 10	tgttt.tgaat.ag	C	2,3	CAG	gtatgt	9,8
Exón 11	aatgt.ttttt.ag	A	2,5	AAG	gtgggc	7,3
Exón 12	tttct.cttgt.ag	G	10,7	CGG	gtaaag	7,8
Exón 13	cctca.cctct.ag	G	8,7	TGA	ccactt	-21,6

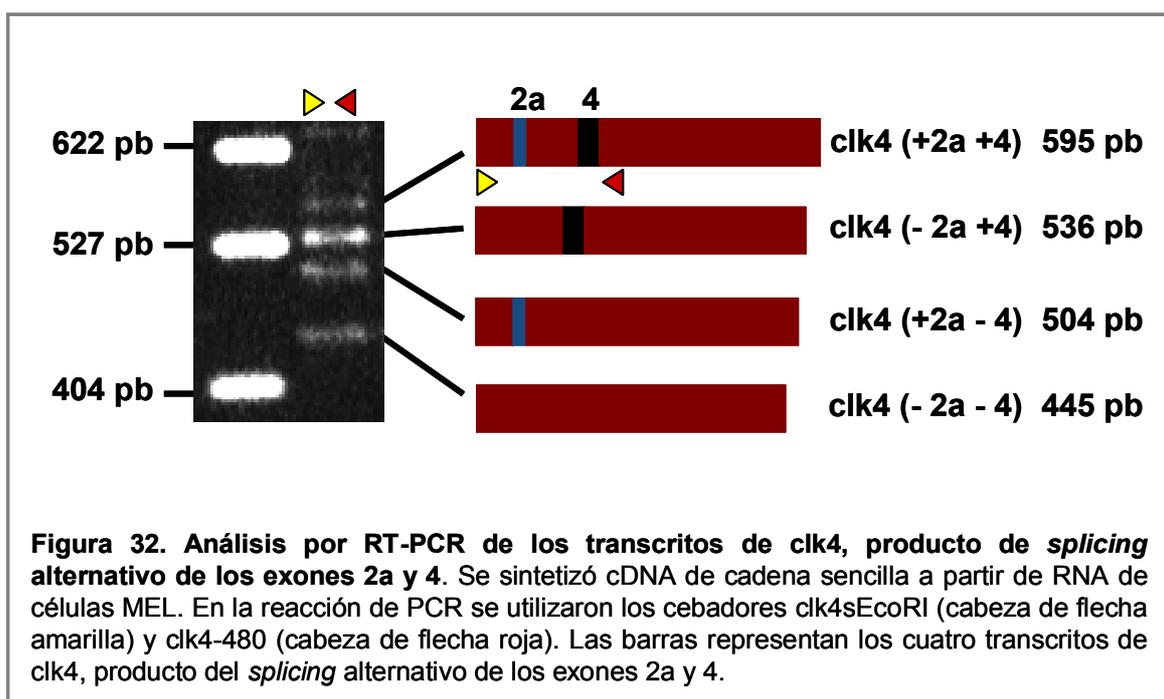
Datos obtenidos al introducir las secuencias aceptoras y donadoras de los intrones y exones de clk/STY, clk2, clk3 y clk4 de ratón en el programa desarrollado por M. Zhang y A. Krainer para la predicción de exones. Las filas marcadas en gris corresponden al exón 4. En clk4 incluimos el exón 2a (marcado en azul) correspondiente al fragmento de 59 pb descrito en el apartado anterior.

Los valores obtenidos para el exón 2a fueron de 10,3 y 4,5, en los sitios 3' y 5', respectivamente. Estos resultados, que se acercan significativamente a los valores consenso, refuerzan la existencia de esta nueva isoforma de clk4.

Por otra parte, los valores obtenidos para el exón 4, especialmente para el sitio donador, son relativamente bajos lo cual indica que se trata de sitios de *splicing* débiles. Esto mismo ocurre con el exón 4 de clk/STY, clk2 y clk3, en estos casos tanto para los sitios donadores como aceptores (Tabla VII). Por último, para todos los clks los sitios aceptores del primer exón y los sitios donadores del último mostraron, como era de esperar, valores negativos ya que carecen de secuencias consenso.

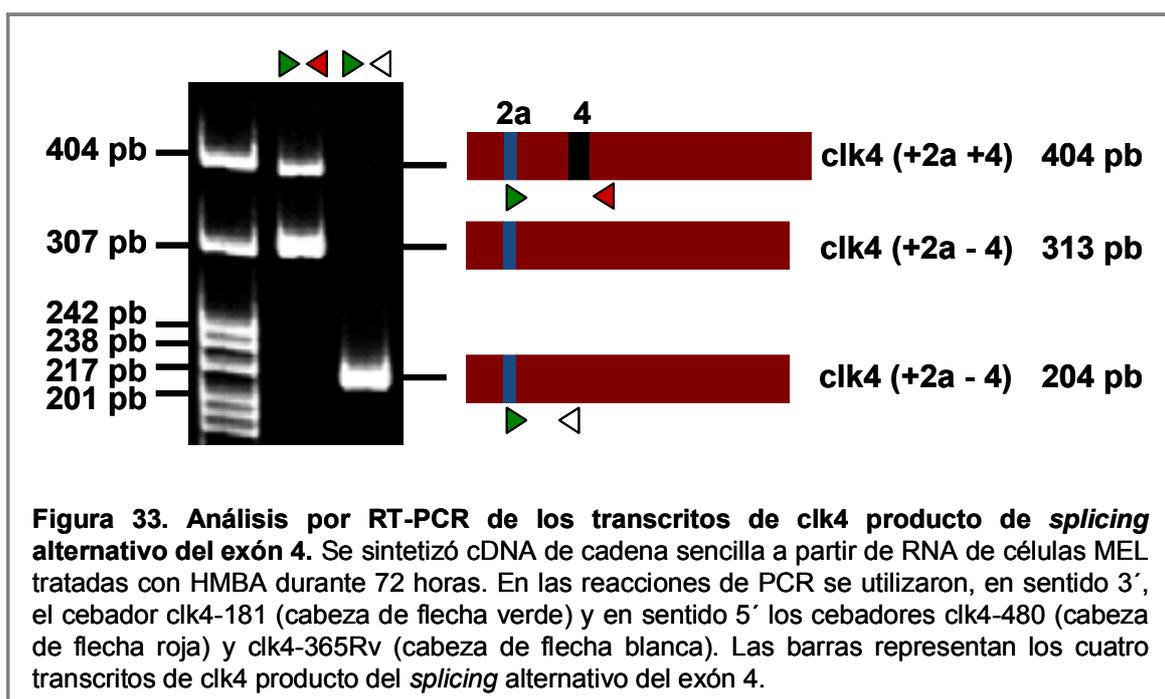
4.5.2. Splicing alternativo del exón 2a de *clk4*.

Las RT-PCR de *clk*/STY, *clk2*, *clk3* y *clk4* permitieron comprobar la presencia de 2 isoformas que incluyen/excluyen el exón 4 como consecuencia del *splicing* alternativo de dicho exón. La presencia de bandas adicionales observadas al amplificar *clk4*, aún en condiciones de máxima astringencia (Figuras 23 y 30), unido a la identificación del exón 2a, según se analizó en el apartado anterior, llevaba a predecir también el *splicing* alternativo del exón 2a. De acuerdo a las predicciones, podrían existir 4 isoformas según incluyeran o excluyeran los exones 2a y 4. En la Figura 32 se muestra un esquema de las 4 isoformas posibles y los resultados de una reacción de RT-PCR que confirman la existencia de las mismas. Cuando se utilizaron los cebadores *clk4sEcoRI* y *clk4-480* que amplifican la zona comprendida entre el codón ATG de iniciación y una zona adyacente al exón 4, se observaron 4 bandas correspondientes a las 4 isoformas posibles (esquema Figura 32).



Para corroborar los resultados anteriores, se llevaron a cabo amplificaciones utilizando como cebadores secuencias que solapan con el exón 2a. Se utilizó en el extremo 5' el cebador *clk4-181* que anilla con una secuencia de 21 pb del exón 2a y en el extremo 3' los cebadores *clk4-365Rv* o *clk4-480* que anillan con una secuencia anterior y posterior al exón 4, respectivamente (Figura 33). En la reacción de PCR

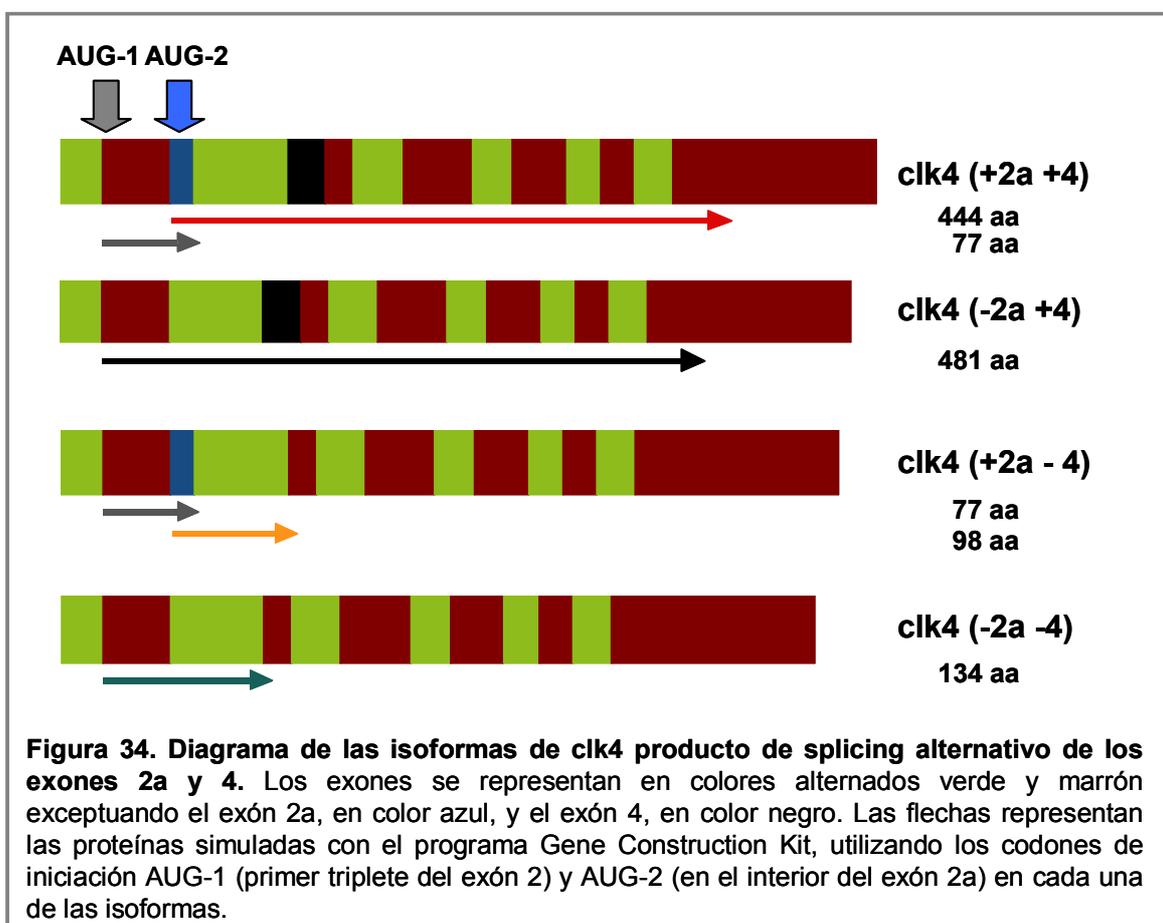
(clk4-181/clk4-480) se observaron 2 bandas cuyo tamaño variaba en 91 pb, el tamaño correspondiente al exón 4. La banda superior corresponde a la isoforma del mRNA de clk4 que contiene los dos exones (2a y 4), mientras que la banda inferior corresponde a la isoforma que sólo incluye el exón 2a. En la reacción de PCR (clk4-181/clk4365Rv) se resolvió una sola banda que corresponde a la única isoforma posible. Estos resultados permitieron corroborar que el mRNA de clk4 sufre *splicing* alternativo de los exones 2a y 4, produciendo cuatro isoformas distintas.



4.5.3. Predicción de los distintos productos derivados de las isoformas de clk4.

El *splicing* alternativo del exón 4 de clk4 da lugar a una proteína activa o a una proteína truncada, según se excluya o incluya dicho exón, fenómeno común a todos los clks. Según se ha comprobado en los apartados anteriores, el exón 2a podría sufrir también *splicing* alternativo (Figura 33). Con el objeto de predecir las posibles proteínas resultantes de las 4 isoformas de clk4 llevamos a cabo un análisis "*in silico*" utilizando el programa *Gene Construction Kit 2* (Figura 34). Según estas predicciones, si sólo estuviera presente el exón 4, la inclusión o exclusión del mismo daría lugar a la proteína clk 4 completa de 481 aa o a la proteína truncada de 134 aa (Figura 35). Si se incluyera el exón 2a se obtendría una proteína de 77 aa, debido al cambio en el marco de lectura que generaría un codón de terminación prematuro. Por lo tanto, siempre que

se incluyera el exón 2a, tanto si estuviera o no incluido el exón 4, se obtendría una proteína truncada. Sin embargo, analizando la secuencia de *clk4* hemos identificado otro posible sitio de iniciación de la traducción (AUG-2) que está ubicado precisamente dentro del exón 2a. En este caso, la inclusión de ambos exones daría lugar a una proteína *clk4* que conservaría el dominio quinasa completo. El dominio N-terminal perdería 55 aa comparado con la isoforma (-2a +4), y ganaría 18 aa codificados en el exón 2a. La inclusión, únicamente, del exón 2a daría lugar en este caso, a una proteína truncada de 98 aa.



Estas 4 isoformas se han descrito a nivel de mRNA (Figura 32) en donde se ha observado la preponderancia de las formas (-2a +4) y (-2a -4). Las isoformas que incluyen el exón 2a, por lo tanto, son minoritarias en células MEL. A nivel de expresión proteica es posible que las proteínas que conservan el dominio quinasa (-2a +4) y (+2a +4) sean viables mientras que las formas truncadas pasarían a ser blanco de alguna ruta de degradación.

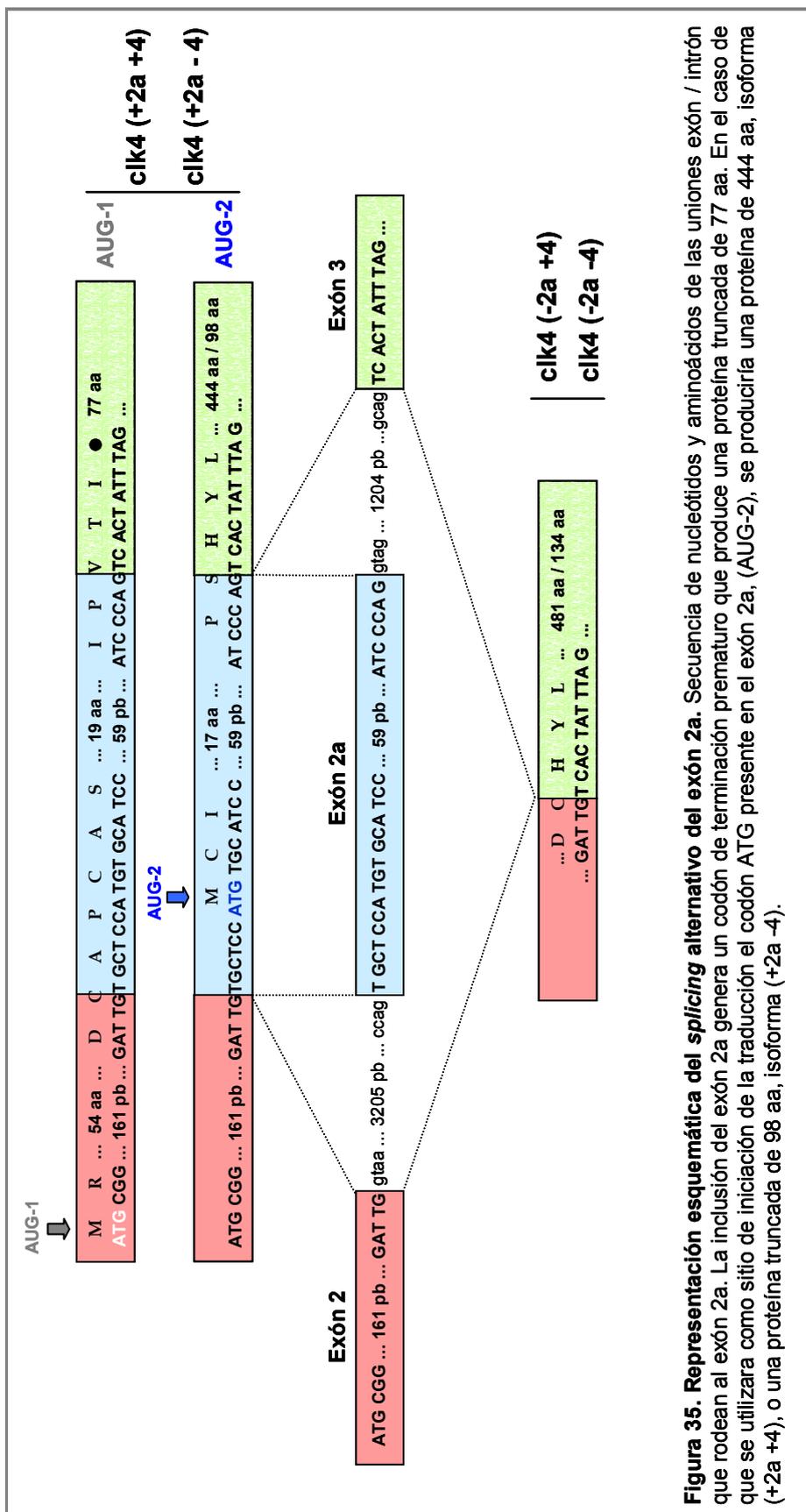
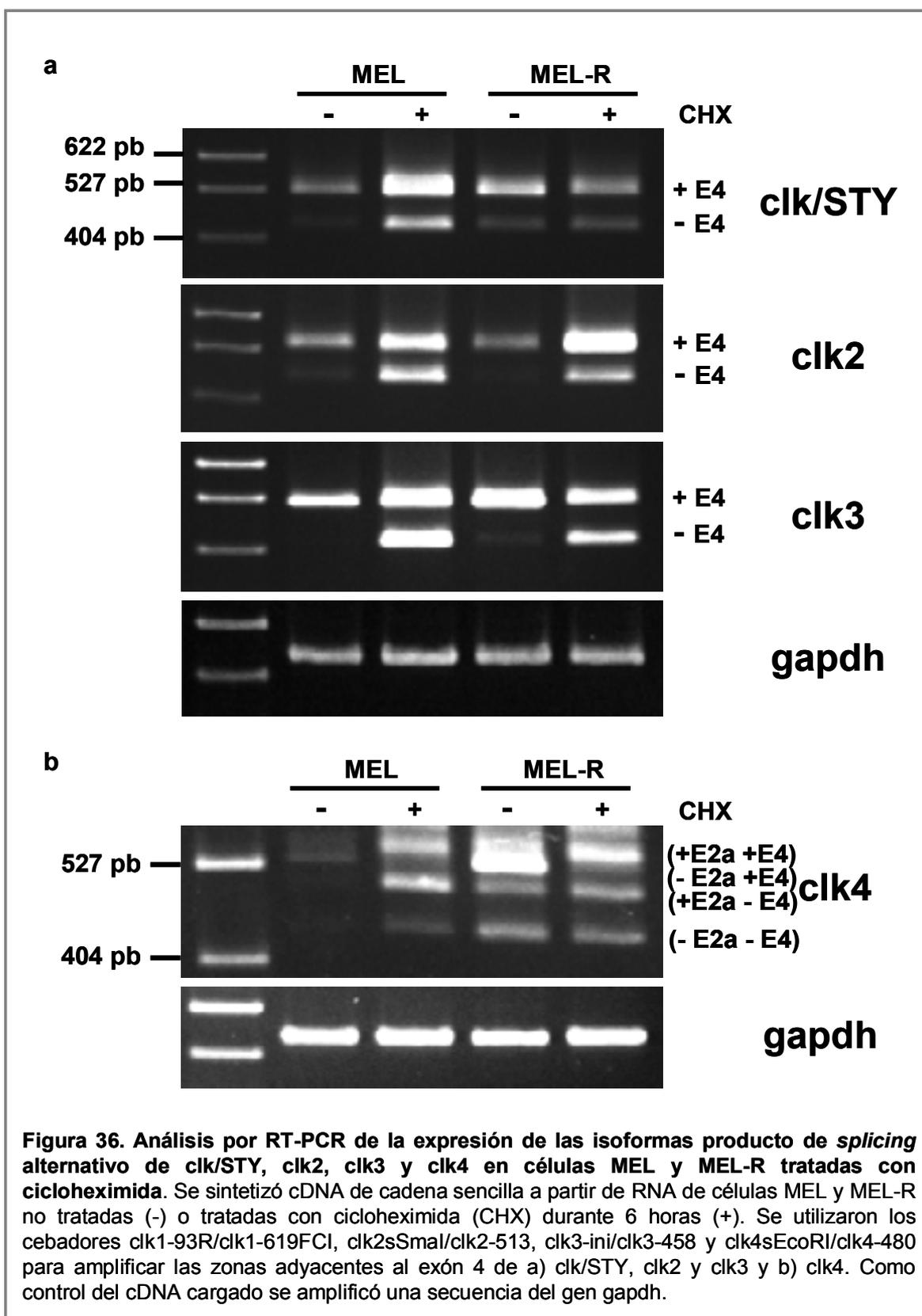


Figura 35. Representación esquemática del *splicing* alternativo del exón 2a. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las uniones exón / intrón que rodean al exón 2a. La inclusión del exón 2a genera un codón de terminación prematuro que produce una proteína truncada de 77 aa. En el caso de que se utilizara como sitio de iniciación de la traducción el codón ATG presente en el exón 2a, (AUG-2), se produciría una proteína de 444 aa, isoforma (+2a +4), o una proteína truncada de 98 aa, isoforma (+2a -4).

4.6. Regulación del *splicing* alternativo del exón 4 de la familia *clk* y del exón 2a de *clk4*.

4.6.1. Análisis de la relación exclusión/inclusión del exón 4 de *clk/STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4* en células MEL y MEL-R tratadas con cicloheximida.

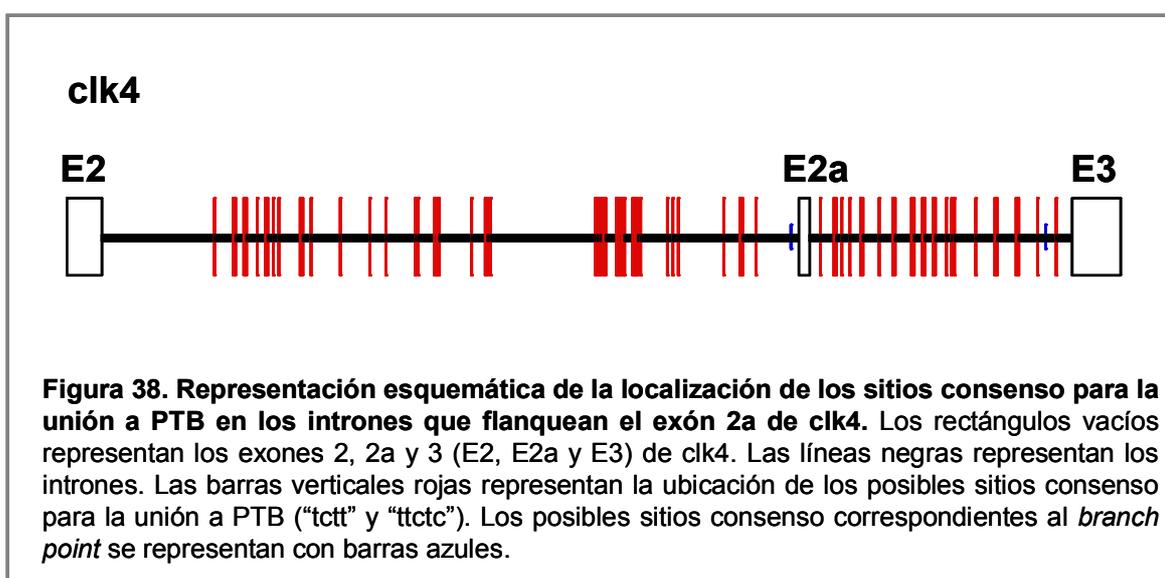
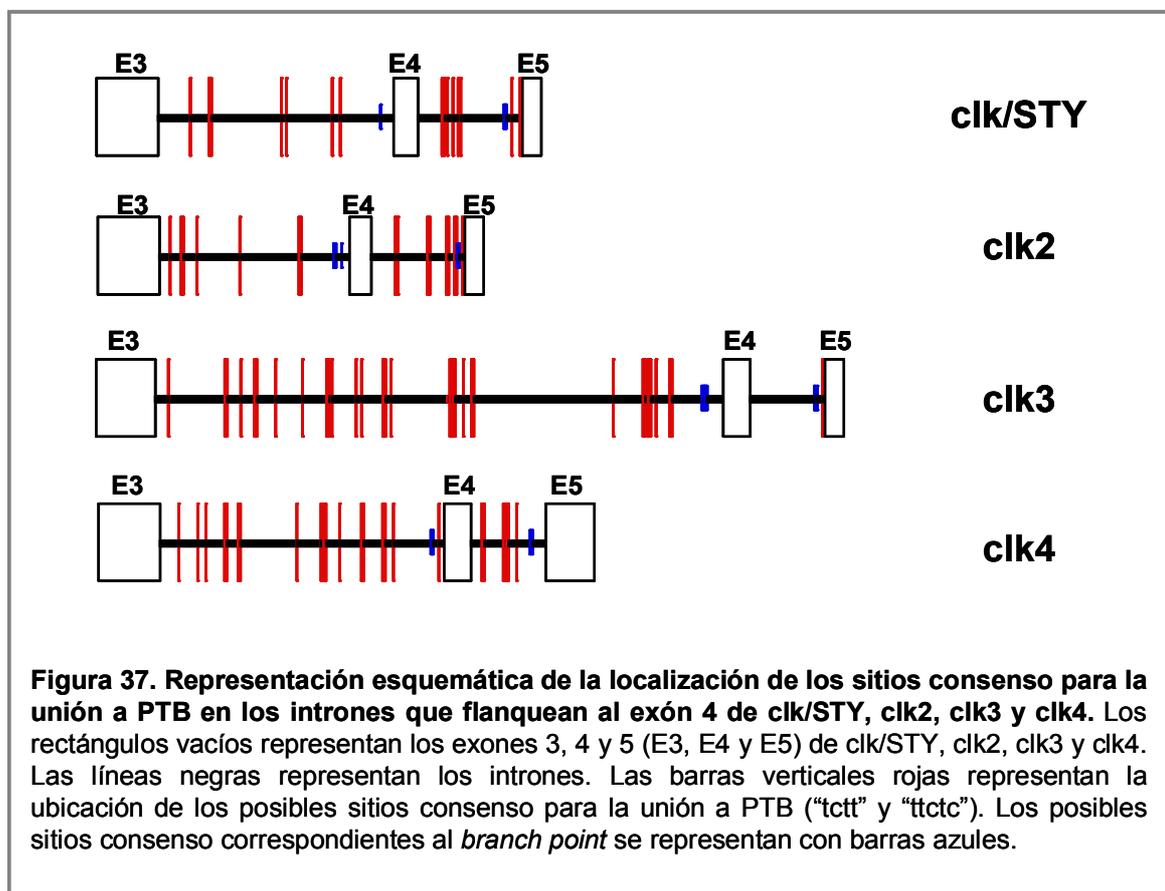
En los apartados anteriores se demostró que *clk/STY* y *clk4* regulan el *splicing* de sus transcritos a lo largo de la diferenciación de células MEL. Recientemente, se observó que *clk/STY* remodelaba su patrón de *splicing* bajo condiciones de *stress* en células PC12 (Menegay et al., 2000). Con el objeto de estudiar si se producía un efecto similar en células MEL se realizaron ensayos de RT-PCR en células MEL y MEL-R tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Como molde de la reacción de PCR se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de RNA de células MEL y MEL-R no tratadas y tratadas durante 6 horas con cicloheximida. En la reacción de PCR se utilizaron cebadores que anillan a secuencias adyacentes al exón 4 (*clk1-93R*, *clk2sSmaI*, *clk3-ini* y *clk4sEcoRI*) en el extremo 5' y (*clk1-619FCI*, *clk2-513*, *clk3-458* y *clk4-480*) en el extremo 3' (Figura 36). No se observaron cambios significativos en la relación de los transcritos que incluyen o excluyen el exón 4 en *clk/STY* y *clk4*, aunque se apreció un incremento de la expresión total, especialmente en células MEL en presencia de cicloheximida. Por el contrario, se observó un aumento considerable de las isoformas que codifican para la proteína truncada en *clk2* y *clk3*. Estos resultados llaman especialmente la atención, ya que tanto en *clk2* como en *clk3*, el transcrito que excluye el exón 4 es minoritario y en ocasiones indetectable (Figuras 23 y 29). Estos resultados ponen en evidencia las diferencias entre *clk2-clk3* y *clk/STY-clk4*, cuya respuesta ante, en este caso, la cicloheximida resulta ser un cambio significativo en los productos del *splicing* alternativo. En general, y esto se aprecia mejor en *clk2* y *clk3*, la cicloheximida estabiliza o potencia los mRNAs que codifican para las proteínas truncadas (Sureau et al., 2001).

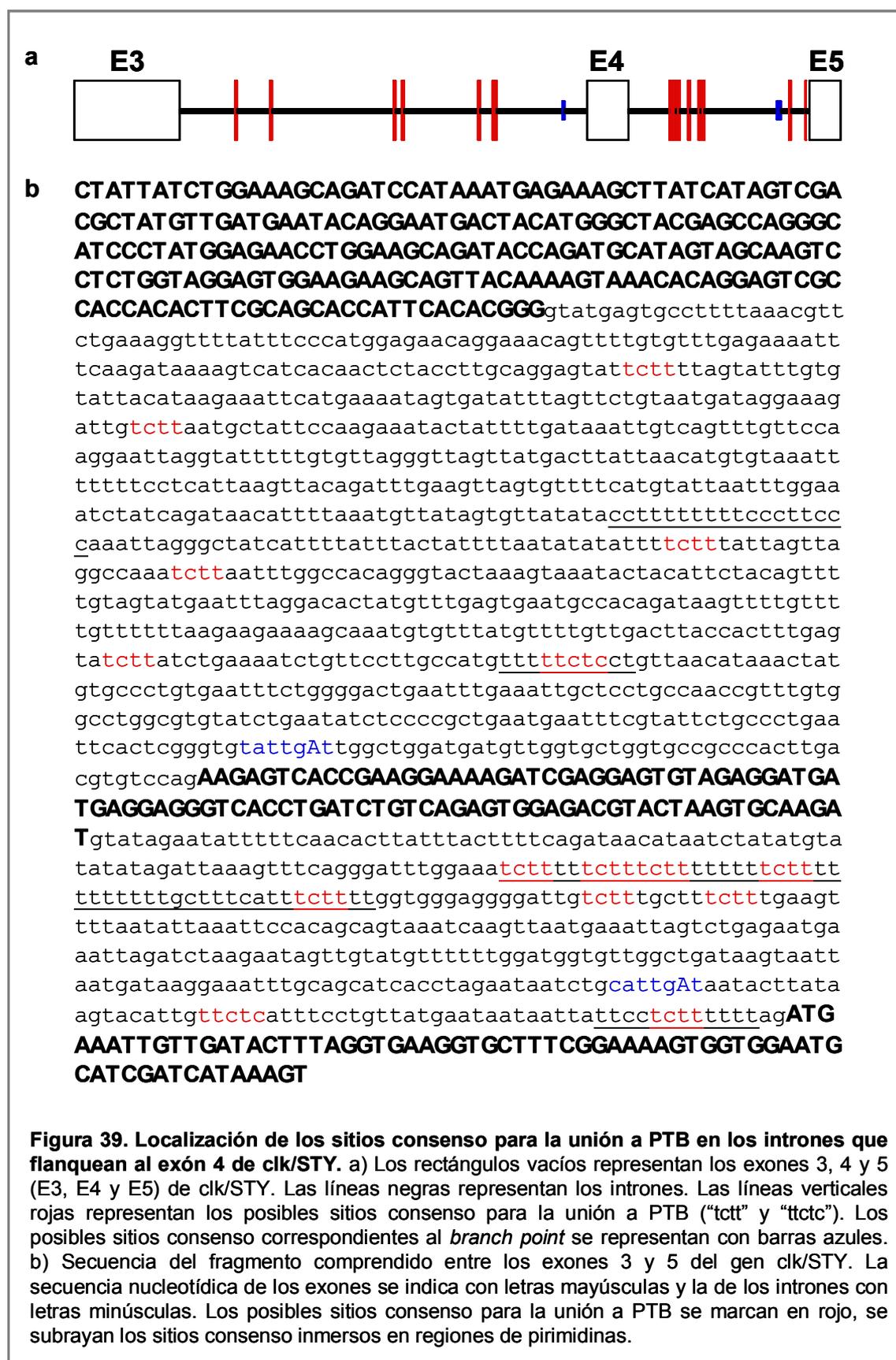


4.6.2. Localización de sitios de unión a la proteína PTB adyacentes al exón 4 de *clk/STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4* y del exón 2a de *clk4*.

Tal como se ha demostrado en numerosas ocasiones, las secuencias consenso en los sitios de *splicing* son imprescindibles, aunque no suficientes, para llevar a cabo de manera eficiente el *splicing* constitutivo y/o alternativo (Smith and Valcarcel, 2000). La información adicional necesaria proviene de un aparente equilibrio entre factores silenciadores (ESS, *exonic splicing silencers*) y factores potenciadores del *splicing* (ESE, *exonic splicing enhancers*) (ver introducción). Entre las proteínas silenciadoras o inhibidoras del *splicing* alternativo se encuentra la proteína PTB que es una de las proteínas mejor reconocidas actualmente por su capacidad de regulación negativa (Valcarcel and Gebauer, 1997). El número de genes cuyo *splicing* alternativo está regulado por PTB es considerable e incluye genes como la β -tropomiosina (Mulligan et al., 1992), GABA γ 2 (Liu et al., 2002), c-src (Chan and Black, 1997), α -actina (Southby et al., 1999), fibronectina (Norton, 1994) y caspasa-2 (Cote et al., 2001), entre otros. Con el objeto de determinar si el exón 4 de las proteínas *clks* y el exón 2a de *clk4* constituían posibles blancos para la acción de PTB llevamos a cabo un análisis "*in silico*" para identificar la presencia de sitios consenso de unión a dicha proteína. En la Figura 37 se representa esquemáticamente, y a escala, la zona genómica comprendida entre los exones 3 y 5 de cada uno de los miembros de la familia *clk* y en la Figura 38 se representa la zona genómica comprendida entre los exones 2 y 3 de *clk4*. Analizando las secuencias, se pudo comprobar que los intrones que flanquean al exón 4 de cada uno de los *clks*, así como los intrones que flanquean al exón 2a de *clk4*, contenían gran cantidad de sitios consenso para la unión a PTB (sitios "tctt" y en menor importancia "ttctc" y "tcttc"). Por otra parte, se observó que en la mayoría de los casos, estos sitios consenso estaban a su vez inmersos en regiones de polipirimidinas, condición que favorece especialmente la unión de PTB (Figura 39). Se pudo comprobar además la presencia de secuencias consenso, que por su composición y ubicación, reunían las características apropiadas para ser tratadas como posibles *branch points*. Estas tres características: la presencia de sitios óptimos para la unión de PTB, que estos sitios estén inmersos en regiones de polipirimidinas y la presencia de un "*branch point*" cercano al sitio aceptor de *splicing*, en conjunto, reflejan un entorno muy favorable para la actuación de PTB.

Estos resultados sugieren, por lo tanto, una posible participación de la proteína PTB en la regulación del *splicing* alternativo del exón 4 de *clk*/STY, *clk2*, *clk3* y *clk4* y del exón 2a de *clk4*.





4.6.3. Localización de sitios de unión a proteínas SR.

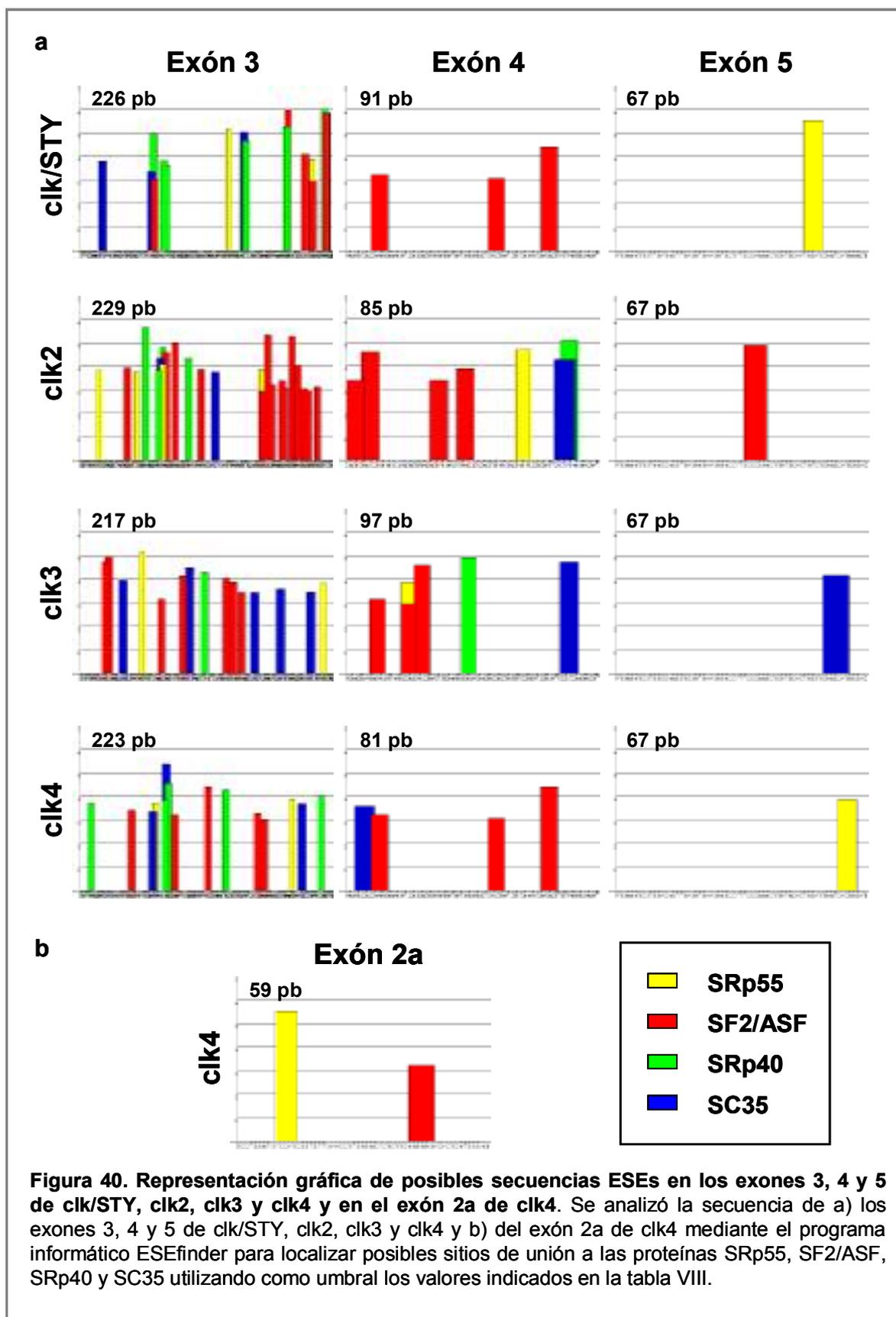
De la misma manera que proteínas como PTB ejercen una regulación negativa sobre el *splicing* alternativo, existen elementos reguladores positivos (ESEs), capaces de interactuar y neutralizar la acción de los primeros (ver revisión (Caceres and Kornblihtt, 2002)). En la mayoría de los casos se trata de proteínas SR cuyos sitios de unión se ubican preferentemente en los exones alternativos y/o constitutivos (Blencowe, 2000). Con el objeto de localizar posibles sitios de unión a proteínas SR que podrían funcionar como potenciadores del *splicing* (ESE) se utilizó la base de datos ESEfinder (<http://exon.cshl.edu/ESE>) desarrollada por Michael Zhang y Adrian Krainer del Cold Spring Harbor Laboratory, Estados Unidos (Cartegni et al., 2003). Se llevó a cabo un análisis de los exones 3, 4 y 5 de *clk*/*STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4* y del exón 2a de *clk4* para identificar posibles sitios de unión a proteínas SR, concretamente a SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55. Se utilizaron valores umbrales, por encima de los cuales el valor de una determinada secuencia es significativo. Con el objeto de establecer condiciones más restrictivas se utilizaron valores superiores a los establecidos por defecto en el programa ESEfinder, (Tabla VIII). Los resultados se representan en la Figura 40.

Tabla VIII. Valores umbral de los motivos ESEs

	Valores umbral	Valores seleccionados
SF2/ASF	1.956	2.956
SC35	2.383	3.383
SRp40	2.670	3.670
SRp55	2.676	3.676

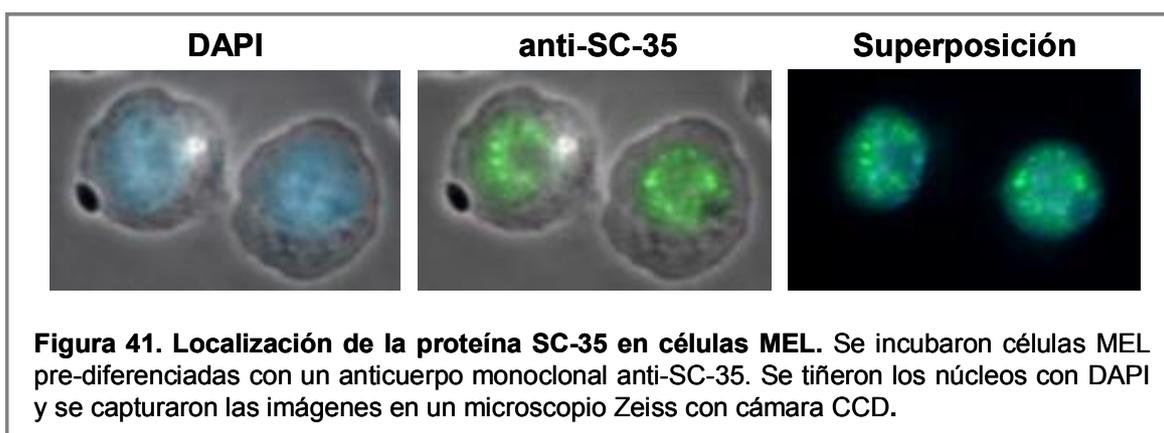
Los resultados obtenidos indicaron un predominio de posibles sitios de unión a proteínas SR en los exones 3 y 4 de todos los *clks*. La presencia de un número mayor de sitios en el exón 3 se debe, probablemente, al mayor tamaño del exón. Se observó, por otra parte, una preponderancia de posibles sitios de unión a la proteína SF2/ASF en el exón 4 de todos los *clks* así como en la región 3' del exón 3 de *clk2*, lo cual indicaría una afinidad especial para esta proteína. Estos resultados, en conjunto,

resaltan la presencia de un número significativo de ESEs en el exón alternativo 4 de todos los clks. Estos datos, sin embargo, son sólo indicativos y es necesario avalarlos con datos experimentales que confirmen la unión de las proteínas SR. No obstante, de confirmarse la unión de las proteínas SR especialmente SF2/ASF, es posible sugerir que éstas podrían competir con potenciales silenciadores como PTB en un equilibrio que, en este caso, resultaría en la exclusión o inclusión del exón 4.



4.7. Localización y distribución de las proteínas SC-35, clk/STY y clk/STY^{tr}.

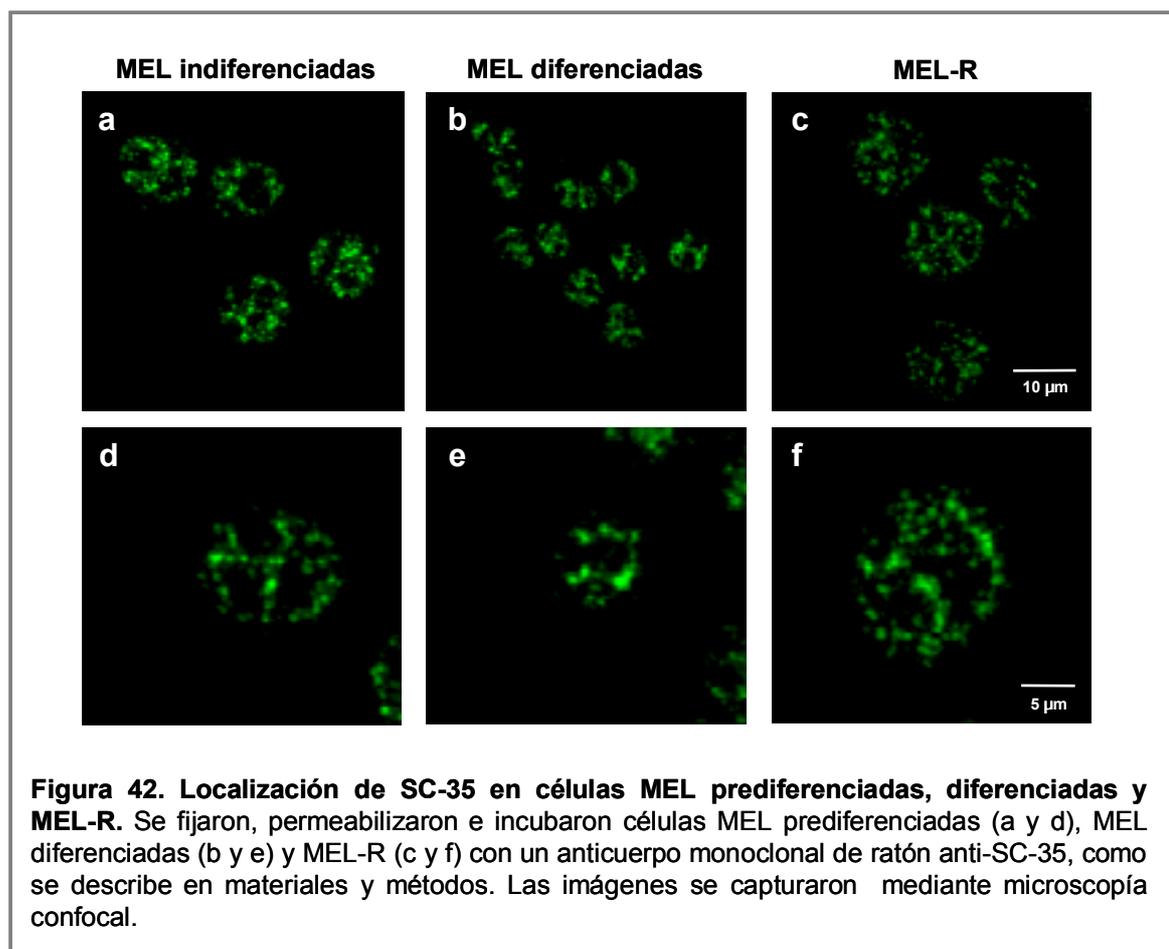
La familia de proteínas clk es capaz de fosforilar proteínas SR y al mismo tiempo, probablemente relacionado con el nivel de fosforilación, modular la localización de las mismas (Colwill et al., 1996b; Duncan et al., 1997; Lai et al., 2003; SaccoBubulya and Spector, 2002). En un estado de hipofosforilación las proteínas SR, y otros componentes de la maquinaria de *splicing*, se concentran en el núcleo en estructuras conocidas como “*speckles*” (Misteli, 2000). Desde aquí, las distintas proteínas pueden ser reclutadas a los sitios transcripcionalmente activos si se produce un cambio en el estado fosforilativo. En estos casos, los *speckles* desaparecen observándose un patrón nuclear difuso. El objetivo de este apartado fue analizar el patrón de localización que presenta clk/STY en células MEL pre-diferenciadas y diferenciadas. Se estudió previamente la localización de una de las proteínas SR que sirven de sustrato a clk/STY, en este caso SC-35, que co-localiza con clk/STY (Colwill et al., 1996a; Dostie et al., 2000; SaccoBubulya and Spector, 2002). Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal anti-SC-35 específico de ratón. En la Figura 41 se observan los resultados de células MEL tratadas con DAPI y anti-SC-35. Se comprobó que SC-35 se localiza exclusivamente en el núcleo celular siguiendo un patrón difuso y homogéneo.

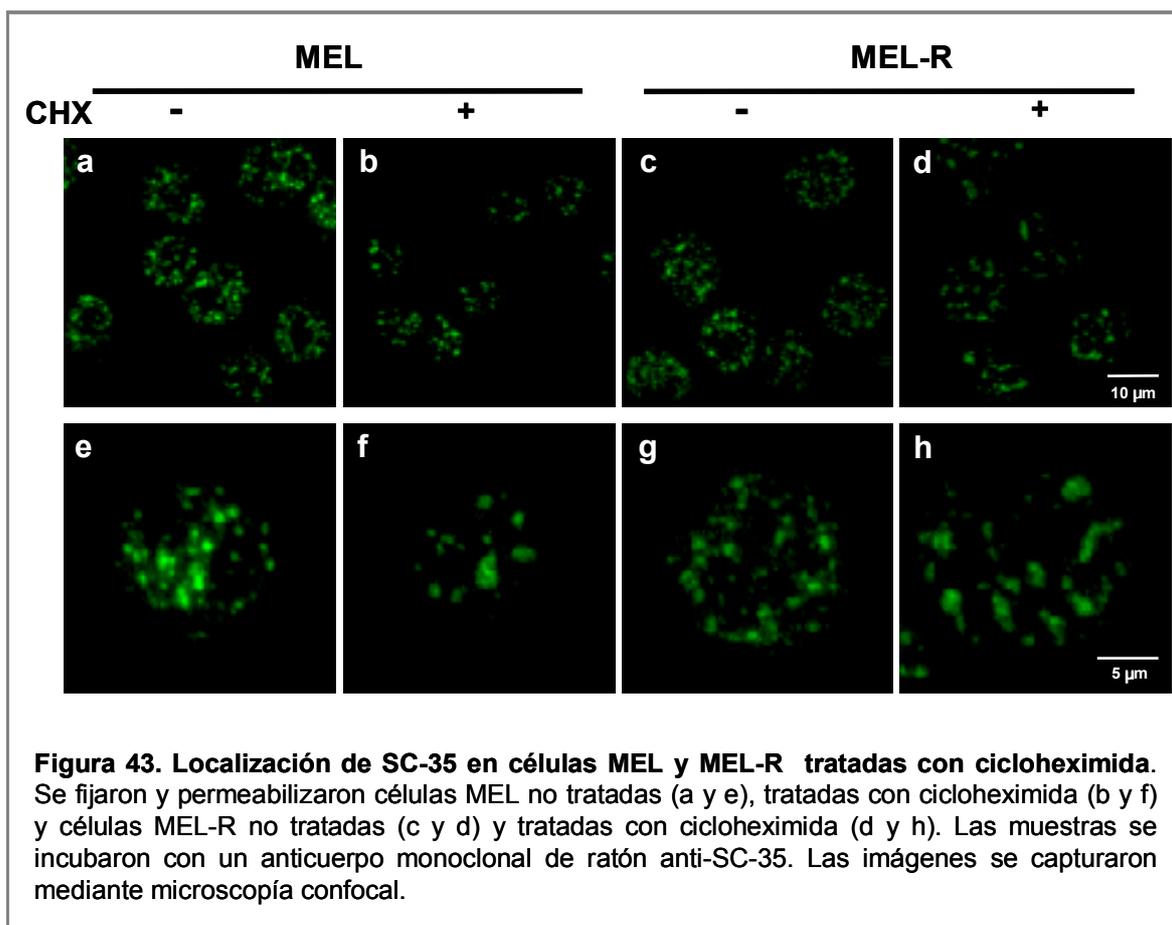


4.7.1. Localización de SC-35 en células MEL y MEL-R.

Se llevó a cabo un estudio comparativo de la localización de SC-35 en células MEL indiferenciadas, diferenciadas y en la línea celular resistente MEL-R (Figura 42).

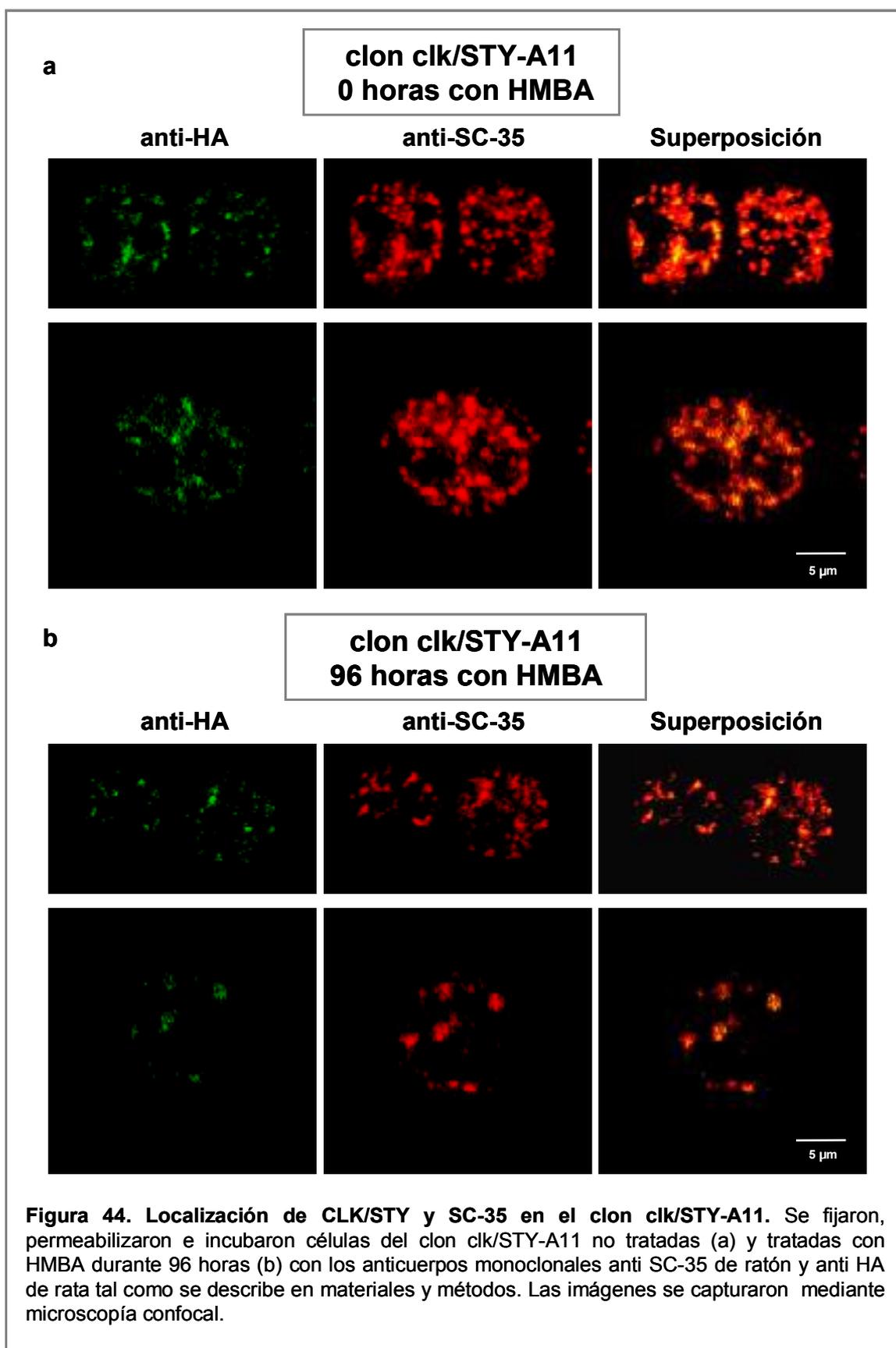
En este caso se utilizó microscopía confocal y el anticuerpo monoclonal anti-SC-35. Se observó que SC-35 se distribuía por todo el núcleo, abarcando zonas de acumulación más o menos densas mezcladas con áreas difusas. Las áreas densas que concuerdan con la definición de los *speckles* son relativamente más abundantes en células MEL diferenciadas (Figuras 42b y e). En estos casos, tanto en cultivos de células MEL como de MEL-R, se observó una localización de SC-35 concentrada en zonas densas, más o menos aisladas (Figuras 32 b, e, c y f) (Dostie et al., 2000; Mintz and Spector, 2000). Como se observó en los ensayos de RT-PCR (Figura 36), el tratamiento con cicloheximida potencia la presencia de la isoforma truncada de clk/STY produciéndose una mayor proporción de SC-35 desfosforilada. Cuando la proteína SC-35 se encuentra hipofosforilada se localiza preferentemente en *speckles* como puede observarse en las imágenes de las Figuras 43b y f en células MEL diferenciadas o 43d y h en MEL-R.





4.7.2. Localización de SC-35 y CLK/STY en transfectantes estables pEBBpurclk/STY.

Con el objeto de estudiar la localización y organización celular de SC-35 y clk/STY en los transfectantes estables pEBBpurclk/STY se realizaron ensayos de inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos monoclonales anti-SC-35 y anti-HA, este último para detectar la proteína de fusión clk/STY-HA. Se llevó a cabo el análisis con el clon clk/STY-A11, previamente analizado a nivel de expresión de mRNA y proteína. (apartados 4.4.1. y 4.4.4.). En la Figura 44 se muestran los resultados de células indiferenciadas (0 horas) y diferenciadas (tratadas con HMBA durante 96 horas). Se comprobó que, tal como sucede con SC-35, la localización de clk/STY es exclusivamente nuclear. En células prediferenciadas, la distribución sigue un patrón difuso mezclado con zonas más o menos densas, excluyendo las zonas nucleolares. Ambas proteínas co-localizan en su mayor parte, tal como se observa cuando se superponen las imágenes.



El patrón observado en células diferenciadas (96 horas) coincide con la definición de *speckles*, observándose de nuevo que ambas proteínas co-localizan.

4.7.3. Localización celular de las proteínas CLK/STY, CLK/STY^{tr} y SC-35 en células MEL DS-19.

Los *speckles* se han descrito como estructuras dinámicas que responden a los niveles de transcripción mediados por la RNA pol II en el núcleo. Las proteínas SR que se almacenan en los *speckles*, son reclutadas a los sitios de transcripción, proceso que a su vez depende del grado de fosforilación de las SR. De esta manera, la actividad quinasa de clk/STY, en este caso, puede inducir la disociación de SC-35 de los *speckles* a los sitios de transcripción (Colwill et al., 1996b; Duncan et al., 1997; SaccoBubulya and Spector, 2002). En este apartado se describen los experimentos que se llevaron a cabo para comprobar la influencia de clk/STY o clk/STY^{tr} sobre la localización de SC-35. Se transfectaron transitoriamente células MEL con los vectores de expresión pEGFP-clk/STY y pEGFP-clk/STY^{tr} que expresaban las proteínas CLK/STY y CLK/STY^{tr} unidas a la proteína EGFP en el extremo N-terminal. Debido a la baja eficiencia de transfección transitoria que se observa en células en suspensión se cuantificó previamente, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células transfectadas que expresaban las proteínas de fusión EGFP-clk/STY y EGFP-clk/STY^{tr} obteniéndose alrededor de 8-30% de células transfectadas. En la Figura 45 se observan algunos ejemplos de los resultados obtenidos. La sobreexpresión de clk/STY provoca una localización difusa de SC-35 así como de la misma clk/STY (Figura 45d y e). Cuando se superponen las imágenes se puede comprobar que ambas proteínas co-localizan. Por otra parte, la sobreexpresión de clk/STY^{tr} induce la localización de ambas proteínas en *speckles*. Estos resultados corroboran los obtenidos previamente en otros laboratorios en células A-431, 293T y COS-1 (Colwill et al., 1996b; Duncan et al., 1997; SaccoBubulya and Spector, 2002) apoyando la relación sugerida entre grado de fosforilación de los factores de *splicing* y localización nuclear. Es interesante señalar que, en este caso, clk/STY^{tr}, a pesar de ser un posible blanco para alguna ruta de degradación, se comporta como una proteína viable, capaz de interactuar e influir sobre SC-35.

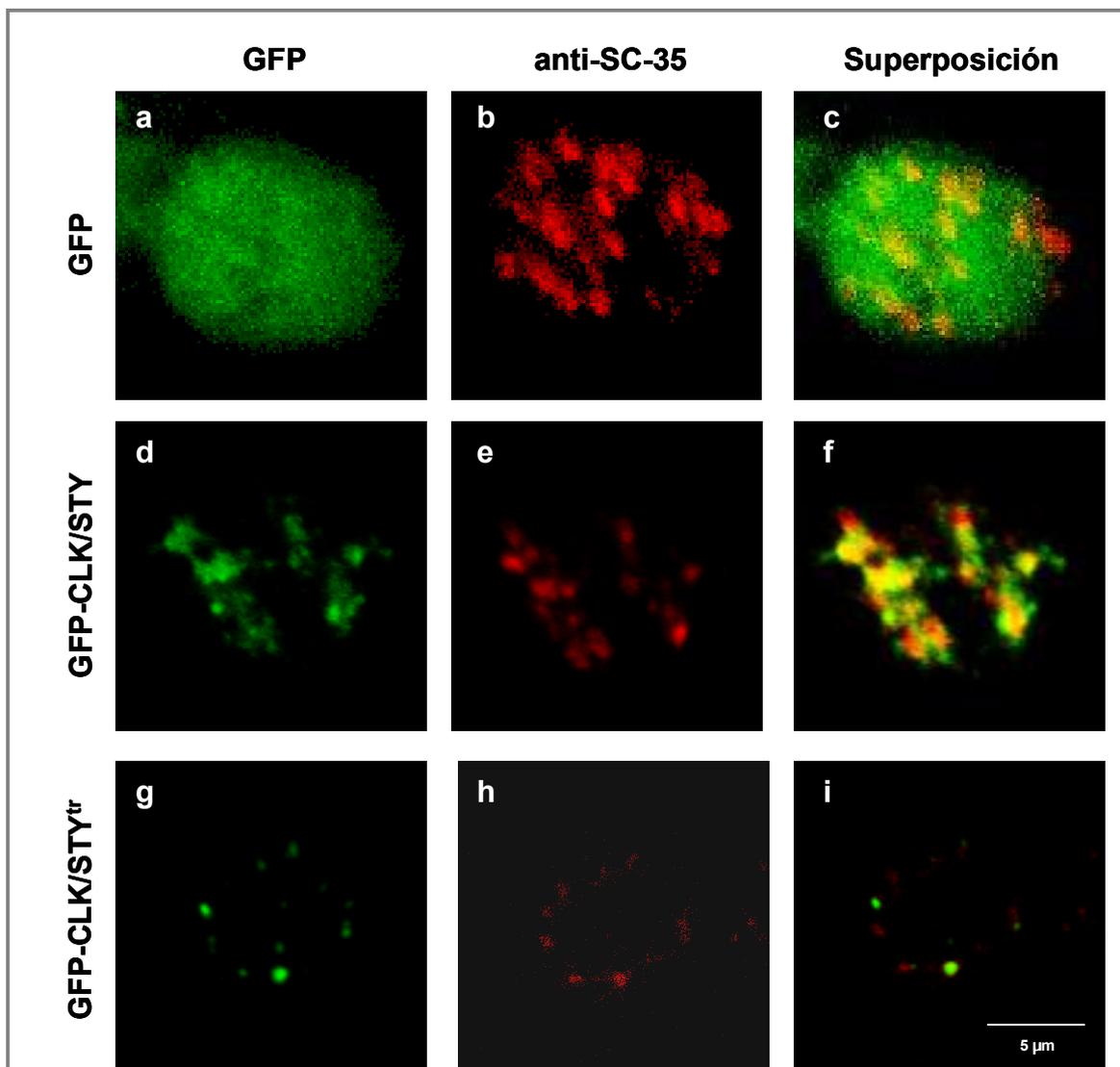


Figura 45. Ensayo por inmunohistoquímica de células MEL transfectadas transitoriamente con los vectores pEGFP-C1, pEGFP-CLK/STY, pEGFP-CLK/STY^{tr}. Se fijaron y permeabilizaron células MEL transfectadas con los vectores pEGFP-C1 (a, b y c), pEGFP-CLK/STY (d, e y f) y pEGFP-CLK/STY^{tr} (g, h y i). Se incubaron las muestras con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SC-35 como se describe en materiales y métodos. Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal.

5. Discusión

5.1. C/STY y la determinación eritropoyética.

La caracterización de genes involucrados en la determinación del estado diferenciado ha sido objeto de numerosos estudios. Desde finales de los años 80, cuando Harold Weintraub y colaboradores identificaron el gen Myo D como un “gen maestro” (“*master gene*”) capaz de regular la expresión de genes específicos del tejido muscular (Weintraub et al., 1991), varios fueron los intentos encaminados a identificar los “genes maestros” de otros linajes celulares. Sin embargo, los resultados obtenidos parecían indicar que la determinación celular era un proceso complejo cuya regulación implicaba mucho más que un único gen regulador. Actualmente, se cree que la determinación viene dada por la acción combinada de algunos factores de transcripción específicos así como de éstos y varios factores constitutivos que, en un fino equilibrio cuantitativo, dan lugar a uno u otro linaje celular (Cantor et al., 2002; Cantor and Orkin, 2002; Shivdasani and Orkin, 1996). Un ejemplo en este sentido lo constituye la exquisita proporción que debe existir entre los factores hematopoyéticos GATA y PU.1 para determinar la diferenciación eritroide o mieloide (Rekhtman et al., 2003; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 2000).

La determinación celular no obstante, parece no acabar en este equilibrio. La secuenciación del genoma humano puso en evidencia que el número de genes contabilizado, mucho menor al esperado, no concordaba con la gran variedad proteica demostrada, ineludible por otro lado, para lograr la complejidad de un organismo superior (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Estos datos resaltaron la importancia del *splicing* alternativo que llevan a cabo un gran número de genes y que generan un mecanismo de expansión génica a partir de un único producto. De hecho, hoy se cree que más del 60% de los genes humanos experimentan un *splicing* alternativo cuyo resultado consiste en diferentes isoformas que se expresan en momentos determinados del desarrollo o en distintos linajes celulares (Lewis et al., 2003). Esto ha llevado a sugerir que el *splicing* alternativo constituye, en definitiva, un nivel de regulación de la expresión génica.

En la presente tesis doctoral hemos intentado abordar algunos de los aspectos de la diferenciación celular utilizando como modelo la diferenciación eritroide de las células MEL. Durante la búsqueda de genes reguladores, positivos o negativos, que intervienen directa o indirectamente en el proceso de diferenciación hemos identificado

y caracterizado el gen que codifica para la proteína quinasa clk/STY. La proteína clk/STY ha sido involucrada en el *splicing* del mRNA a través de su capacidad de fosforilar las proteínas SR. A lo largo de la diferenciación clk/STY se expresa a través de dos transcritos, uno que da lugar a una proteína catalíticamente activa y otro a una forma truncada. Nuestros experimentos demostraron que la forma activa predomina en células prediferenciadas y que, a medida que las células se diferencian, se produce un cambio de tendencia y es finalmente la forma truncada la mayoritaria (Figuras 17 y 23).

5.2. Cambios en la expresión de clk/STY.

Nuestros resultados iniciales indicaron que clk/STY se activa a lo largo de la diferenciación. Los estudios en *Northern blot* dejaron claro que la activación culmina en una máxima expresión a los 5-6 días de tratamiento con el agente inductor. De los dos transcritos detectados (Figuras 11 y 12) el de 3,2 Kb coincidía con el transcrito inmaduro observado por Duncan y colaboradores (Duncan et al., 1995). La presencia de transcritos inmaduros, que generalmente tienen una vida media muy corta, sigue siendo una incógnita, aunque se ha sugerido que podría estar relacionado con cantidades limitantes de factores de *splicing* (Scott et al., 1990). La banda correspondiente al transcrito de 1,8 Kb que en *Northern blot* presentaba una apariencia difusa, estaba compuesta en realidad por dos transcritos de 1,8 y 1,7 Kb, respectivamente, tal como se comprobó mediante los experimentos de RT-PCR (Figuras 17 y 23). La activación de clk/STY a lo largo de la diferenciación de células MEL es un hecho novedoso y llamativo, en tanto que una gran proporción de genes tiende a inactivarse en las etapas más tardías debido a una salida del ciclo celular (Hsieh et al., 2000; Matushansky et al., 2000; Zhu and Skoultchi, 2001) y a una inactivación general que caracteriza al fenotipo eritroide maduro (Orkin, 1995; Richon et al., 1989; Vanegas et al., 1997; Vanegas et al., 2003; Yamada et al., 1997). La activación de una proteína quinasa como clk/STY durante las etapas tardías de la diferenciación, cuando la tendencia es a la inactivación de una gran parte del proteoma, sugiere que la misma podría cumplir un papel relevante durante la diferenciación.

Por otro lado, tal vez lo más importante de estos resultados no sea la expresión total de clk/STY, sino la proporción de los transcritos 1,8 y 1,7 Kb observada en cada momento. Mientras que la isoforma catalíticamente activa es la mayoritaria en células

prediferenciadas y durante las primeras etapas de la diferenciación, se observa un marcado cambio de tendencia al final de la misma. Durante estas etapas, aunque coexisten ambas isoformas, siempre predomina el transcrito de 1,7 Kb (Figuras 17 y 23). Estos resultados podrían deberse en parte a una reacción como respuesta al agente inductor. Balduc y colaboradores demostraron que el DMSO afecta a la selección de los sitios de *splicing* en extractos nucleares de células HeLa (Balduc et al., 2001). Los autores sugieren que el DMSO favorece las interacciones iónicas entre factores de *splicing* que contienen dominios RS y, como consecuencia, se produce una mayor activación de las proteínas SR. En nuestro caso, la selección de los sitios de *splicing* de *clk/STY* no parece estar influido por la acción del HMBA. Los resultados obtenidos con la línea MEL-R apoyan esta hipótesis (Figura 36). Utilizando cultivos de células MEL-R incapaces de diferenciarse en presencia de HMBA, no se observaron modificaciones en el patrón de *splicing* del exón 4 con respecto a la línea parental, lo cual indica que el aumento de la exclusión del exón 4 al final de la diferenciación no se debe al efecto directo del HMBA. Por lo tanto, podemos concluir que el cambio de tendencia hacia la isoforma truncada no se debe a la acción del agente inductor sino a un proceso de autorregulación de *clk/STY* que se desencadena durante la diferenciación.

En el año 1997, Duncan y colaboradores propusieron que *clk/STY* llevaba a cabo la regulación de su propio *splicing* alternativo (Duncan et al., 1997). Estos autores demostraron que la sobreexpresión de la forma truncada de *clk/STY* promueve la inclusión del exón 4 mientras que la sobreexpresión de la forma catalíticamente activa favorece la exclusión del exón. Por otro lado, Prasad y colaboradores observaron que *clk/STY* modula directamente la actividad de las proteínas SR, especialmente ASF/SF2 y SC-35 (Prasad et al., 1999). Estos autores demostraron además que tanto la hipofosforilación como la hiperfosforilación provocada por *clk/STY* eran capaces de reprimir el *splicing* constitutivo y alterar la selección de sitios en el *splicing* alternativo. Todos estos resultados indican la existencia de un delicado equilibrio que se ejerce a través de la fosforilación de las proteínas SR y que involucra también una autorregulación de *clk/STY*. Nuestros resultados con los transfectantes de *clk/STY* podrían estar relacionados con esta autorregulación.

Los experimentos realizados con transfectantes estables de *clk/STY* tenían como objetivo, entre otros, neutralizar la expresión de la isoforma truncada mediante

una alta expresión exógena del transcrito que incluye el exón 4. A pesar de que obtuvimos varios clones en donde la sobreexpresión del transcrito de 1,8 Kb superó varias veces al de la línea parental (Figura 28), cuando los clones eran inducidos a diferenciarse se reestablecía el equilibrio entre las formas completa y truncada y, finalmente, el resultado era similar al de las células no transfectadas. Estos datos demuestran que la expresión exógena de la isoforma catalíticamente activa es capaz de disparar la inclusión del exón 4 en células MEL no tratadas, aunque, durante el proceso de diferenciación eritropoyética, se genera una presión que favorece la expresión de la isoforma truncada. Los resultados obtenidos validarían la idea de una regulación competitiva entre ambas isoformas (Duncan et al., 1997).

Por otra parte, observamos que la sobreexpresión de clk/STY afecta la relación entre las isoformas truncada y completa de clk2 y clk3. Además de su propio *splicing* alternativo y del de las proteínas SR, se ha demostrado que las proteínas clks son capaces de regular el *splicing* alternativo de otras proteínas como Tau, tra2-beta1 y el gen de adenovirus E1A (Duncan et al., 1997; Duncan et al., 1998; Hartmann et al., 2001; Stoilov et al., 2004). Katsu y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de la proteína clk4 catalíticamente activa favorecía la exclusión del exón 4 de clk/STY (Katsu et al., 2002). En el presente trabajo, comprobamos mediante transfectantes estables, que clk/STY es capaz de regular el *splicing* alternativo de dos miembros de su propia familia, clk2 y clk3. Como se observa en la Figura 29, la sobreexpresión de clk/STY favorece la exclusión del exón 4 de clk2 y clk3 específicamente en células pre-diferenciadas. Estos datos sugieren que clk/STY podrían regular el *splicing* alternativo de los miembros de su propia familia.

5.3. Clk/STY^{tr} : ser o no ser.

A pesar de los esfuerzos reiterados por obtener clones que sobreexpresaran clk/STY^{tr}, los resultados fueron siempre negativos (Tabla IV y Figura 27). A nivel de mRNA, sin embargo, comprobamos que los transfectantes seleccionados en puromicina expresaban generosamente el mRNA que debería codificar para la proteína inactiva (Figura 27). La ausencia de proteína clk/STY^{tr}, por lo tanto, podría deberse a una alta inestabilidad de la misma o a que simplemente no se producía. La exclusión del exón 4 durante el *splicing* alternativo de clk/STY provoca un cambio en el marco de

lectura lo que ocasiona un codón de terminación prematuro cuya traducción daría lugar a una proteína truncada (Figura 26 y Tabla III) (Duncan et al., 1995). Los mRNAs que incluyen codones de terminación prematuros en su mayoría, son blanco del NMD o "*Nonsense Mediated Decay*" (Wagner and Lykke-Andersen, 2002). Este mecanismo de degradación contribuye a la fidelidad de la expresión génica previniendo la traducción de proteínas truncadas, posibles productos de un *splicing* aberrante o de la transcripción de genes que contienen mutaciones deletéreas (Baker and Parker, 2004). Sin embargo, son cada vez más numerosos los estudios que indican que además de eliminar transcritos aberrantes, el NMD es un regulador potencial de la expresión génica. Se ha determinado que del 60% de los genes humanos que presentan *splicing* alternativo el 35% contienen codones de terminación prematuros y son candidatos potenciales del NMD (Lewis et al., 2003). Estos datos apoyan la idea de una regulación transcripcional ejercida por transcritos con codones de terminación prematuros, como antagonistas naturales de los transcritos completos.

Tal como se había determinado previamente y se confirmó en la presente tesis, la exclusión del exón 4 de *clk*/*STY* genera un codón de terminación prematuro (Duncan et al., 1995). Un proceso similar ocurre cuando se excluye el exón 4 de *clk2*, *clk3* y *clk4* (Figura 26 y Tabla III). Actualmente, se conocen varios genes de la maquinaria de *splicing* que regulan su expresión mediante isoformas con codones de terminación prematuros que son degradadas por el NMD: *SC-35*, *PTB*, *U2AF1*, *TIA-1*, *TIAR*, *Srp20*, *ADAR2* y *hnRNPA1* (Blanchette and Chabot, 1999; Jumaa and Nielsen, 1997; Le Guiner et al., 2001; Rueter et al., 1999; Sureau et al., 2001; Wollerton et al., 2004). La maquinaria del NMD implica la activación de diversas proteínas entre las que destaca *Upf1*, una helicasa del RNA que al ser inhibida repercute en la efectividad del NMD. Wollerton y colaboradores utilizando RNA interferente contra *Upf1*, observaron un incremento en la estabilidad de la isoforma truncada de la proteína *PTB* lo cual les permitió establecer que *PTB^{tr}* era un sustrato para NMD (Wollerton et al., 2004). Utilizando una estrategia similar, Pacheco y colaboradores observaron la estabilización de la proteína *U2AF^{35c}* en células HeLa (Pacheco et al., 2004). En nuestro caso, observamos que la inhibición de la síntesis de proteínas con cicloheximida en MEL y MEL-R provoca una alteración en la relación de los transcritos 1,8/1,7 en *clk*/*STY*, *clk2* y *clk3* (Figura 36). Menegay y colaboradores obtuvieron resultados similares para *clk*/*STY* en células PC12 (Menegay et al., 2000). Asimismo, Pacheco y colaboradores,

observaron que la isoforma U2AF^{35c}, potencial blanco del NMD, aumentaba después de un tratamiento con cicloheximida (Pacheco et al., 2004). El tratamiento con cicloheximida afecta al proceso de traducción y esto incluye a las proteínas que componen la maquinaria del NMD. Recientemente, se ha demostrado que es necesaria una ronda pionera de traducción para disparar el mecanismo de degradación por NMD y por lo tanto, la inhibición de la traducción anula el potencial de degradación del NMD (Maquat, 2004).

Nuestros resultados, unidos a los datos que existen en la literatura, sugieren por lo tanto, que la proteína clk/STY^{tr} es potencial blanco del NMD y, en consecuencia, su viabilidad es escasa. En la misma línea argumental, Menegay y colaboradores utilizando un anticuerpo policlonal contra el dominio N-terminal de clk/STY en lisados de células PC12 sólo fueron capaces de detectar la proteína completa (Menegay et al., 2000). Existen datos, sin embargo, que parecen contradecir los anteriores resultados. La detección de clk/STY^{tr} fue posible en ocasiones, aunque en estos casos se utilizaron vectores de expresión que contenían el cDNA de clk fusionado a seis repeticiones del epitopo Myc, lo cual producía un aumento del peso molecular de la proteína de fusión en aproximadamente 10 KDa (Duncan et al., 1995; Duncan et al., 1997; Duncan et al., 1998). De la misma forma, cuando fusionamos clk/STY^{tr} a la proteína GFP fue posible la visualización de la proteína truncada (Figura 45). En todos estos casos, es probable que la utilización de proteínas de fusión provoque la estabilización de clk/STY^{tr} evitando así la entrada a la ruta de degradación.

En conjunto, estos resultados sugieren que la autorregulación de clk/STY incluye la producción de un transcrito destinado a ser degradado por el NMD que al mismo tiempo compite con el transcrito que codifica para la proteína funcional. Clk/STY, por lo tanto, (y probablemente clk2, clk3 y clk4), junto al número creciente de proteínas pertenecientes a la maquinaria de *splicing*, podría utilizar el *splicing* alternativo unido al NMD como un mecanismo universal de regulación de la expresión génica (Maquat, 2004; Wollerton et al., 2004).

5.4. Regulación del *splicing* alternativo del exón 4.

La regulación del *splicing* alternativo, o lo que es lo mismo, la decisión de incluir o excluir un exón alternativo, se ve influida por la acción de agentes reguladores

positivos y negativos. Se han descrito secuencias conservadas en intrones y exones que actúan como silenciadores o potenciadores del *splicing* (Figura 4). Asimismo, se han identificado proteínas capaces de unirse a estas secuencias, que actúan en *trans* activando o inhibiendo el *splicing* alternativo (Cartegni et al., 2002; Smith and Valcarcel, 2000). Como se ha sugerido en los apartados anteriores, el exón 4 de *clk*/*STY* y probablemente de los otros *clks*, regula su inclusión/exclusión a lo largo de la diferenciación eritropoyética. La identificación de elementos reguladores del *splicing* alternativo del exón 4 podría añadir datos importantes acerca de cómo se lleva a cabo dicha regulación.

Una de las proteínas que aparentemente actúa como silenciadora del *splicing* es la proteína PTB (*Polypyrimidine Tract Binding protein*). Mediante ensayos con RNA interferente se ha demostrado que PTB es capaz de reprimir el *splicing* “*in vivo*” del exón IIIb del gen *FGF-R2* (Wagner and Garcia-Blanco, 2002). Estudios similares utilizando mutantes dominantes negativos demostraron que PTB favorecía la exclusión del exón 5 del gen *cTNT* “*in vivo*” (Charlet et al., 2002). Se han descrito las secuencias de unión de la proteína PTB, altamente conservadas, en los genes de la α y β tropomiosina, *CT/CGRP*, α -*TM*, β -*TM*, *CLCB*, *NMDA*, la fibronectina, *tau*, *CASP-2*, receptor *GABA_A γ 2*, *IgM*, *c-src*, α -actinina, *FGFR-1* y *-2* y *cTNT* (revisado en (Wagner and Garcia-Blanco, 2001)). En todos estos ejemplos, la presencia abundante de sitios consenso para la unión de la proteína PTB en los intrones adyacentes de un exón alternativo, determina su capacidad silenciadora. En nuestro caso, la identificación de numerosos sitios “tctt”, consenso para la unión de PTB, en los intrones que flanquean el exón 4 en *clk*/*STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4* sugiere la intervención de PTB en la exclusión del exón alternativo (Figuras 37, 38 y 39). La localización de estas secuencias en regiones de polipirimidinas en reiteradas ocasiones, así como la presencia de un posible “*branch point*” en la posición adecuada, refuerzan esta hipótesis.

Por otra parte, se han descrito secuencias intrónicas y exónicas capaces de inhibir o activar el *splicing* alternativo. Entre los reguladores positivos, las secuencias ESEs (*Exon Splicing Enhancers*) son particularmente relevantes (Caceres and Kornblihtt, 2002). Se ha demostrado que las proteínas SR asociadas a las secuencias ESEs promueven la inclusión de un exón reclutando la maquinaria de *splicing* a través de los dominios RS y/o antagonizando la acción de elementos silenciadores (Cartegni et al., 2002). Haciendo uso del programa ESEfinder desarrollado por Michael Zhang y

Adrian Krainer (Cartegni et al., 2003) detectamos sitios potenciales para la unión de proteínas SR en el exón 4 de *clk*/STY, *clk2*, *clk3* y *clk4*, con una mayor preponderancia de sitios específicos de unión de la proteína SF2/ASF (Figura 40).

La existencia, alrededor de un mismo exón, de elementos potenciadores y silenciadores del *splicing* alternativo hace suponer que la expresión de estos elementos reguladores tiene que estar altamente controlada. Se ha sugerido que los niveles de expresión de los elementos reguladores del *splicing* alternativo podría ser el mecanismo utilizado para regular la expresión génica en los procesos de desarrollo y diferenciación celular (Sanford et al., 2004). Un ejemplo significativo de regulación del *splicing* alternativo lo protagonizan las proteínas SF2/ASF y hnRNP A1 que compiten en la unión al pre-mRNA. Cáceres y colaboradores observaron que el aumento de expresión de la proteína SF2/ASF activa la selección del sitio de *splicing* 5' proximal de genes reporteros cotransfectados en células HeLa. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína hnRNP A1 activa la selección del sitio de *splicing* 5' distal (Caceres et al., 1994). La predicción que podemos sugerir para nuestro modelo podría indicar que en células MEL prediferenciadas el balance entre los factores de *splicing* se inclina hacia los efectos potenciadores de las proteínas SR, favoreciendo la inclusión del exón 4 de *clk*/STY. A lo largo de la diferenciación aumentaría la influencia de la proteína PTB que provocaría la exclusión del exón 4 y favorecería la expresión de la isoforma truncada.

5.5. Una nueva isoforma de *clk4*.

En el presente trabajo hemos identificado una posible nueva isoforma de la proteína *clk4* que incluye un exón adicional descrito como exón 2a. Los criterios que hemos utilizado para definir la secuencia de 59 pb como un exón adicional se basan en los distintos consensos que se derivan de estudios bioinformáticos (Buratti et al., 2001; Cartegni et al., 2002; Itoh et al., 2004; Pagani et al., 2003; Shapiro and Senapathy, 1987; Sironi et al., 2004). Estos criterios fueron los siguientes: a) tamaño del exón mayor de 50 pb y menor de 200 pb; b) presencia del sitio aceptor "ag" en la unión intrón / exón y del sitio donador "gu" en la unión exón / intrón; c) valores consenso de los sitios de *splicing* mayores a 0,7; d) presencia de "branch point" (YNYURAY) dentro de los 60 nucleótidos corriente arriba del sitio donador. Todos estos criterios se cumplen para el exón 2a de *clk4* (Figura 46).



Figura 46. Localización de los sitios consenso para la unión de la proteína PTB en los intrones que flanquean los exones 2, 2a, 3 y 4 de clk4. a) Los rectángulos vacíos representan los exones y las barras verticales rojas representan los sitios consenso para la unión a PTB ("tctt" y "ttctc"). Los posibles sitios consenso correspondientes al *branch point* se representan con barras azules. b) Secuencia de nucleótidos del fragmento del gen clk4 comprendido entre el exón 2 y el exón 4. Los exones se indican en letras mayúsculas y los intrones en letras minúsculas. Los sitios consenso para la unión a PTB se destacan en rojo y las secuencias polipirimidínicas aparecen subrayadas.

Por otra parte, nuestros datos experimentales basados en los ensayos por RT-PCR avalan la existencia del exón 2a tal como se observa en los datos representados en las Figuras 32 y 33. Hemos comprobado además que el exón 2a puede sufrir *splicing* alternativo y, en combinación con el *splicing* alternativo del exón 4, pueden generarse 4 isoformas de *clk4* (esquema Figuras 34 y 35). Las 2 isoformas que incluyen el exón 2a son minoritarias en células MEL, aún en los últimos estadios de la diferenciación, en donde predomina la isoforma que incluye el exón 4.

Clk4, por homología de secuencia, es el miembro de la familia *clk* más cercano a *clk/STY* (Figura 3) (Nayler et al., 1997). Es interesante notar que tal como ocurría en *clk/STY*, la relación entre inclusión / exclusión del exón 4 en células MEL, parece inclinarse hacia la isoforma truncada en las etapas tardías de la diferenciación. La inclusión del exón 2a produce una proteína truncada, aún en presencia del exón 4. La utilización del AUG-1 en la posición 100 y la inclusión del exón 2a origina un cambio de marco de lectura con respecto a la isoforma que no incluye el exón 2a, y la aparición de un codón de terminación prematuro (Figuras 34 y 35). Esto determina una mayor predisposición a la degradación por la ruta del NMD. Por lo tanto, la proteína *clk4* no sería viable cuando la traducción se originara a partir de un transcrito que incluyese el exón 2a. Sin embargo, la utilización del AUG-2 en la posición 266 daría lugar a una quinasa activa en la isoforma derivada de un transcrito que incluyera el exón 2a y el exón 4. Esta isoforma sería diferente en su extremo N-terminal ya que incluiría los 59 pb del exón 2a y excluiría 166 pb comprendidos entre AUG-1 y AUG-2 y podría ejercer un papel fisiológico distinto.

Por último, observamos en la Tabla VII que los valores consenso de los sitios de *splicing* varían según se trate de exones constitutivos o alternativos. En un trabajo reciente, Itoh y colaboradores llevaron a cabo un estudio comparativo de la regulación del *splicing* en el genoma de *Homo Sapiens*, *M. musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Drosophila melanogaster* (Itoh et al., 2004). Comparando exones constitutivos y alternativos determinaron que los exones que llevan a cabo un *splicing* alternativo poseen sitios de *splicing* débiles y presentan un número mayor de sitios potenciales de regulación. Nuestros resultados coinciden con estas predicciones respecto al exón 4. En la Tabla VII se puede observar que los valores para los sitios de *splicing* del exón 4 en todos los *clks*, representan sitios muy débiles: 1,6, 3,0, 3,8 y 7,1 para los sitios aceptores y 0,7, 0,7, 0,5 y 0,7 para los sitios donantes. Esto contrasta con los valores

observados para el resto de los exones constitutivos. El exón 2a de *clk4* presenta también valores altos, lo que podría indicar que está más cerca de una situación constitutiva.

El segundo de los criterios comentado por Itoh y colaboradores es la presencia de sitios potenciales de regulación, con especial referencia a los sitios ESEs. En exones alternativos es mayor el número de sitios potenciales de unión a proteínas SR comparado al número observado en los exones constitutivos. En nuestro caso y en completa concordancia con el criterio anterior, hemos comprobado que el número de sitios potenciales de unión a proteínas SR en el exón 4 de los *clks* es mayor que por ejemplo en el exón 5, constitutivo y de tamaño similar. El exón 2a de *clk4* presenta nuevamente una situación intermedia.

5.6. Localización subnuclear de *clk*/STY y SC-35.

El control del *splicing*, tanto constitutivo como alternativo, está íntimamente relacionado con el nivel de fosforilación de las proteínas SR, así como con el de la autofosforilación de *clk*/STY y otras proteínas quinasas de las SR (Caceres et al., 1998; Colwill et al., 1996a; Prasad et al., 1999). La localización de los factores de *splicing* está en concordancia con su nivel fosforilativo y se manifiesta como un proceso dinámico que involucra el tráfico entre los sitios de transcripción y los sitios de almacenamiento o “*speckles*” (Caceres et al., 1998; Colwill et al., 1996a; Prasad et al., 1999). En la presente tesis hemos podido confirmar que *clk*/STY co-localiza con la proteína SC-35 en células MEL (Figura 44). De forma indirecta además, hemos determinado que dicha localización está influida por el estado fosforilativo de *clk*/STY. La localización de SC-35 en células MEL prediferenciadas y MEL-R es más difusa comparada con células MEL diferenciadas o MEL tratadas con cicloheximida (Figuras 42 y 43). Estos resultados coinciden con una mayor presencia del transcrito que codifica para la proteína completa en los dos primeros casos o del que codifica para la proteína truncada en los dos últimos, tal como se determinó por RT-PCR. Como *clk*/STY actúa como quinasa preferencial de SC-35 la mayor expresión de *clk*/STY sugeriría una mayor fosforilación de SC-35 y como consecuencia una mayor localización (de ambas) en los sitios de transcripción. Por el contrario, si es mayoritaria

la proteína clk/STY^{tr}, habría una menor concentración de proteína clk/STY activa, una menor fosforilación de SC-35 y una mayor presencia en *speckles*.

La ausencia de proteína truncada como consecuencia de una posible degradación ha sido corroborada y discutida anteriormente (ver apartado de 4.4.1.). Sin embargo, la fusión de clk/STY^{tr} con otra proteína o epítopos que aumentan el peso molecular final, aparentemente provoca la estabilidad de la proteína truncada (Figura 45) (Duncan et al., 1997). Es posible que la obtención de una proteína de fusión con GFP haya permitido la estabilización de clk/STY^{tr} y la posibilidad de llevar a cabo transfecciones transitorias en células MEL. La sobreexpresión de la proteína truncada provocó una localización mayoritaria en *speckles*, no sólo de la proteína de fusión sino también de la proteína SC-35 (Figura 45). Por el contrario, en ambos casos la localización fue difusa cuando se sobreexpresó clk/STY. Se obtuvieron resultados similares en células COS-1, 293-T y A431 transfectadas con clk/STY, en células HEK-293 transfectadas con clk2 y en células COS-1 transfectadas con clk2 o clk3 (Colwill et al., 1996b; Duncan et al., 1997; Duncan et al., 1998; Nayler et al., 1998; SaccoBubulya and Spector, 2002). Todos estos datos confirman la relación existente entre el estado de fosforilación de clk/STY y SC-35 y su sublocalización nuclear.

6. Conclusiones

1. Se ha aislado y caracterizado el cDNA del gen que codifica para la proteína quinasa clk/STY de una librería de cDNA construída a partir de células MEL pre-determinadas. Mediante un estudio de expresión se ha comprobado que clk/STY se activa a lo largo de la diferenciación inducida de células MEL con HMBA.
2. Se ha demostrado que clk/STY se expresa a través de dos transcritos de 1,7 y 1,8 Kb, cuya diferencia radica en la inclusión o exclusión del exón 4. Esto a su vez determina la traducción de una proteína catalíticamente activa o de una isoforma truncada. La relación entre ambos transcritos se invierte a lo largo de la diferenciación, siendo la isoforma activa mayoritaria en células pre-diferenciadas y la truncada mayoritaria en células diferenciadas.
3. Se ha demostrado que los otros tres miembros de la familia clk: clk2, clk3 y clk4, aumentan su nivel de expresión en células MEL diferenciadas. Al igual que en clk/STY, se ha corroborado la existencia de dos transcritos producto del *splicing* alternativo del exón 4, observándose un incremento de expresión de la forma truncada en estadíos tardíos de la diferenciación.
4. Comparando las líneas celulares MEL-R y MEL parentales se ha demostrado que el aumento de exclusión del exón 4 es independiente de la acción del HMBA y está directamente relacionado con el grado de diferenciación de las células.
5. Se ha demostrado que la exclusión del exón 4 de clk/STY está favorecida a lo largo de la diferenciación de células MEL, aún cuando se fuerza la expresión exógena del gen. Estos resultados apoyan la hipótesis de una autorregulación de clk/STY a través de la expresión de sus dos isoformas.
6. Se ha identificado y aislado una nueva isoforma de clk4 que contiene una secuencia adicional de 59 pb que por sus características ha sido reconocida como exón y denominada exón 2a. El exón 2a de clk4, al igual que el exón 4, puede sufrir *splicing* alternativo pudiéndose generar, por lo tanto, cuatro isoformas de clk4.

7. Se ha identificado un posible nuevo marco de lectura para *clk4* que se iniciaría en el exón 2a (AUG-2) y que daría lugar a una proteína catalíticamente activa, distinta a la original *clk4* en su extremo N-terminal.

8. Se ha demostrado que el exón 4 de *clk/STY*, *clk2*, *clk3* y *clk4* está flanqueado por intrones que poseen un alto número de sitios consenso de unión a la proteína PTB. El exón 4 de los cuatro *clks* posee además un número significativo de ESEs, con preponderancia a los sitios afines a SF2/ASF. Se ha comprobado que las secuencias consenso de *splicing* del exón 4, especialmente del sitio 5' donador, corresponden a sitios de *splicing* débiles. Estos datos sugieren que la modulación del *splicing* alternativo del exón 4 estaría regulada por el balance entre factores negativos y positivos.

9. Se ha corroborado en células MEL que la localización de *clk/STY*, así como su sustrato, la proteína SC-35, está relacionada directamente con el grado de fosforilación. En células MEL prediferenciadas la localización de ambas proteínas sigue un patrón difuso coincidiendo con una mayor presencia de la forma catalíticamente activa. En células MEL diferenciadas la localización de *clk/STY* y SC-35 es mayoritariamente en *speckles* coincidiendo en este caso con el aumento de la proteína truncada.

7. Bibliografía

- Andreeff, M., R. Stone, J. Michaeli, C.W. Young, W.P. Tong, H. Sogoloff, T. Ervin, D. Kufe, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 1992. Hexamethylene bisacetamide in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia: a phase II clinical trial with a differentiation-inducing agent. *Blood*. 80:2604-9.
- Baker, K.E., and R. Parker. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*. 16:293-9.
- Becker, W., H. Kentrup, J. Heukelbach, and H.G. Joost. 1996. cDNA cloning and characterization of rat clk3, a LAMMER kinase predominately expressed in testis. *Bba-Mol Cell Res*. 1312:63-67.
- Ben-David, Y., and A. Bernstein. 1991. Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell*. 66:831-4.
- Ben-David, Y., K. Letwin, L. Tannock, A. Bernstein, and T. Pawson. 1991. A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *Embo J*. 10:317-25.
- Bender, J., and G.R. Fink. 1994. AFC1, a LAMMER kinase from *Arabidopsis thaliana*, activates STE12-dependent processes in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:12105-9.
- Blanchette, M., and B. Chabot. 1999. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *Embo J*. 18:1939-52.
- Blencowe, B.J. 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci*. 25:106-10.
- Bolduc, L., B. Labrecque, M. Cordeau, M. Blanchette, and B. Chabot. 2001. Dimethyl sulfoxide affects the selection of splice sites. *J Biol Chem*. 276:17597-17602.
- Bourgeois, C.F., M. Popielarz, G. Hildwein, and J. Stevenin. 1999. Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation. *Mol Cell Biol*. 19:7347-56.
- Buratti, E., T. Dork, E. Zuccato, F. Pagani, M. Romano, and F.E. Baralle. 2001. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *Embo J*. 20:1774-84.
- Caceres, J.F., and A.R. Kornblihtt. 2002. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*. 18:186-93.
- Caceres, J.F., G.R. Sreaton, and A.R. Krainer. 1998. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*. 12:55-66.
- Caceres, J.F., S. Stamm, D.M. Helfman, and A.R. Krainer. 1994. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*. 265:1706-9.
- Cantor, A.B., S.G. Katz, and S.H. Orkin. 2002. Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol Cell Biol*. 22:4268-79.
- Cantor, A.B., and S.H. Orkin. 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 21:3368-76.
- Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 3:285-98.
- Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M.Q. Zhang, and A.R. Krainer. 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*. 31:3568-71.

- Chan, R.C., and D.L. Black. 1997. The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell-specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream. *Mol Cell Biol.* 17:4667-76.
- Charlet, B.N., P. Logan, G. Singh, and T.A. Cooper. 2002. Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol Cell.* 9:649-58.
- Chew, S.L., L. Baginsky, and I.C. Eperon. 2000. An exonic splicing silencer in the testes-specific DNA ligase III beta exon. *Nucleic Acids Res.* 28:402-10.
- Chou, M.Y., J.G. Underwood, J. Nikolic, M.H. Luu, and D.L. Black. 2000. Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol Cell.* 5:949-57.
- Colwill, K., L.L. Feng, J.M. Yeakley, G.D. Gish, J.F. Caceres, T. Pawson, and X.D. Fu. 1996a. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem.* 271:24569-24575.
- Colwill, K., T. Pawson, B. Andrews, J. Prasad, J.L. Manley, J.C. Bell, and P.I. Duncan. 1996b. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *Embo J.* 15:265-75.
- Cote, J., S. Dupuis, and J.Y. Wu. 2001. Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *J Biol Chem.* 276:8535-43.
- Cote, J., M.J. Simard, and B. Chabot. 1999. An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* 27:2529-37.
- Dostie, J., F. Lejbkovicz, and N. Sonenberg. 2000. Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J Cell Biol.* 148:239-47.
- Du, C., M.E. McGuffin, B. Dauwalder, L. Rabinow, and W. Mattox. 1998. Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*. *Mol Cell.* 2:741-50.
- Duncan, P., B. Howell, R. Marius, S. Drmanic, E. Douville, and J. Bell. 1995. Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase. *J Biol Chem.* 270:21524-21531.
- Duncan, P.I., D.F. Stojdl, R.M. Marius, and J.C. Bell. 1997. In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 17:5996-6001.
- Duncan, P.I., D.F. Stojdl, R.M. Marius, K.H. Scheit, and J.C. Bell. 1998. The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res.* 241:300-308.
- Faustino, N.A., and T.A. Cooper. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17:419-37.
- Friend, C., M. Patuleia, and E. De Harven. 1966. Erythrocytic maturation *in vitro* of murine (Friend) virus-induced leukemia cells. *Natl Cancer Inst Monogr.* 22:505-522.
- Friend, C., W. Scher, J. Holland, and T. Sato. 1971. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro. Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68:378-382.
- Garcia-Blanco, M.A., S.F. Jamison, and P.A. Sharp. 1989. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev.* 3:1874-86.

- Golovkin, M., and A.S. Reddy. 1999. An SC35-like protein and a novel serine/arginine-rich protein interact with Arabidopsis U1-70K protein. *J Biol Chem.* 274:36428-38.
- Gooding, C., G.C. Roberts, and C.W. Smith. 1998. Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *Rna.* 4:85-100.
- Graf, T. 2002. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood.* 99:3089-101.
- Graveley, B.R. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 17:100-7.
- Gregory, T., C. Yu, A. Ma, S.H. Orkin, G.A. Blobel, and M.J. Weiss. 1999. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood.* 94:87-96.
- Gromak, N., A. Rideau, J. Southby, A.D. Scadden, C. Gooding, S. Huttelmaier, R.H. Singer, and C.W. Smith. 2003. The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing. *Embo J.* 22:6356-64.
- Gusella, J., R. Geller, B. Clarke, V. Weeks, and D. Housman. 1976. Commitment to erythroid differentiation by friend erythroleukemia cells: a stochastic analysis. *Cell.* 9:221-229.
- Hanahan, D. 1986. Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning, a practical approach. Vol. volume I. D.M. Glover, editor. IRL Press, Oxford. 109-135.
- Hanes, J., H. von der Kammer, J. Kludiny, and K.H. Scheit. 1994. Characterization by cDNA cloning of two new human protein kinases. Evidence by sequence comparison of a new family of mammalian protein kinases. *J Mol Biol.* 244:665-72.
- Harris, H. 2004. Putting on the brakes. *Nature.* 427:201.
- Hartmann, A.M., D. Rujescu, T. Giannakouros, E. Nikolakaki, M. Goedert, E.M. Mandelkow, Q.S. Gao, A. Andreadis, and S. Stamm. 2001. Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Mol Cell Neurosci.* 18:80-90.
- Hoffman, B., A. Amanullah, M. Shafarenko, and D.A. Liebermann. 2002. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene.* 21:3414-21.
- Howell, B., D. Afar, J. Lew, E. Douville, P. Icely, D. Gray, and J. Bell. 1991. STY, a tyrosine-phosphorylating enzyme with sequence homology to serine/threonine kinases. *Mol Cell Biol.* 11:568-572.
- Hsieh, F.F., L.A. Barnett, W.F. Green, K. Freedman, I. Matushansky, A.I. Skoultchi, and L.L. Kelley. 2000. Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood.* 96:2746-54.
- Itoh, H., T. Washio, and M. Tomita. 2004. Computational comparative analyses of alternative splicing regulation using full-length cDNA of various eukaryotes. *Rna.* 10:1005-18.
- Johnson, K.W., and K.A. Smith. 1991. Molecular cloning of a novel human cdc2/CDC28-like protein kinase. *J Biol Chem.* 266:3402-7.
- Jumaa, H., J.L. Guenet, and P.J. Nielsen. 1997. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 17:3116-24.
- Jumaa, H., and P.J. Nielsen. 1997. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *Embo J.* 16:5077-85.

- Kan, J.L., and M.R. Green. 1999. Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor. *Genes Dev.* 13:462-71.
- Katsu, R., H. Onogi, K. Wada, Y. Kawaguchi, and M. Hagiwara. 2002. Novel SR-rich-related protein clasp specifically interacts with inactivated Clk4 and induces the exon EB inclusion of Clk. *J Biol Chem.* 277:44220-44228.
- Krimer, D., G. Cheng, and A. Skoultschi. 1993. Induction of H3.3 replacement histone mRNAs during the precommitment period of murine erythroleukemia cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 21:2873-2879.
- Kume, T., K. Tsuneizumi, T. Watanabe, M.L. Thomas, and M. Oishi. 1994. Induction of specific protein tyrosine phosphatase transcripts during differentiation of mouse erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 269:4709-4712.
- Kume, T., T. Watanabe, R. Sanokawo, D. Chida, T. Nakamura, and M. Oishi. 1996. Expression of the protein tyrosine phosphatase beta 2 gene in mouse erythroleukemia cells induces terminal erythroid differentiation. *J Biol Chem.* 271:30916-30921.
- Lai, M.C., R.I. Lin, and W.Y. Tarn. 2003. Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochemical Journal.* 371:937-945.
- Lander, E.S., L.M. Linton, and B. Birren. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409:860-921.
- Le Guiner, C., F. Lejeune, D. Galiana, L. Kister, R. Breathnach, J. Stevenin, and F. Del Gatto-Konczak. 2001. TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J Biol Chem.* 276:40638-46.
- Lee, K., C. Du, M. Horn, and L. Rabinow. 1996. Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases. *J Biol Chem.* 271:27299-303.
- Leszczyniecka, M., T. Roberts, P. Dent, S. Grant, and P.B. Fisher. 2001. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther.* 90:105-56.
- Lewis, B.P., R.E. Green, and S.E. Brenner. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:189-92.
- Liao, S.K., and A.A. Axelrad. 1975. Erythropoietin-independent erythroid colony formation in vitro by hemopoietic cells of mice infected with friend virus. *Int J Cancer.* 15:467-82.
- Liu, H., W. Zhang, R.B. Reed, W. Liu, and P.J. Grabowski. 2002. Mutations in RRM4 uncouple the splicing repression and RNA-binding activities of polypyrimidine tract binding protein. *Rna.* 8:137-49.
- LopezFernandez, L.A., D.M. LopezAlanon, V. Castaneda, D.B. Krimer, and J. DelMazo. 1997. Developmental expression of H3.3A variant histone mRNA in mouse. *Int J Dev Biol.* 41:699-703.
- Maquat, L.E. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:89-99.
- Marks, P., and R. Rifkind. 1978. Erythroleukemic differentiation. *Ann.Rev.Biochem.* 47:419-448.
- Marks, P.A., V.M. Richon, and R.A. Rifkind. 1996. Cell cycle regulatory proteins are targets for induced differentiation of transformed cells: Molecular and clinical studies employing hybrid polar compounds. *Int J Hematol.* 63:1-17.

- Mason-Garcia, M., and B.S. Beckman. 1991. Signal transduction in erythropoiesis. *Faseb J.* 5:2958-64.
- Matushansky, I., F. Radparvar, and A.I. Skoultchi. 2000. Manipulating the onset of cell cycle withdrawal in differentiated erythroid cells with cyclin-dependent kinases and inhibitors. *Blood.* 96:2755-64.
- Matushansky, I., F. Radparvar, and A.I. Skoultchi. 2003. CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells. *Oncogene.* 22:4143-9.
- Menegay, H.J., M.P. Myers, F.M. Moeslein, and G.E. Landreth. 2000. Biochemical characterization and localization of the dual specificity kinase CLK1. *J Cell Sci.* 113:3241-3253.
- Migliaccio, A.R., and G. Migliaccio. 1998. The making of an Erythroid cell - Molecular control of hematopoiesis. *Biotherapy.* 10:251-268.
- Mintz, P.J., and D.L. Spector. 2000. Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol.* 129:241-51.
- Miriami, E., H. Margalit, and R. Sperling. 2003. Conserved sequence elements associated with exon skipping. *Nucleic Acids Res.* 31:1974-83.
- Misteli, T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci.* 113 (Pt 11):1841-9.
- Modrek, B., and C.J. Lee. 2003. Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet.* 34:177-80.
- Modrek, B., A. Resch, C. Grasso, and C. Lee. 2001. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* 29:2850-9.
- Moeslein, F.M., M.P. Myers, and G.E. Landreth. 1999. The CLK family kinases, CLK1 and CLK2, phosphorylate and activate the tyrosine phosphatase, PTP-1B. *J Biol Chem.* 274:26697-26704.
- Mulligan, G.J., W. Guo, S. Wormsley, and D.M. Helfman. 1992. Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA. *J Biol Chem.* 267:25480-7.
- Muraki, M., B. Ohkawara, T. Hosoya, H. Onogi, J. Koizumi, T. Koizumi, K. Sumi, J. Yomoda, M.V. Murray, H. Kimura, K. Furuichi, H. Shibuya, A.R. Krainer, M. Suzuki, and M. Hagiwara. 2004. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of clks. *J Biol Chem.* 279:24246-54.
- Myers, M., M. Murphy, and G. Landreth. 1994. The dual-specificity clk kinase induces neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 14:6954-6961.
- Nayler, O., F. Schnorrer, S. Stamm, and A. Ullrich. 1998. The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation. *J Biol Chem.* 273:34341-34348.
- Nayler, O., S. Stamm, and A. Ullrich. 1997. Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem J.* 326 (Pt 3):693-700.
- Ney, P.A., and A.D. D'Andrea. 2000. Friend erythroleukemia revisited. *Blood.* 96:3675-80.
- Nicola, N.A. 1989. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 58:45-77.
- Nielsen, A.L., P.L. Norby, F.S. Pedersen, and P. Jorgensen. 1996. E-box sequence and context-dependent TAL1/SCL modulation of basic helix-loop-helix protein-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem.* 271:31463-9.

- Norton, P.A. 1994. Polypyrimidine tract sequences direct selection of alternative branch sites and influence protein binding. *Nucleic Acids Res.* 22:3854-60.
- Oikawa, T., T. Yamada, F. Kihara-Negishi, H. Yamamoto, N. Kondoh, Y. Hitomi, and Y. Hashimoto. 1999. The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell Death Differ.* 6:599-608.
- Orkin, S.H. 1995. Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem.* 270:4955-4958.
- Orkin, S.H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet.* 1:57-64.
- Orkin, S.H., and L.I. Zon. 1997. Genetics of erythropoiesis: induced mutations in mice and zebrafish. *Annual Review Of Genetics.* 31
- <http://www.biomednet.com/db/medline/98105100:33-60>.
- Pacheco, T.R., A.Q. Gomes, N.L. Barbosa-Morais, V. Benes, W. Ansorge, M. Wollerton, C.W. Smith, J. Valcarcel, and M. Carmo-Fonseca. 2004. Diversity of vertebrate splicing factor U2AF35: identification of alternatively spliced U2AF1 mRNAs. *J Biol Chem.* 279:27039-49.
- Padmanabha, R., S. Gehrung, and M. Snyder. 1991. The KNS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a nonessential protein kinase homologue that is distantly related to members of the CDC28/cdc2 gene family. *Mol Gen Genet.* 229:1-9.
- Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, and F.E. Baralle. 2003. Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J Biol Chem.* 278:26580-8.
- Park, Y.D., W.H. Kang, W.S. Yang, K.S. Shin, K. Sook Bae, and H.M. Park. 2003. LAMMER kinase homolog, Lkh1, is involved in oxidative-stress response of fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 311:1078-83.
- Perez, I., C.H. Lin, J.G. McAfee, and J.G. Patton. 1997. Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo. *Rna.* 3:764-78.
- Peschle, C., G. Migliaccio, F. Lettieri, A.R. Migliaccio, R. Ceccarelli, P. Barba, F. Titti, and G.B. Rossi. 1980. Kinetics of erythroid precursors in mice infected with the anemic or the polycythemic strain of Friend leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:2054-8.
- Prasad, J., K. Colwill, T. Pawson, and J.L. Manley. 1999. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: Both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol.* 19:6991-7000.
- Prasad, K.S., J.E. Jordan, M.J. Koury, M.C. Bondurant, and S.J. Brandt. 1995. Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J Biol Chem.* 270:11603-11.
- Rabinow, L., and J.A. Birchler. 1989. A dosage-sensitive modifier of retrotransposon-induced alleles of the *Drosophila* white locus. *Embo J.* 8:879-89.
- Ramsay, R., K. Ikeda, R. Rifkind, and P. Marks. 1986. Changes in gene expression associated with induced differentiation of erythroleukemia: Protooncogenes, globin genes, and cell division. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:6849-6853.

- Rane, S.G., and E.P. Reddy. 2002. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 21:3334-58.
- Rao, G., N. Rekhtman, G.H. Cheng, T. Krasikov, and A.I. Skoultchi. 1997. Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene*. 14:123-131.
- Rekhtman, N., K.S. Choe, I. Matushansky, S. Murray, T. Stopka, and A.I. Skoultchi. 2003. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol*. 23:7460-74.
- Rekhtman, N., F. Radparvar, T. Evans, and A.I. Skoultchi. 1999. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*. 13:1398-411.
- Reuben, R.C., R.L. Wife, R. Breslow, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 1976. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73:862-866.
- Richon, V.M., R.G. Ramsay, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 1989. Modulation of the c-myc, c-myc and p53 mRNA and protein levels during induced murine erythroleukemia cell differentiation. *Oncogene*. 4:165-73.
- Rueter, S.M., T.R. Dawson, and R.B. Emeson. 1999. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*. 399:75-80.
- SaccoBubulya, P., and D.L. Spector. 2002. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol*. 156:425-436.
- Sanford, J.R., N.K. Gray, K. Beckmann, and J.F. Caceres. 2004. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev*. 18:755-68.
- Savaldi-Goldstein, S., D. Aviv, O. Davydov, and R. Fluhr. 2003. Alternative splicing modulation by a LAMMER kinase impinges on developmental and transcriptome expression. *Plant Cell*. 15:926-38.
- Savaldi-Goldstein, S., G. Sessa, and R. Fluhr. 2000. The ethylene-inducible PK12 kinase mediates the phosphorylation of SR splicing factors. *Plant J*. 21:91-6.
- Schultz, J., T. Jones, P. Bork, D. Sheer, S. Blencke, S. Steyrer, U. Wellbrock, D. Bevec, A. Ullrich, and C. Wallasch. 2001. Molecular characterization of a cDNA encoding functional human CLK4 kinase and localization to chromosome 4q35. *Genomics*. 71:368-370.
- Scott, R.E., D.J. Autelitano, D.I. Lugo, M. Blum, J.L. Roberts, and J.E. Pintar. 1990. Developmental changes in levels of proopiomelanocortin intron A-containing heterogeneous nuclear RNA and mature messenger RNA in the anterior and neurointermediate lobes of the rat pituitary. *Mol Endocrinol*. 4:812-20.
- Selvakumar, M., and D.M. Helfman. 1999. Exonic splicing enhancers contribute to the use of both 3' and 5' splice site usage of rat beta-tropomyosin pre-mRNA. *Rna*. 5:378-94.
- Sessa, G., V. Raz, S. Savaldi, and R. Fluhr. 1996. PK12, a plant dual-specificity protein kinase of the LAMMER family, is regulated by the hormone ethylene. *Plant Cell*. 8:2223-34.
- Shapiro, M.B., and P. Senapathy. 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*. 15:7155-74.

- Shen, H., J.L. Kan, C. Ghigna, G. Biamonti, and M.R. Green. 2004. A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2. *Rna*. 10:787-94.
- Shivdasani, R.A., and S.H. Orkin. 1996. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*. 87:4025-39.
- Singer, D., M. Cooper, G. Maniatis, P. Marks, and R. Rifkind. 1974. Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 71:2668-2670.
- Singh, R., J. Valcarcel, and M.R. Green. 1995. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science*. 268:1173-6.
- Sironi, M., G. Menozzi, L. Riva, R. Cagliani, G.P. Comi, N. Bresolin, R. Giorda, and U. Pozzoli. 2004. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res*. 32:1783-91.
- Smith, C.W., and J. Valcarcel. 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*. 25:381-8.
- Southby, J., C. Gooding, and C.W. Smith. 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol*. 19:2699-711.
- Spiro, C., B. Gliniak, and D. Kabat. 1988. A tagged helper-free Friend virus causes clonal erythroblast immortality by specific proviral integration in the cellular genome. *J Virol*. 62:4129-35.
- Stoilov, P., R. Daoud, O. Nayler, and S. Stamm. 2004. Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Human Molecular Genetics*. 13:509-524.
- Stojdl, D.F., and J.C. Bell. 1999. SR protein kinases: the splice of life. *Biochem Cell Biol*. 77:293-298.
- Sureau, A., R. Gattoni, Y. Dooghe, J. Stevenin, and J. Soret. 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J*. 20:1785-96.
- Tenen, D.G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. 3:89-101.
- Tsiftoglou, A.S., I.S. Pappas, and I.S. Vizirianakis. 2003a. The developmental program of murine erythroleukemia cells. *Oncol Res*. 13:339-46.
- Tsiftoglou, A.S., I.S. Pappas, and I.S. Vizirianakis. 2003b. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacology & Therapeutics*. 100:257-290.
- Valcarcel, J., and F. Gebauer. 1997. Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol*. 7:R705-8.
- Vanegas, N., V. Castaneda, D. Santamaria, P. Hernandez, J.B. Schwartzman, and D.B. Krimer. 1997. Cloning, sequencing and expression in MEL cells of a cDNA encoding the mouse ribosomal protein S5. *Bba Mol Cell Res*. 1357:1-4.
- Vanegas, N., A. GarciaSacristan, L.A. LopezFernandez, M. Parraga, J. delMazo, P. Hernandez, J.B. Schwartzman, and D.B. Krimer. 2003. Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Leuk Res*. 27:607-615.
- Venter, J.C., M.D. Adams, and E.W. Myers. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291:1304-51.

- Volloch, V., and D. Housman. 1982. Terminal differentiation of murine erythroleukemia cells: physical stabilization of end-stage cells. *J Cell Biol.* 93:390-4.
- Wagner, E., and J. Lykke-Andersen. 2002. mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci.* 115:3033-8.
- Wagner, E.J., and M.A. Garcia-Blanco. 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol.* 21:3281-8.
- Wagner, E.J., and M.A. Garcia-Blanco. 2002. RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. *Mol Cell.* 10:943-9.
- Weintraub, H., R. Davis, S. Tapscott, M. Thayer, M. Krause, R. Benezra, T.K. Blackwell, D. Turner, R. Rupp, S. Hollenberg, and et al. 1991. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science.* 251:761-6.
- Wolff, L., and S. Ruscetti. 1985. Malignant transformation of erythroid cells in vivo by introduction of a nonreplicating retrovirus vector. *Science.* 228:1549-52.
- Wollerton, M.C., C. Gooding, E.J. Wagner, M.A. Garcia-Blanco, and C.W. Smith. 2004. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell.* 13:91-100.
- Yamada, T., N. Kondoh, M. Matsumoto, M. Yoshida, A. Maekawa, and T. Oikawa. 1997. Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells. *Blood.* 89:1383-93.
- Yun, B., R. Farkas, K. Lee, and L. Rabinow. 1994. The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family and is essential for eye and embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development.* 8:1160-73.
- Zhang, P., X. Zhang, A. Iwama, C. Yu, K.A. Smith, B.U. Mueller, S. Narravula, B.E. Torbett, S.H. Orkin, and D.G. Tenen. 2000. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood.* 96:2641-8.
- Zhu, L., and A.I. Skoultschi. 2001. Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 11:91-7.
- Zuo, P., and T. Maniatis. 1996. The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev.* 10:1356-68.