



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programas de *splicing* y desarrollo neuronal: función de la quinasa KIS

Marcos Moreno Aguilera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

A microscopic image of neurons, likely from a developing brain. The neurons are stained with a red dye, highlighting their cell bodies and branching processes. Some neurons are also stained with a blue dye, possibly indicating specific cellular components or nuclei. The background is a light, textured grey.

Programas de splicing y desarrollo neuronal: función de la quinasa KIS

2023

Marcos Moreno Aguilera

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
Programa de Doctorado en Biomedicina

Programas de *splicing* y desarrollo neuronal: función de la quinasa KIS

Memoria presentada por Marcos Moreno Aguilera para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona. El trabajo realizado para la elaboración de esta tesis doctoral ha sido llevado a cabo en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB), centro perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este trabajo ha sido dirigido por la Doctora Carme Gallego González y tutorizado por el Doctor Jesús Ureña Bares.

Carme Gallego González
(Directora)

Jesús Ureña Bares
(Tutor)

Marcos Moreno Aguilera
(Doctorando)

Marcos Moreno Aguilera

2023



Resumen

El *splicing* alternativo es un proceso que además de proporcionar diversidad al transcriptoma y proteoma celular, añade una nueva capa de regulación en la expresión de proteínas y en la función que estas desempeñan. Este proceso es un mecanismo clave en diversos estadios del desarrollo del sistema nervioso como son la diferenciación neuronal, el crecimiento axonal o la consolidación de la memoria a largo plazo. Mientras que se tiene un amplio conocimiento de cómo las diferentes proteínas de unión a RNA regulan el *splicing* alternativo y cómo los cambios de expresión de estas proteínas producen diferentes patrones de transcripción neuronal, se sabe muy poco sobre cómo se regula la actividad de estas proteínas.

En este trabajo mostramos que KIS, una quinasa enriquecida en el cerebro con un dominio compartido por factores que conforman el espliceosoma, juega un papel clave en la regulación de diferentes exones relacionados con desarrollo neuronal. KIS fosforila la proteína reguladora del *splicing* alternativo PTBP2 y contrarresta su papel en la exclusión de exones. A nivel molecular, la fosforilación de PTBP2 produce su disociación de co-reguladores clave y dificulta su capacidad de unión a RNA. En conjunto, nuestros datos proporcionan nuevos conocimientos sobre el control post-traducciona l de los reguladores de *splicing* y describen la función de KIS en el establecimiento del uso alternativo de exones en neuronas.

Summary

Alternative splicing is a process that not only provides diversity to the cellular transcriptome and proteome but adds a new layer of regulation to protein expression and their functions. This process is a key mechanism in different stages of nervous system development, such as neuronal differentiation, axonal growth, and long-term memory consolidation. It is described how different RNA-binding proteins can regulate alternative splicing and how changes in the expression of these proteins can explain the neuronal transcriptome. However, little is known about its regulation.

In this study we demonstrate that KIS, a kinase enriched in the brain with a domain shared by the spliceosome factors, plays an important role in the regulation of different exons related to neuronal development. KIS phosphorylates the alternative splicing regulatory protein PTBP2 and counteracts its role in exon exclusion. At a molecular level, phosphorylation of PTBP2 leads to its dissociation from key co-regulators and impairs its RNA-binding ability. Taken together, our data provide new insights into the post-translational control of splicing regulators and describe the function of KIS in establishing alternative exon usage in neurons

Contenido

Listado de figuras	7
Introducción	9
<i>Splicing</i>	9
Maquinaria de <i>splicing</i>	9
<i>Splicing</i> alternativo	11
Reguladores en cis	14
Reguladores en trans	15
<i>Splicing</i> alternativo en el sistema nervioso	16
Proteínas reguladoras del <i>splicing</i> alternativo en el sistema nervioso ... 18	
Ptbp	19
Mbnl	21
Rbfox	22
Nova	23
Plasticidad sináptica y regulación del <i>splicing</i>	24
<i>KIS</i>	25
<i>KIS</i> en el sistema nervioso	26
<i>KIS</i> y el <i>splicing</i> alternativo	27
Hipótesis y objetivos	28
Métodos	29
<i>Cultivos primarios, transfección y fijación</i>	29
<i>Cultivos de líneas celulares, transfección, producción de virus e infección</i> .31	
<i>Producción de DNA, clonajes y vectores</i>	32
<i>Extracción de RNA, RT-PCR, qPCR</i>	35
<i>Inmunofluorescencia y cuantificación de los niveles somáticos de PSD95</i> .36	
<i>Transfección reversa y reportero dual pFlareG</i>	36
<i>Western blot</i>	37
<i>Inmunoprecipitación de proteínas nucleares</i>	38

<i>Purificación de proteínas exógenas y fosforilación in vitro</i>	39
<i>ICLIP</i>	40
<i>CLIP de PTBP2 y pFlareG</i>	41
<i>FRET</i>	41
<i>Fosfoproteoma</i>	42
<i>RNAseq</i>	44
<i>GSEA</i>	45
Resultados.....	48
<i>KIS regula el splicing alternativo de exones relacionados con el desarrollo neuronal</i>	48
<i>KIS fosforila proteínas de splicing alternativo y podría regular la actividad de Ptbp2</i>	55
<i>La fosforilación de PTBP2 regula su actividad sobre PSD95</i>	65
<i>KIS disocia los complejos proteína-proteína entre PTBP2-MATR3-hnRNPM así como impide su unión a RNA</i>	72
Discusión.....	80
<i>KIS supone un nuevo regulador del splicing durante el desarrollo neuronal</i> ...	80
<i>La actividad de KIS recae sobre las proteínas reguladoras del splicing e inhibe PTBP2 en el sistema nervioso</i>	83
<i>La actividad quinasa de KIS regula los complejos proteína-proteína durante la regulación del splicing alternativo</i>	86
Conclusiones.....	93
Referencias.....	94

Listado de figuras

Figura 1. Esquema del proceso de <i>splicing</i> y los diferentes complejos formados por el espliceosoma.	10
Figura 2. Representación esquemática de las interacciones UHM-ULM necesarias para el proceso de <i>splicing</i>	11
Figura 3. Eventos de <i>splicing</i> alternativo.	13
Figura 4. Representación de los elementos regulatorios en cis del <i>splicing</i> alternativo.	14
Figura 5. Representación de los reguladores del <i>splicing</i> alternativo en trans.	15
Figura 6. Regulación de la inclusión exónica a lo largo del desarrollo neuronal.	16
Figura 7. Las proteínas reguladoras del <i>splicing</i> alternativo son cruciales en las diferentes etapas del neurodesarrollo.	18
Figura 8. Las proteínas reguladoras del <i>splicing</i> alternativo compiten y cooperan entre ellas para decidir la inclusión/exclusión exónica.	19
Figura 9. Ptbp1 y Ptbp2 regulan el <i>splicing</i> de exones comunes y sufren un proceso de autorregulación de su expresión.	20
Figura 10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína KIS.	25
Figura 11. Expresión del mRNA de KIS en cultivos primarios de neuronas corticales.	48
Figura 12. KIS regula la inclusión de exones relacionados con la plasticidad sináptica.	49
Figura 13. Los exones regulados por KIS pertenecen a genes de unión a RNA y la familia de receptores GABA.	51
Figura 14. KIS regula un conjunto de exones relacionados con el desarrollo neuronal.	52
Figura 15. Los genes reguladores del <i>splicing</i> de mRNA que cambian a lo largo del desarrollo no se ven afectados por el knockdown de KIS.	54
Figura 16. KIS fosforila proteínas importantes del <i>splicing</i> alternativo.	56
Figura 17. Definición y descripción del PPS.	57
Figura 18. Entre las dianas de fosforilación de KIS existe un enriquecimiento de proteínas relacionadas con el <i>splicing</i> y su regulación.	58
Figura 19. El valor de PPS no muestra una dependencia por el número de péptidos.	59
Figura 20. Entre las dianas de KIS hay un enriquecimiento en proteínas cuya fosforilación inhibe la unión a mRNA.	60
Figura 21. El cálculo de la expresión exónica mediante SI muestra una buena correlación respecto al PSI.	62

Figura 22. La expresión de KIS correlaciona con una inhibición de PTBP2.....	63
Figura 23. Los exones inhibidos por PTBP2 y modulados por la actividad de KIS se encuentran enriquecidos en funciones relacionadas procesos neuronales.	64
Figura 24. Modelo de inhibición de KIS sobre PTBP2.	64
Figura 25. Esquema de PTBP2 y localización de las fosforilaciones.	66
Figura 26. El estado de fosforilación de PTBP2 regula su capacidad de inhibir la expresión de PSD95 en cultivos primarios de neuronas.	68
Figura 27. La sobreexpresión de KIS aumenta los niveles de PSD95 en neuronas hipocámpales inmaduras.	69
Figura 28. Descripción del reportero fluorescente dual pFlareG-e18-PSD95. ..	70
Figura 29. KIS modifica el splicing alternativo de pFlareG-e18-PSD95.	71
Figura 30. El complejo PTBP-MATR3-hnRNPM destaca entre las proteínas fosforiladas por KIS.	73
Figura 31. Los interactores de PTBP1 y PTBP2 se encuentran mayormente fosforilados en presencia de KIS.	74
Figura 32. La fosforilación de KIS disocia las uniones entre PTBP2 y MATR3/hnRNPM in vivo.	75
Figura 33. La fosforilación de KIS disocia las uniones entre PTBP2 y MATR3/hnRNPM in vitro.	76
Figura 34. Los experimentos de FRET corroboran como KIS disocia los complejos entre PTBP2 y MATR3/hnRNPM.....	77
Figura 35. La fosforilación de PTBP2 impide su unión al RNA.	79
Figura 36. Los dominios desordenados juegan un papel fundamental en la formación de complejos y la regulación del splicing.	87
Figura 37. Las fosforilaciones de KIS sobre PTBP2 MATR3 y hnRNPM se encuentran en dominios desordenados.	89
Figura 38. Modelo de la regulación del splicing alternativo a través de KIS/PTBP2 a lo largo del desarrollo neuronal.	92

Introducción

Splicing

En 1978, W. Gilbert(1) contradujo el dogma fundamental planteado por Horowitz en 1948 “un gen, una enzima”(2) o como sería reformulado más adelante “un gen, una cadena polipeptídica”, proponiendo como el uso de los diferentes exones de un mismo gen, podría dar lugar a proteínas distintas.

El *splicing* es el mecanismo por el cual los diferentes exones de un gen se combinan para dar lugar a un transcrito de ARN mensajero maduro (mRNA, del inglés *messenger RNA*). Si este mecanismo puede dar lugar a más de un transcrito, se denomina *splicing* alternativo. De esta forma, los transcritos pueden ser traducidos a diferentes proteínas procedentes de un mismo gen (3). El *splicing* alternativo es un mecanismo que permite un aumento en la diversidad del proteoma y supone una capa más de regulación para la expresión de determinadas proteínas (4). En humanos, por ejemplo, solo un 5% de los genes tienen un único exón (5) y más del 90% experimentan *splicing* alternativo (6).

Maquinaria de *splicing*

El *splicing* es un proceso dinámico en el cual la maquinaria molecular encargada, el espliceosoma, forma diferentes complejos desde la unión al pre-mRNA hasta la unión final de los exones involucrados (5) (**Figura 1**).

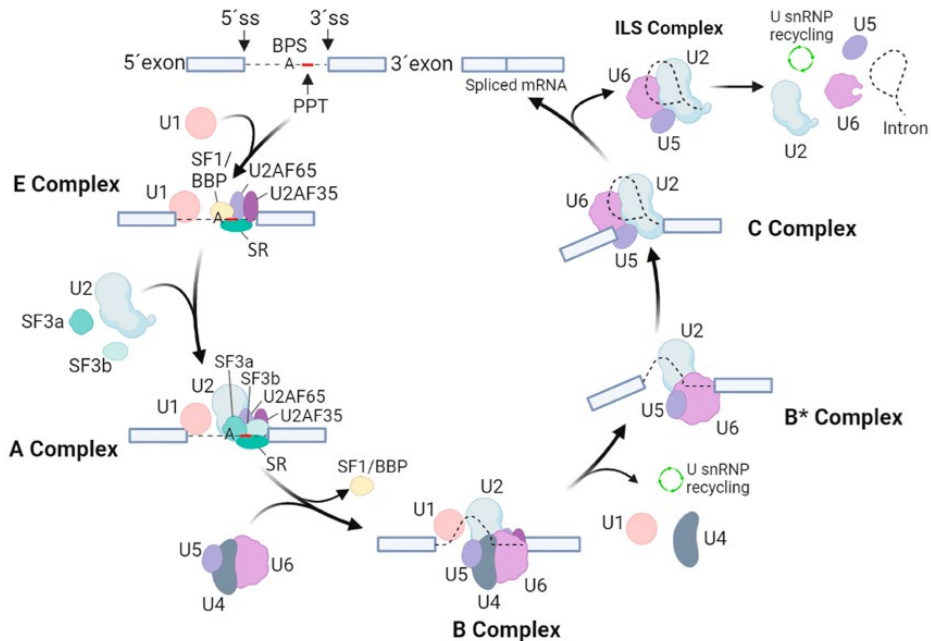


Figura 1. Esquema del proceso de *splicing* y los diferentes complejos formados por el espliceosoma.

La figura representa las diferentes etapas y formación de complejos a lo largo del proceso de *splicing*. Los exones se marcan con cajas gris claro, mientras que el intrón se marca por una línea negra de rayas. U1, U2, U3, U4, U5 y U6 señalan las *small nuclear RNP* (snRNPs). Figura extraída de Kretova M et al 2023 (7).

Durante la iniciación del *splicing* las proteínas *Splicing Factor 1* (SF1), *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 65kDa* (U2AF65) y *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 35kDa* (U2AF35) se unen a regiones específicas del intrón para eliminarlo, formando el complejo E. Específicamente, SF1 se une al punto de ramificación (BPS, del inglés *branching point site*), U2AF65 se une al tracto de polipirimidinas (*Py-track* ó *PPT* del inglés *polypyrimidine track*) y U2AF35 se une al AG terminal perteneciente al lugar de *splicing 3'* (3'SS). Estas proteínas, además de unirse al pre-mRNA, interactúan entre ellas gracias a los dominios UHM (*U2AF Homology Motif*) presentes en las proteínas U2AF. Estos dominios de unión proteína-proteína se unen al triptófano presente en el ULM (*UHM ligand motif*) de SF1 y U2AF65 (Figura 2)(8). Estas uniones son necesarias para que se pueda dar correctamente el proceso de *splicing*(9).

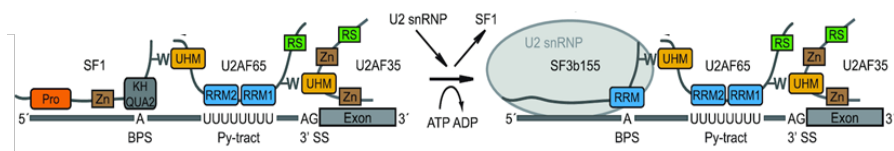


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones UHM-ULM necesarias para el proceso de *splicing*.

Durante el proceso de *splicing*, diferentes proteínas como U2AF65, SF1, SF3B1 y U2AF35 interactúan entre ellas gracias a los dominios UHM. Esquema extraído de Pabis et al., 2019 (8).

El *splicing* es un proceso donde las uniones proteína-proteína y RNA-proteína juegan un papel fundamental. Estas uniones se ven reguladas mediante modificaciones post-traduccionales, alterando su afinidad. Proteínas como SF1 y SRSF1 (*serine and arginine splicing factor 1*) son fosforiladas a lo largo del proceso de *splicing*, lo cual aumenta su afinidad a U2AF65 y U1 snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein unit 1*) facilitando así el ensamblaje del espliceosoma (7). De la misma forma, se ha demostrado que sin la fosforilación de SF3B1, mediada por CDK11, la maquinaria de *splicing* se ve interrumpida. Esta interrupción provoca una acumulación de pre-mRNA y un aumento en la retención intrónica (10).

Splicing alternativo

El *splicing* alternativo es el proceso mediante el cual un mismo gen puede dar lugar a diferentes transcritos, aumentando la diversidad del transcriptoma y del proteoma celular (3).

Los productos de *splicing* alternativo pueden definirse según el evento que se haya dado (**Figura 3**):

- **Inclusión / exclusión exónica:** es el proceso de *splicing* más prevalente en el genoma humano, siendo el responsable del 50-60% de los eventos de *splicing* alternativo (11). Durante este evento, un *Cassette exon* rodeado de otros dos exones es incluido o excluido del mRNA maduro, dando lugar a dos proteínas con secuencias distintas. Esta diferencia puede producir cambios a nivel de pauta de lectura, como es el caso del exón 18 PSD95 (*post-synaptic density 95*, en inglés) (12) o en la función de la proteína resultante, como con los exones 13 y 16 de CaMKIIβ (13).

-**Exclusividad exónica mutua:** es el proceso mediante el cual el *splicing* de dos exones (o un conjunto de ellos) se coordinan de tal manera que la inclusión de uno implica la exclusión del otro (o de un conjunto de exones). Un ejemplo son los exones 6 y 7 de Cdc42, donde el exón 6 se expresa ubicuamente y el exón 7 es específico del sistema nervioso (14)

- **Aceptor o donador diferencial de *splicing*:** proceso por el cual un exón muestra más de un aceptor (a 3') o más de un donante de *splicing* (a 5'), los cuales suelen tener fuerzas diferentes y compiten entre ellos. Cambios en el aceptor o donador de *splicing* pueden alargar o acortar el tamaño del exón produciendo cambios sutiles o incluso cambios en el patrón de *splicing* (15).

-**Retención intrónica:** es el proceso que se da cuando no se produce *splicing* en un intrón y se mantiene en el mRNA maduro. En un principio se creía que se debía a errores en el proceso de *splicing*, pero se ha observado que los intrones retenidos juegan un papel en la regulación de los transcritos y proteínas que lo contienen (16). Un ejemplo es la retención del intrón 16 de CaMKII α en cual ayuda al mRNA de CaMKII α a localizarse en segmentos distales dentro de las neuritas (17).

- **Primer exón alternativo**, también conocido como promotor alternativo o en inglés *Transcription Start Site* (TSS). Proceso que se produce cuando la iniciación de la traducción se da desde diferentes promotores, cambiando así el primer exón transcrito. Estudios de *long-read sequencing* han demostrado que la selección del promotor no es independiente al resto de procesos de *splicing* y que la iniciación desde un promotor u otro dentro del mismo gen correlaciona con cambios en el conjunto de exones expresados, provocando cambios funcionales en las proteínas codificadas (18).

- **Último exón alternativo**, también conocido lugar alternativo de poliadenilización o en inglés *Transcription Termination Site* (TTS). Proceso que se da cuando se termina la transcripción desde diferentes terminadores, conllevando diferentes sitios de poliadenilación y cambiando el perfil de 3'UTR de los transcritos procesados. Este cambio en la terminación, además, puede implicar la depleción o adición de diferentes dominios, como es el caso de IL1RAP donde en células hepáticas es una proteína soluble pero gracias a la

aparición de Sam38 en neuronas, se da un cambio en el lugar de terminación de la transcripción, añadiendo un dominio transmembrana (19).

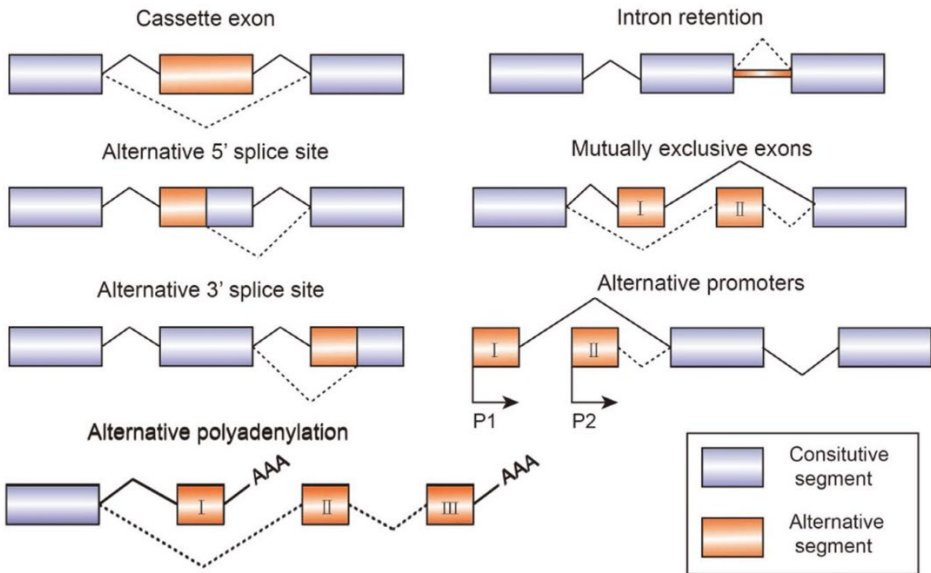


Figura 3. Eventos de *splicing* alternativo.

Cassete exon: inclusión/exclusión exónica. *Intron retention*: retención intrónica. *Alternative 5' splice site* y *Alternative 3' splice site*: donador y aceptor diferencial de *splicing*. *Alternative promoters*: Primer exón alternativo. *Alternative polyadenylation*: Último exón alternativo. Figura extraída de Qi Liu et al 2022 (20).

A pesar de esta visión binaria de los eventos de *splicing*, donde se decide si un elemento es incluido o no en el mRNA maduro, se han observado patrones complejos donde diferentes conjuntos de exones se seleccionan de la misma forma para dar lugar a una mayor cantidad de variantes de *splicing*. Un ejemplo es el caso de *Dscam* en *Drosophila melanogaster* con más de 38000 isoformas (21).

El *splicing* alternativo es un proceso altamente regulado donde tanto elementos en cis (secuencias dentro de los exones e intrones) como elementos en trans (proteínas reguladoras del *splicing* alternativo, histonas, etc) cooperan y compiten en equilibrio para decidir el resultado de un posible evento de *splicing* alternativo.

Reguladores en *cis*

Dentro de la secuencia de los exones e intrones existen multitud de elementos que pueden regular la inclusión/exclusión de un exón. Un ejemplo son las secuenciasceptoras y donadoras de *splicing*. Dependiendo de qué nucleótidos rodeen al AG en el aceptor de *splicing*, o al GT en el donador de *splicing*, estos lugares tendrán mayor o menor probabilidad de ser usados en comparación con los donadores/aceptores de los exones colindantes (22,23).

La repetición de algunos elementos canónicos del *splicing* también puede ayudar a la inclusión de algunos exones, como es el caso del exón 2 de MCL1, con tres repeticiones del BP en el intrón 1 (24). Otros estudios han modelizado cómo la longitud de un intrón y su tasa de transcripción puede alterar la inclusión del exón que le precede (25).

Adicionalmente, existen elementos reguladores del *splicing* (SRE, del inglés *splicing regulatory elements*) clasificados como elementos exónicos/intrónicos silenciadores (ESS y ISS) y activadores (ESE o ISE) (Figura 4). Estos elementos regulan el *splicing* alternativo de un exón y normalmente se localizan en las cercanías del lugar de *splicing*, aunque también pueden encontrarse a más de 500 nucleótidos en las regiones intrónicas (26). Por sí solos, estos elementos pueden actuar como estructuras secundarias del RNA que inhiben el *splicing*, ocultando elementos clave para el proceso, o incluso facilitarlo, acercando a los aceptores y los donadores de *splicing* (27). Aun así, estos elementos suelen responder a secuencias específicas donde se pueden unir proteínas de unión a RNA (RBP, del inglés *RNA binding protein*).

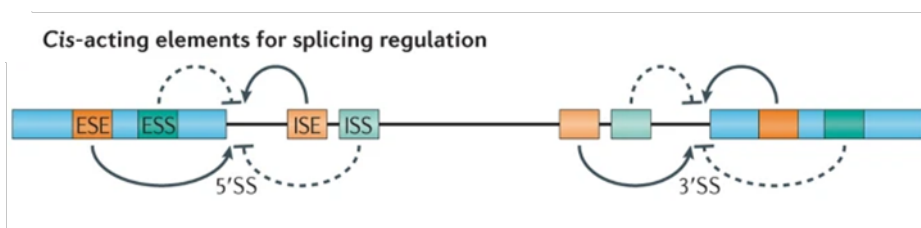


Figura 4. Representación de los elementos reguladores en cis del *splicing* alternativo.

Diferentes elementos intrínsecos a la secuencia génica son capaces de regular la inclusión/exclusión exónica. Figura extraída de Xiang-Dong Fu et al. 2014 (28).

Reguladores en *trans*

Las RBP suponen una compleja capa de regulación del *splicing* alternativo. Su expresión y función es capaz de correlacionar con la identidad tisular y su desregulación se ha visto implicada en patologías como el autismo, la esclerosis lateral amiotrófica y el cáncer (29,30).

Las proteínas reguladoras del *splicing* alternativo reconocen y se unen a diferentes regiones exónicas e intrónicas a fin de aumentar o disminuir la probabilidad de un evento de *splicing*. En términos generales se conoce que las proteínas tipo hnRNP (*heterogeneous nucleolar ribonucleoprotein*) se unen a los elementos inhibitorios (ESS e ISS) mientras que las proteínas de la familia SR (*Serine arginin rich*) se unen a los elementos activadores (ESE e ISE) (31) (**Figura 5A**). Aun así, se ha observado como diferentes RBP pueden actuar tanto de activadoras como de inhibidoras del *splicing* dependiendo de las regiones del pre-mRNA al que se unen (**Figura 5B**), así como cambiar su función según los cofactores que se expresen (32,33).

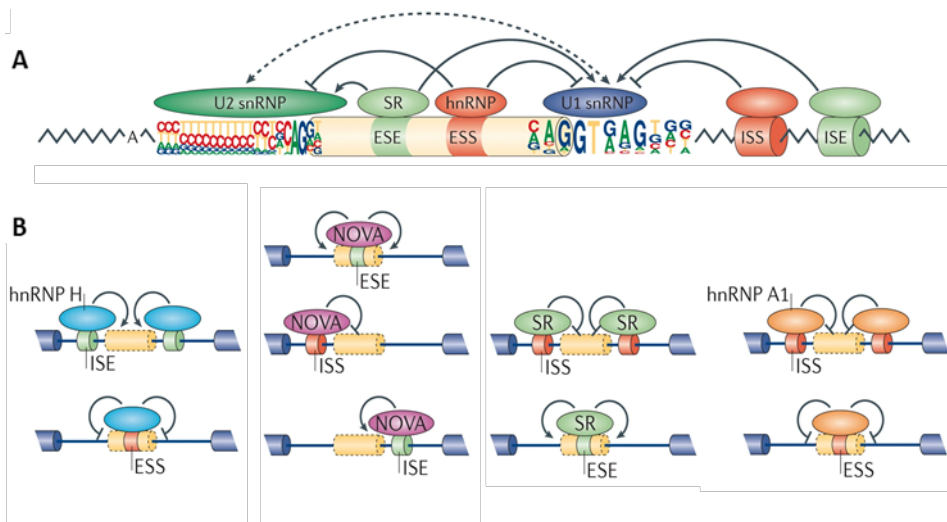


Figura 5. Representación de los reguladores del *splicing* alternativo en trans.

A. Diferentes proteínas de unión a RNA se unen a regiones específicas a fin de facilitar o impedir la inclusión exónica. **B.** Aunque las proteínas de unión a RNA suelen mantener un patrón de unión (ESE, ISE, ISS o ESS), estas pueden unirse a diferentes regiones actuando en ocasiones como activadoras o como inhibidoras del *splicing*. Figura extraída de Matera, A et al. 2014 (34).

La unión de estas proteínas al pre-mRNA modifica el *splicing* alternativo de diferentes maneras, ya sea facilitando o inhibiendo la unión de U2AF al pre-mRNA (35) u otros componentes de la iniciación del *splicing*. A su vez, estas proteínas reguladoras del *splicing* alternativo son capaces de competir entre ellas, favoreciendo o impidiendo la inclusión de un mismo exón (**Figura 6**). De esta manera, el patrón de expresión de estas proteínas en diferentes tejidos y a lo largo del desarrollo es capaz de determinar, en parte, los patrones específicos de *splicing* (**Figura X**) (36).

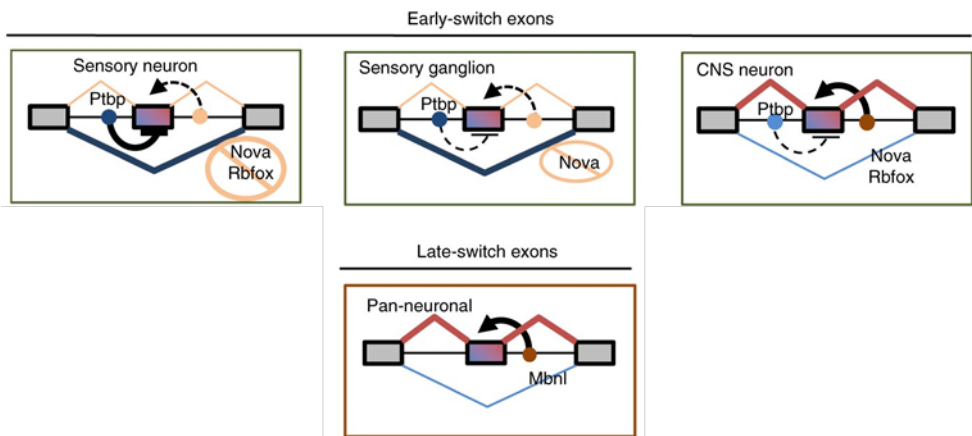


Figura 6. Regulación de la inclusión exónica a lo largo del desarrollo neuronal.

Diferentes proteínas de *splicing* son capaces de competir entre ellas para regular el nivel de inclusión/exclusión de exones concreto a lo largo del desarrollo. Esquema extraído de Weyn-Vanhentenryck et al., 2018 (36).

Splicing alternativo en el sistema nervioso

Considerando el patrón de *splicing* alternativo una característica discriminativa entre tejidos, el sistema nervioso presenta uno de los patrones más diferenciales tanto en humanos como en ratón. De hecho, en estos organismos, el tejido neuronal muestra un mayor número de exones *up*-regulados que el resto de tejidos (37). Recientemente, experimentos de *single cell RNA sequencing* (scRNAseq) han demostrado que el patrón *splicing* alternativo es suficiente para identificar los diferentes tipos neuronales (GABAérgicas,

glutamatérgicas, interneuronas, etc.), clasificación que antes se realizaba en base a la expresión diferencial de marcadores específicos (38).

Durante el desarrollo del sistema nervioso, el *splicing* alternativo juega un papel fundamental, siendo un factor clave en diferentes procesos. *In vitro*, se ha demostrado que la axonogénesis es un proceso que se da por cambios en el transcriptoma y no en la expresión génica. En este proceso, el *splicing* alternativo de *Shootin1* (SHTN1) mediado por PTBP2 es uno de los principales responsables (39). *In vivo*, cambios en el *splicing* alternativo de Robo3.1 son necesarios para el proceso de migración axónica (4). Robo3.1 es un receptor de membrana que, durante el crecimiento axonal, transduce señales de atracción hacia la *midlane*. Una vez cruzada se produce la retención del último intrón, resultando en una isoforma truncada (Robo3.2) la cual transduce repulsión sobre la *midlane* y permite que el axón no se quede retenido (40).

El *splicing* alternativo también es crucial para la maduración neuronal, siendo el proceso que regula la expresión de PSD95, mediante la exclusión/inclusión de su exón 18 (41), o modula las características de los canales de calcio dependientes de voltaje Ca_v2.2 a través del *splicing* diferencial del gen *Cacna1b* (42).

Estos cambios en los patrones del *splicing* alternativo vienen asociados a cambios en la expresión de diferentes RBP (36). Los cambios en los niveles de expresión de estas proteínas a lo largo del desarrollo son capaces de determinar cómo éste progresa, así como el destino neuronal/glial (**Figura 7**) (36,38,43).

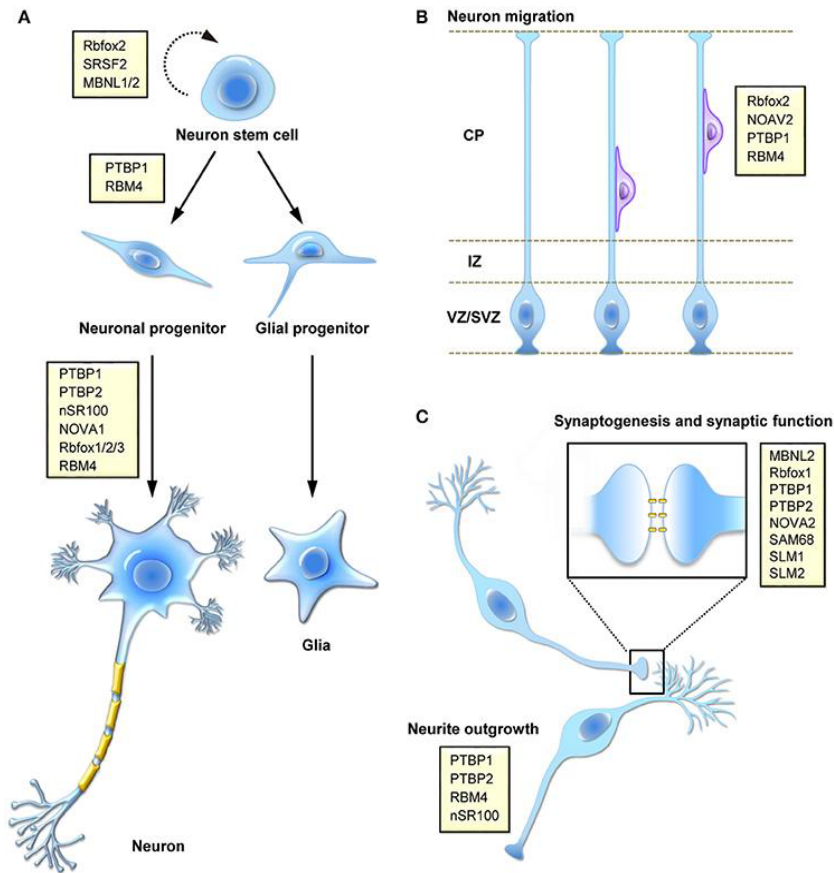


Figura 7. Las proteínas reguladoras del *splicing* alternativo son cruciales en las diferentes etapas del neurodesarrollo.

A. Proceso de división simétrica y asimétrica para discernir el destino celular. **B.** Migración de nuevas neuronas durante la corticogénesis. **C.** sinaptogénesis y funciones sinápticas reguladas por la actividad neuronal. Figura extraída de Chun-Hao Su et al, 2018 (43).

Proteínas reguladoras del *splicing* alternativo en el sistema nervioso

El sistema nervioso presenta un conjunto de proteínas reguladoras del *splicing* alternativo específicas (36). Estas proteínas, cuyos niveles cambian a lo largo del desarrollo, crean una red de regulación donde cooperan y compiten entre ellas con el fin de definir la inclusión/exclusión exónica/intrónica (**Figura 8**) y con ello el patrón de *splicing* neuronal (44).

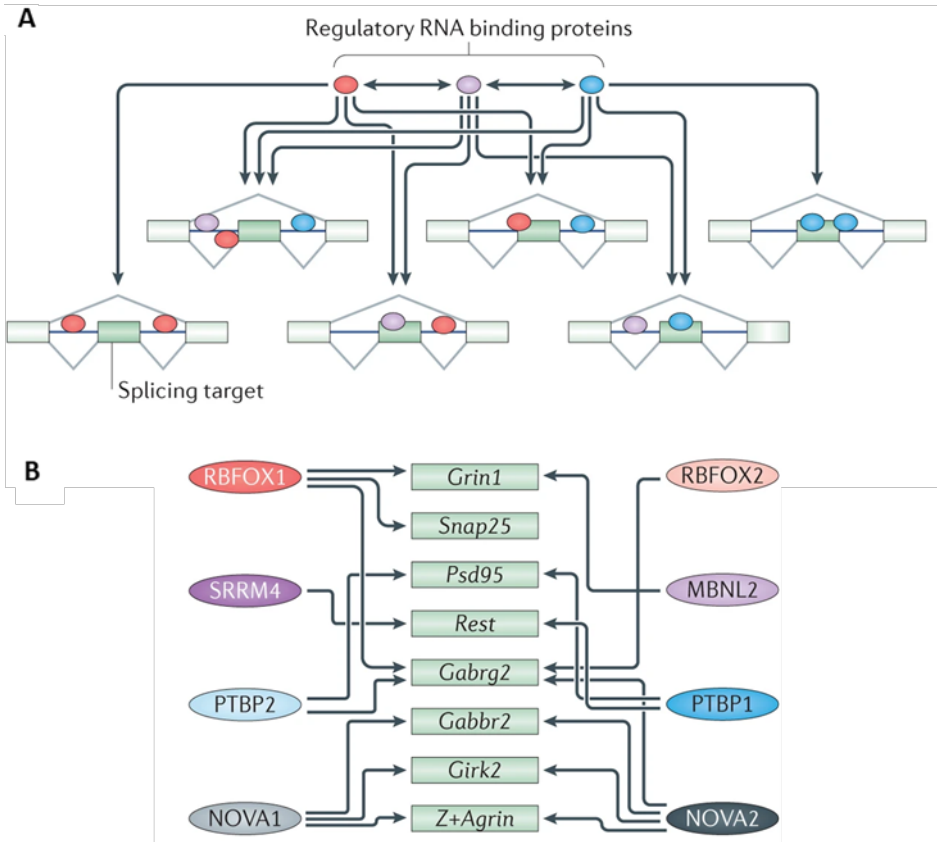


Figura 8. Las proteínas reguladoras del *splicing* alternativo compiten y cooperan entre ellas para decidir la inclusión/exclusión exónica.

A. Representación esquemática del modelo de cooperación/competición. **B.** Ejemplos de genes cuyos exones se ven regulados por más de una RBP. Figura extraída de Celine K. Vuong, et al. 2016 (45).

Entre las proteínas que regulan este patrón encontramos las familias de genes Nova, Mbnl, Ptbp y Rbfox.

Ptbp

Ptbp1 y Ptbp2 (del inglés, *Polypyrimidine Track Binding Protein*) son dos genes parálogos que codifican por proteínas de unión a RNA (46). Gracias a sus dominios RRM (*RNA recognition motif*), estas RBP reconocen elementos cis-regulatorios (repeticiones ricas en CU) dentro del pre-mRNA e interactúan con el espliceosoma para modificar su función, reprimiendo o favoreciendo la inclusión de un exón o un intrón (47). Ptbp1 fue uno de los primeros genes

reguladores del *splicing* conocidos. Es un gen ubicuamente expresado excepto en músculo y neuronas, donde encontramos su parólogo Ptbp2 (48). A lo largo del desarrollo neural los niveles de PTBP1 disminuyen mientras que la expresión de PTBP2 incrementa, produciendo un cambio en el patrón de *splicing* específico del sistema nervioso (46,49). El aumento de la expresión de PTBP2 sucede ya que PTBP1 reprime la inclusión del exón 10 de Ptbp2, impidiendo su expresión (Figura 9). En ratón, los niveles de PTBP2 alcanzan un pico de expresión en la etapa embrionaria, correspondiente a E12-E18 o DIV4-6 en cultivos corticales, y posteriormente se produce una disminución de sus niveles (41).

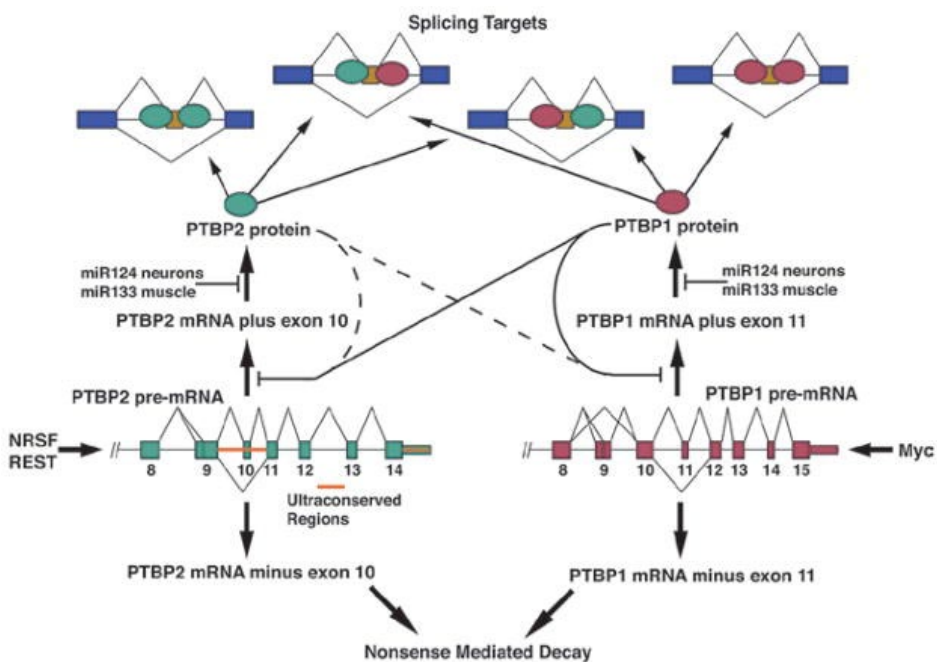


Figura 9. Ptbp1 y Ptbp2 regulan el *splicing* de exones comunes y sufren un proceso de autorregulación de su expresión.

La unión de las proteínas PTBP al pre-mRNA altera la inclusión exónica tanto de manera redundante como de manera específica. La expresión tanto de PTBP1 como de PTBP2 se ve regulada tanto por la unión de miRNAs como por la exclusión del exón 10 de PTBP2 u 11 de PTBP1, lo que produce una degradación del RNA mediante NMD. Figura extraída de Niroschika Keppetipola, et al. 2012 (50).

PTBP2 regula la expresión de diferentes genes específicos de neuronas maduras tales como CaMKII β (51) y PSD95 (41). En el caso de PSD95, PTBP2 inhibe la inclusión del exón 18, uniéndose a las regiones intrónicas *upstream* y

downstream del exón. La exclusión de este exón produce un mRNA con un codón de STOP prematuro que se degrada por *Nonsense Mediated Decay* (NMD), lo que se impide la correcta expresión de la proteína. En el artículo publicado en 2012 por Sika Zheng y colaboradores, se demostró como la sobreexpresión de PTBP2 producía un incremento en la exclusión del exón 18 de PSD95, seguido de una disminución en los niveles de proteína. Esta disminución se veía seguida por un decremento en el número de espinas en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Se ha descrito que PTBP1 y PTBP2 regulan el *splicing* alternativo compitiendo con U2AF por los lugares de unión al pre-mRNA (52). Recientes estudios demuestran que PTBP1 tiene la capacidad de interactuar con diferentes proteínas reguladoras del *splicing* como son NOVA1 (32), RAVER1 (53), hnRNPM (54) o MATR3 (54,55). La composición específica de estos complejos proteicos puede modificar la afinidad de PTBP1 para unirse a pre-mRNAs específicos y así regular los procesos de *splicing* alternativo. Por el contrario, hay muy pocos datos de cómo se regula la formación y disolución de estos complejos.

Mbnl

La familia Muscleblind-like protein (Mbnl) corresponde a los genes Mbnl1, Mbnl2 y Mbnl3, los cuales codifican proteínas de unión a RNA que regulan el *splicing* alternativo (56,57).

Los tres miembros de la familia contienen cuatro *zinc finger domains* que permiten el reconocimiento de *clusters* de repeticiones YGCY dentro del RNA (58,59). Tanto MBNL1 como MBNL2 se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma. Dentro del núcleo, promueven tanto la inclusión como la exclusión de diferentes exones, regulando el patrón de *splicing* alternativo (60,61).

Dentro de la familia, MBNL2 es la proteína predominante en neuronas postmitóticas y su expresión incrementa a lo largo de la maduración neuronal, junto a MBNL1 (62,63). Por el contrario, MBNL3 no se expresa en el sistema nervioso. De forma similar a la regulación entre PTBP1 y PTBP2, los niveles de MBNL2 en el sistema nervioso dependen de la ausencia de MBNL1, quien reprime la inclusión de dos exones necesarios para su correcta expresión (64), siendo el *knockout* de Mbnl1 compensado por una mayor expresión de MBNL2.

Esta familia de proteínas juega un papel en el desarrollo regulando los patrones de *splicing* alternativo y su desregulación impide la conversión de isoformas de embrionarias a adultas (65,66).

El *knockout* de Mbnl2 muestra problemas de aprendizaje en tareas donde se requiere la activación hipocampal, una disminución en la transmisión sináptica dependiente de receptores NMDA y una plasticidad sináptica incorrecta en las neuronas hipocampales (60). MBNL2 regula el *splicing* alternativo de diversos genes probablemente responsables de este fenotipo, como son Cacna1d (67), Tanc2 (68) y Ndr4 (69).

Rbfox

La familia de proteínas Rbfox (del inglés, RNA-binding fox-1 homolog) está constituida por Rbfox1 (A2bp1), Rbfox2 (Rbm9) y Rbfox3 (NeuN) (70–72). Las tres proteínas hacen uso de su dominio RRM para unirse a motivos (U)GCAUG (73). Aunque se desconoce el mecanismo molecular general por el cual las proteínas de la familia Rbfox regulan el *splicing* alternativo, sí se conoce algún ejemplo concreto como en el caso de la regulación del *splicing* de calcitonina, donde la unión de Rbfox2 bloquea el ensamblaje del espliceosoma, previniendo así la unión de SF1 al BPS y la unión de U2 snRNP al 3'SS (74).

El patrón de expresión de estas proteínas difiere según el tipo neuronal, en la capa granular del cerebelo se expresa Rbfox1 y Rbfox3, mientras que las células de Purkinje expresan Rbfox1 y Rbfox2 y la capa molecular expresa únicamente Rbfox2 (75). Dada esta especificidad, pero a la vez concurrencia entre las 3 proteínas, en los modelos de ratón *knockout* se han encontrado solo pocos ejemplos de exones específicamente regulados por estas proteínas, 20 en el caso de Rbfox1 y 29 en el caso de Rbfox2 (75,76). Este proceso de compensación se ve demostrado por experimentos de HITS-CLIP, los cuales señalan que las tres proteínas comparten lugares de unión al RNA (36,73).

Se ha demostrado que los exones regulados por estas proteínas están enriquecidos en genes de susceptibilidad a autismo. Algunos ejemplos de estos genes corresponden a canales iónicos (Scn8a, Cacna1c/d/g, Scn2a1, Kcnma1), proteínas de unión celular (Fat1, Nrcam, Nrnx1/3) y proteínas sinápticas (Cadps2, Lrrc7).

Nova

La familia Nova (del inglés, *neuro-oncological ventral antigen*) consiste en dos proteínas de unión a RNA: NOVA1 y NOVA2. Ambas proteínas del sistema nervioso se expresan en la mayoría de las neuronas adultas, aunque a diferentes niveles y con una localización mayoritariamente nuclear (77–79).

Estas proteínas utilizan sus dominios de unión a RNA de tipo KH para unirse a motivos YCAY (80), promoviendo la exclusión exónica al impedir la unión de U1 snRNP al aceptor de *splicing* 5' (81). A su vez, estas uniones pueden favorecer la inclusión exónica por mecanismos aún desconocidos.

El ratón deficiente para Nova1 no muestra cambios al nacer. Por el contrario, durante el crecimiento muestra apoptosis en las motoneuronas del tronco cerebral y medula espinal, resultando en la muerte del organismo tras 1-2 semanas después de nacer (82). Las neuronas hipocampales del ratón *knockout* de Nova2 muestran una reducción en la potenciación a largo plazo (LTP) de los sIPSC (del inglés, *slow inhibitory postsynaptic currents*) y el animal fallece a las 2-3 semanas después del nacimiento (83). De esta manera se sugiere que el papel fundamental de Nova repercute en las etapas tardías del desarrollo neuronal.

Se cree que Nova1 y Nova2 tienen un papel redundante en cuanto a la regulación del *splicing* y que los diferentes fenotipos de los animales *knockout* se deben a los diferentes patrones de expresión en los subtipos neuronales (84). La familia Nova regula exones enriquecidos en transcritos que codifican para proteínas sinápticas (GluR6, syntaxin2), proteínas de la matriz extracelular (Agrin) y canales de iones (Kcnq2, Cav2.2), entre otros. Para algunos exones, la familia Nova juega un papel antagónico a la familia Ptbp, no solo favoreciendo la inclusión de algunos exones que Ptbp reprime (**Figura 8B**) (45) si no compitiendo por los mismos lugares de unión. Se ha observado que en el *knockout* de Nova2 el patrón de unión de PTBP2 cambia y pasa a unirse a las regiones donde se localiza NOVA2 (84).

Plasticidad sináptica y regulación del *splicing*

La gran diversidad de proteínas otorgada a través de *splicing* alternativo juega un papel fundamental en la consolidación de las sinapsis y la formación de memoria a largo plazo. Conjuntos de exones, como son los micro-exones, han demostrado ser necesarios para una consolidación sináptica correcta y la desregulación, a través de afecciones en el regulador de *splicing* nSR100, conlleva a problemas cognitivos en ratón (85,86).

Pero no es solo que las isoformas de *splicing* sean fundamentales para la plasticidad sináptica, sino que la actividad sináptica es capaz de modular los patrones de *splicing*. Por ejemplo, una actividad sináptica continuada permite un cambio de *splicing* en el gen Homer pasando de la isoforma Homer a Homer1a, la cual actúa como modulador alostérico de algunos receptores metabotrópicos de glutamato permitiendo una actividad independiente de ligando y una reducción homeostática de los receptores AMPA (87).

Se ha observado que estímulos rápidos como el Kainato (88), DHPG (del inglés *Dihydroxyphenylglycine*)(89) son capaces de alterar el patrón de *splicing* en cultivos primarios en periodos de 30 minutos a 2 horas. Estos cambios son lo suficientemente veloces como para no ser explicados por cambios en la expresión génica de las proteínas reguladoras del *splicing* y, probablemente, respondan a modificaciones post-traduccionales. Aunque existen algunos ejemplos de RBP cuya actividad se ve modulada por fosforilación (79,90), poco se conoce a cerca de cómo se puede regular la actividad de las proteínas involucradas en el *splicing* alternativo y los mecanismos que subyacen a esta regulación.

KIS

La proteína KIS, codificada por el gen UHMK1 (*U2AF65 homology motif kinase 1*), se nombró con las siglas de *Kinase Interacting with Stathmin* ya que fue descubierta en un ensayo doble híbrido donde se utilizaba estatmina como cebo. KIS es una serina/treonina quinasa que fosforila preferencialmente serinas seguidas de un residuo de prolina (91). La característica principal de KIS reside en su estructura: es la única quinasa con un dominio de interacción proteína-proteína UHM. Este dominio, que presenta un 42% de homología con el factor de *splicing* U2AF (92) (**Figura 10**), es propio de las proteínas canónicas del *splicing* como SF1 y U2AF65, hecho que hace pensar que podría estar relacionado con la interacción con proteínas de unión a RNA. Aunque existen algunos candidatos, poco se conoce sobre las dianas de fosforilación, así como de las funciones de KIS.

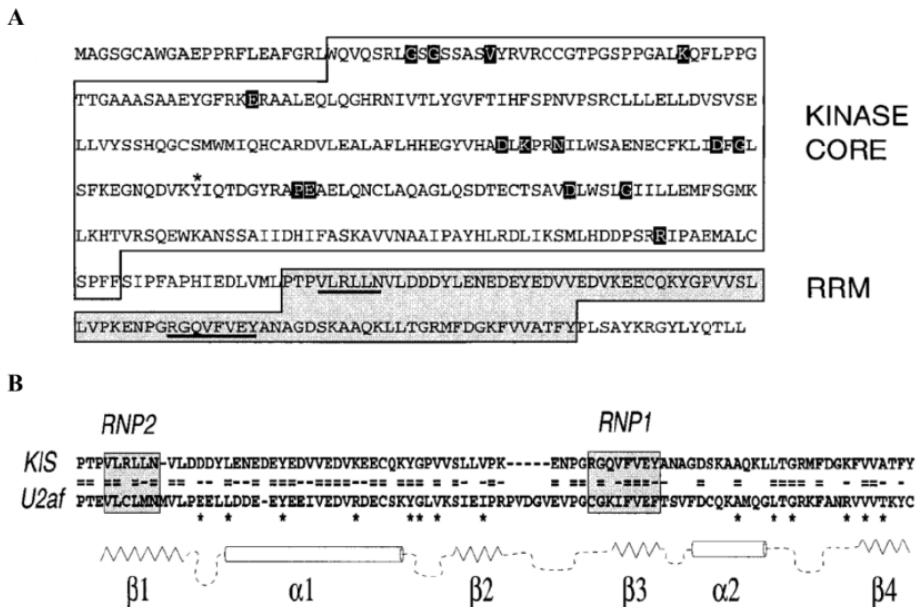


Figura 10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína KIS.

A. Dominio quinasa y dominio de interacción con proteínas de unión a RNA (RRM). **B.** Alineamiento de los aminoácidos de la parte C-terminal de KIS con la parte C-terminal de U2AF, mostrando la homología y estructura. Figura extraída de Kielkopf Cl. et al. 2004 (92).

KIS en el sistema nervioso

KIS tiene una expresión ubicua, con altos niveles de expresión en el sistema nervioso (93) especialmente en el giro dentado y las zonas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo, así como en las células de Purkinje y la zona granular del cerebelo. En ratón, los niveles de expresión de KIS van aumentando a lo largo del desarrollo, llegando al máximo en la etapa adulta (93). Aunque la expresión de KIS es mayoritariamente nuclear, en cultivos primarios de neuronas corticales, se ha observado que también está presente en el citoplasma y presenta un patrón punteado a lo largo de las dendritas (94).

Estudios anteriores en el laboratorio demuestran la importancia de KIS en el sistema nervioso: en dendritas KIS interacciona con KIF3A, una proteína motora importante para el transporte de gránulos de mRNA a lo largo del citoesqueleto de tubulina. De la misma forma, se demostró la colocalización de KIS con KIF3A así como el mRNA de BETA-tubulina. La ausencia de KIS en etapas tempranas del desarrollo provoca una disminución del crecimiento de las neuritas, probablemente debido por su efecto sobre la traducción localizada dependiente del 3'UTR del mRNA de BETA-actina (94). En neuronas adultas se ha demostrado que la ausencia de KIS conlleva un déficit en la maduración neuronal. Neuronas *knockdown* para KIS muestran una reducción en el árbol dendrítico así como una reducción en la amplitud de las corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mEPSC). Estos cambios correlacionan con un decremento en el número de espinas dendríticas maduras, presentando un fenotipo más de tipo filopodio que en neuronas control, así como una disminución de la traducción de proteínas importantes para la maduración neuronal y la plasticidad sináptica como son GluR1, GluR2 y PSD95 (95).

Adicionalmente a los experimentos con cultivos primarios, el modelo de ratón *knockout* para KIS presenta defectos cognitivos y altera la expresión de genes de la familia de los receptores GABAérgicos, desembocando en diferencias en *fear conditioning* en los animales donde la expresión de KIS se ve comprometida (93).

KIS y el *splicing* alternativo

El característico dominio UHM de KIS sugiere un papel en la regulación del *splicing*. Los dominios UHM comparten un gran nivel de identidad con los dominios canónicos de unión a RNA, los cuales median uniones proteína-RNA y suelen estar presente en proteínas de unión a RNA. Secuencias específicas dentro de los dominios UHM permiten la unión proteína-proteína en lugar de proteína-RNA, siendo necesario un residuo de triptófano rodeado de cargas positivas como ligando. Dada la identidad entre ambos dominios, se ha propuesto que los dominios UHM han evolucionado de los RRM y conectan a las proteínas que los contienen con el procesamiento del pre-mRNA (92).

En el núcleo, KIS tiene una distribución similar a la de los complejos de *splicing*. Se ha demostrado que, *in vitro*, KIS fosforila tanto SF1 (91) como SF3B1 (96), siendo necesaria la unión de su dominio UHM a los *UHM ligand motifs* (ULMs) presentes en estas proteínas. Concretamente, la fosforilación de SF1 en el motivo SPSP (serina 80 y serina 82, ambas mediadas por KIS) incrementa su capacidad de unirse a U2AF65 y reduce su afinidad a RNA, cambios necesarios para el proceso de *splicing* (91,97).

Experimentos de *proximity biotinylation assay* muestran como KIS interacciona con proteínas relacionadas con el *splicing* y el *splicing aleternativo* como son SF1, SF3B1/2, PTBP1, MATR3, hnRNPM y hnRNP H1/2/3 (98). Aún con estos datos y con la acumulación de pre-mRNAs en el cerebro del ratón *knockout* de KIS (93), poco se ha estudiado sobre las implicaciones directas de KIS sobre el *splicing* y el *splicing* alternativo.

Hipótesis y objetivos

Esta tesis doctoral se centra sobre la hipótesis de que KIS puede ser un regulador del *splicing* alternativo en el sistema nervioso, afectando al desarrollo en el sistema nervioso.

Para testar esta hipótesis se plantean cuatro objetivos:

1. Determinar si la presencia/ausencia de KIS modifica el patrón de *splicing* alternativo en cultivos primarios de neuronas.
2. Determinar cuáles son las dianas de fosforilación de KIS y su posible relación con la regulación del *splicing* alternativo.
3. Estudiar el mecanismo por el cual la actividad de KIS es capaz de modificar el *splicing* alternativo.
4. Estudiar el mecanismo molecular que subyace a la regulación de KIS sobre las proteínas relacionadas con el *splicing* alternativo.

Métodos

Cultivos primarios, transfección y fijación

En el presente trabajo se utilizaron cultivos primarios de neuronas corticales e hipocampales procedentes de embriones de ratón a día 17 y medio de gestación (E17.5), a partir de un método modificado del protocolo clásico (99).

El día anterior a la disección de los embriones se realizó un *coating* sobre las placas donde las neuronas serán plantadas, utilizando una solución de poli-D-lisina (Sigma cat nºP7886) a 0.5ug/mL en tampón bórico-borato a pH 8.3 e incubándolas durante 12h a 38°C. El mismo día de la disección, se realiza 5 limpiezas de las placas utilizando agua miliQ con el fin de eliminar toda la poli-D-lisina no adherida, ya que puede ser tóxica para las neuronas.

Para la obtención de las células, se sacrificó una ratona a 17.5 días de gestación mediante dislocación cervical, se extrajeron los embriones y se trasladaron, en medio de disección (**Tabla 1**), a una campana de cultivos celulares a fin de trabajar en condiciones de esterilidad. Se diseccionaron los córtex e hipocampos con la ayuda de fórceps y bisturí, siempre trabajando en medio de disección y en hielo. Después de la disección, los córtex e hipocampos se limpiaron 3 veces con 10 mL de medio de disección frío y se añadió tripsina al 0.05% (Fisher cat nº15090046) y EDTA al 0.02%. Se digirió enzimáticamente el tejido durante 15 minutos a 37°C. Tras la incubación se paró la digestión limpiando el tejido 3 veces con medio de siembra (**Tabla 1**), en la primera limpieza se añadió DNasa a 0.2mg/mL (Sigma cat nºDN25). Las limpiezas se realizaron permitiendo que el tejido sedimentase en lugar de centrifugarlo para mantener el máximo la viabilidad. Una vez limpio, se disgregó el tejido mecánicamente, pasándolo 10 veces por una pipeta Pasteur de 230mm con la punta estrecha. Seguidamente se centrifugaron las células a 600rpm durante 3 minutos y se desechó el sobrenadante. Tras resuspender las células, estas se contaron utilizando una cámara Burker y se plantaron en medio de siembra a una densidad de 70000 células corticales/cm² para experimentos bioquímicos y de 3500 células hipocampales/cm² para experimentos de microscopía.

Una vez plantadas, las neuronas se mantuvieron en el incubador (37°C, 5% CO₂, ambiente saturado de humedad) durante 2. A continuación se les retiró el medio

de siembra y se substituyo por medio de mantenimiento neuronal (**Tabla 1**). A partir de este momento, se consideran in vitro, dejándolas los días in vitro (DIV) necesarios para cada experimento.

Tabla 1. Medios utilizados para los cultivos primarios de neuronas.

Medio	Contenido
Medio de disección	HBSS 1x (VWR cat noX0507), glucosa 0.8%, penicilina / estreptomina (Fisher cat no 15140122)
Medio de siembra	MEM (VWR cat no L0415), FBS 10% (Cultek cat no 91S1810), glucosa 0.8%, penicilina / estreptomina
Medio de mantenimiento	Neurobasal (Fisher cat no 21103049), B-27 2% (Fisher cat no 17504044), Glutamax 1% (Fisher cat no 35050), penicilina / estreptomina. Tanto el B-27 como el glutamax se guardaron a -20°C y añadieron al momento del uso.

Para transfectar los cultivos hipocampales, se realizó el método de calcio-fosfato utilizando el kit *CalPhos Mammalian Transfection Kit* (Clontech cat nº631312). Como las neuronas con células delicadas y difíciles de transfectar, en lugar de las instrucciones del fabricante el kit se utilizó junto al protocolo adaptado para el uso de neuronas(100). Las neuronas hipocampales se transfectaron utilizando 2µg de DNA total, donde un 10% correspondía a trazador fluorescente GFP o mScarlet. Para los experimentos de co-transfección, el vector trazador y los constructos a co-transfectar se mezclaron en una relación 1:4.5:4.5. La fijación de los cultivos para los experimentos de microscopía, las neuronas se limpiaron dos veces con PBS frío y después se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído y al 4% de sucrosa en PBS durante 30 minutos a 4°C.

Cultivos de líneas celulares, transfección, producción de virus e infección

Una de las líneas utilizadas fueron las células HEK293T (*Human Epitelial Kidney 293 Transformed*), las cuales provienen de epitelio embrionario humano y son muy utilizadas por su facilidad de cultivo, manipulación y transfección. También se utilizó la línea Neuro2A (N2A), procedentes de neuroblastoma de ratón. Estas se seleccionaron ya que, aunque no realizan sinapsis y no son tan fáciles de transfectar como las HEK293T, expresan genes neuronales de forma endógena y tienen origen neuronal. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (VWR cat nºL0104) suplementado con 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Cultek cat nº91S1810) y penicilina/estreptomycin (Fisher cat nº15140122) para evitar contaminaciones. Cuando se quiso diferenciar las células N2A, estas se cultivaron en el mismo medio sin FBS.

Para la transfección de las células HEK293T, estas se sembraron 24h antes para que en el momento de la transfección estuvieran al 70% de confluencia. Las células se transfectaron utilizando el reactivo PEI. Para la producción de partículas lentivirales, las células fueron transfectadas con los vectores de empaquetamiento pHR82ΔR y pVSV.G, juntamente con el plásmido lentiviral deseado. Tras 4 horas de la adición del reactivo de transfección, se cambió el medio por DMEM suplementado y se recogió el medio a las 24,48 y 72h post-transfección. Los medios fueron filtrados con filtros de polietilensulfona de 0.45 μm y ultracentrifugados a 26000rpm durante 2h a 4°C. El precipitado resultante es el que contiene las partículas lentivirales y este fue resuspendido en BSA al 1% y guardado a -80°C hasta su utilización.

Para titular la cantidad de partículas lentivirales activas, se siguió el protocolo descrito en (101), realizando un banco de diluciones donde se infectaron células HEK293T a concentraciones decrecientes. 4 días post infección se fijaron las células, se tiñeron los núcleos con DAPI (REF) y, siendo que los vectores lentivirales empleados expresan GFP, se contó el porcentaje de células infectadas (GFP positivas / DAPI). Para extraer la concentración inicial de virus, se tuvieron como referencia aquellas diluciones donde se encontró un porcentaje de infección de entre el 10 y el 30%, ya que en este rango las células se infectan por solo una partícula lentiviral.

Los cultivos neuronales fueron infectados a DIV 7 utilizando 2 MOI (*multiple of infection*) por célula sembrada. Al cabo de 2h se substituyo el medio por medio de mantenimiento neuronal fresco.

La línea celular N2A se transfectó utilizando el reactivo FuGene HD (Promega, E2311) tal y como se explica en el apartado *transfección reversa y reportero dual pFlareG*.

Producción de DNA, clonajes y vectores

Los plásmidos utilizados en este trabajo se amplificaron utilizando la cepa DH5 α de *Escherichia coli* y se obtuvieron utilizando el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel cat nº740588), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad y calidad del DNA se midió mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrometría con nanodrop. Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción, electroforesis de DNA, ligaciones, recombinaciones para mutación puntual y transformación se realizaron según los protocolos descritos *en Current Protocols in Molecular Biology* (102). Las PCRs se realizaron con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Fisher cat nº10024537) siguiendo las instrucciones del fabricante y el DNA se purifico utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel cat nº740609).

Tabla 2. Compendio de plásmidos utilizados durante la realización de la tesis doctoral.

Plásmidos utilizados en este estudio	Procedencia
pcDNA3-Falg	Stock del laboratorio
pcDNA3-Flag-PTBP1	Clonado para este trabajo
pcDNA3Flag-PTBP2	Clonado para este trabajo
pcDNA3-Flag-PTBP2 (3S/A)	Clonado para este trabajo
pcDNA3-Flag-PTBP2 (3S/D)	Clonado para este trabajo
pET-28A	Novagen 69864-3
pET-28a-6HIStag-PTBP2(S178A)	Clonado para este trabajo
pET-28a-6HIStag-PTBP2(S308A)	Clonado para este trabajo
pET-28a-6HIStag-PTBP2(S434A)	Clonado para este trabajo
pET-28a-6HIStag-PTBP2(3S/A)	Clonado para este trabajo
pEGFP-C3	Addgene 6082-1
pEGFP-PTBP2	Clonado para este trabajo
pNBM470-HA	Stock del laboratorio
pNBM470-Ha-KIS	Clonado para este trabajo
pNBM470-Ha-KIS K54A	Clonado para este trabajo
pmScarlet-C1	Addgene 85044
pmScarlet-Matr3	Clonado para este trabajo
pmScarlet-hnRNPM	Clonado para este trabajo
pLKO.3-GFP shSCR	Stock del laboratorio
pLKO.3-GFP shKIS	Stock del laboratorio
pCMV-dR8.2 dvpr	Addgene 8455
pCMV-VSV-G	Addgene 8454
pGEX-GST	Stock del laboratorio
pGEX-GST-KIS	Stock del laboratorio
pGEX-GST-KIS(K54A)	Stock del laboratorio
pFlareG-PSD95 eon 18	Addgene 90266

Tabla 3. Compendio de los *primers* utilizados para realizar los constructos de la Tabla 2.

Constructo	Tipo	Secuencia 5'-3'
pcDNA3-Flag-PTBP1	<i>Forward</i>	GAATTCGATATCCATGGACGGCATCGTCCCAG
	<i>Reverse</i>	GAATTCGCGGCCGCCTAGATGGTGGACTTGGAAAAG
pcDNA3-Flag-PTBP2	<i>Forward</i>	GAATTCGATATCCATGGACGGAATTGTCACTGAG
	<i>Reverse</i>	GAATTCGCGGCCGCTTAGATTGTTGACTTGGAGAAAAG
pET-28a-6HIStag-PTBP2	<i>Forward</i>	GTGTAAGCTTGCACGGAATTGTCACTGAGG
	<i>Reverse</i>	GTGTGCGGCCGCTTAGATTGTTGACTTGGAGAAAAG
pEGFP-PTBP2	<i>Forward</i>	GATACTAGATCTCATGGACGGAATTGTCACTGAG
	<i>Reverse</i>	AGTATCAAGCTTTTAGATTGTTGACTTGGAGAAAAG
PTBP2S178A	<i>Forward</i>	GCCCAGGCTCCAGTACTTAGAATAATTATTGACAATAT
	<i>Reverse</i>	TACTGGAGCCTGGGCTGGAGTCACCGCACTCTC
PTBP2S178D	<i>Forward</i>	GCCCAGGATCCAGTACTTAGAATAATTATTGACAATATG
	<i>Reverse</i>	TACTGGATCCTGGGCTGGAGTCACCGCACTCTC
PTBP2S308A	<i>Forward</i>	GCTCCTTTGGCTATTCCAATGCTG
	<i>Reverse</i>	AATAGCCAAAGGAGCGAGAGCCCCTGGAACAGCTA
PTBP2S308D	<i>Forward</i>	GATCCTTTGGCTATTCCAATGCTG
	<i>Reverse</i>	AATAGCCAAAGGATCGAGAGCCCCTGGAACAGCTA
PTBP2S434A	<i>Forward</i>	GGGAATGCTCCACTGCACCGTTTTAAAAAACC GGG
	<i>Reverse</i>	CAGTGGAGCATTCCCAAATCTTTTGTTAGCCCTTGA
PTBP2S434D	<i>Forward</i>	GGGAATGATCCACTGCACCGTTTTAAAAAACC GGG
	<i>Reverse</i>	CAGTGGATCATTCCCAAATCTTTTGTTAGCCCTTGA
pmScarlet-Matr3	<i>Forward</i>	ACTGCTCGAGCTATGTCCAAGTCATTCCAGCA
	<i>Reverse</i>	ACTGGAATTCTTAAGTTTCCTTCTTCTGCCT
pmScarlet-hnRNPM	<i>Forward</i>	GGACTCAGATCTCGAGGCGGCAGGGGTCAAGC
	<i>Reverse</i>	GAAGCTTGAGCTCGATTAAGCATTCTATCAATTCGAA
pNBM470-Ha-KIS	<i>Forward</i>	GCGCGGAATTCGCCATGGCGGGTCCGGC
	<i>Reverse</i>	GCGCGCTCGAGTTAGGTTACTGATTAAGCAAGG
KISK54A	<i>Forward</i>	CGCCCTTGCGCAGTTCCTGCCTCC
	<i>Reverse</i>	GCAGGAAAGAACCGGTGAGCAAAGG

Extracción de RNA, RT-PCR, qPCR

La extracción de RNA se llevó a cabo con *Total RNA purification kit* (VWR cat nºR6834), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad y pureza del RNA se midió mediante electroforesis en gel de agarosa y espectroscopía mediante nanodrop. Para la retrotranscripción, hasta 1 µg de RNA se retrotranscribía a cDNA con *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche cat nº4379012001) utilizando como oligonucleótidos hexámeros al azar, a fin de cubrir toda la secuencia y evitar el sesgo a 3' producido por los oligo-dTs.

Para la cuantificación mediante qPCR se utilizó 1µL de la reacción de retrotranscripción y se amplificó mediante *JumpStart Taq ReadyMix for quantitative PCR* (Sigma cat nºD7440), mediante un protocolo de 10 minutos a 94°C y 40 ciclos de 15s a 94°C, 20s a 51°C y 30s a 72°C.

Tabla 4. Secuencia de los primers utilizados para realizar qPCR.

Las *probes* vienen conjugadas con la combinación 6xFAM-Black Hole Quencher 1.

Diana	Tipo	Secuencia 5'-3'
UHMK1	<i>Forward</i>	CAGGAATGAAGCTGAAAC
	<i>Reverse</i>	AGGTCTCTGAGGTGATAG
	<i>Probe</i>	AATTGCGGCATTCACCACTG
GAPDH	<i>Forward</i>	CGTAGACAAAATGGTGAAG
	<i>Reverse</i>	CCATGTAGTTGAGGTCAA
	<i>Probe</i>	TTGATGGCAACAATCTCCACTT
pFlareG	<i>Forward</i>	GAACCGCATCGAGCTGAA
	<i>Reverse</i>	TGCTTGTGCGCCATGATATAG
	<i>Probe</i>	ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC

Inmunofluorescencia y cuantificación de los niveles somáticos de PSD95

Los cultivos hipocampales se fijaron a los DIV deseados con paraformaldehído y sacarosa tal y como se ha explicado. Después de fijar y limpiar el paraformaldehído, las neuronas se permeabilizaron con tritón-X100 al 0.1% en PBS durante 5 minutos a 4°C, seguidamente se limpiaron tres veces con PBS y se bloquearon con *Normal Goat Serum* al 5% en PBS durante 30 minutos. El anticuerpo primario α -PSD95 (EMD Millipore, MABN68, RRID: AB_10807979) Se diluyó con un factor 1:400 en solución de bloqueo y se incubó la muestra 2 h a temperatura ambiente. Después, se limpiaron las células 3 veces con PBS y se incubó el anticuerpo secundario Alexa 488 (Life Technologies catalog #28175) o Alexa 568 (Life Technologies catalog #A10037) diluido 1:1000 en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 limpiezas con PBS se montó la muestra con una solución de glicerol al 80%.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM780, ajustando los valores de potencia del láser y del tubo fotomultiplicador para las necesidades de cada experimento, pero manteniéndolos iguales entre las condiciones problema y control.

Para cuantificar los niveles de expresión de PSD95 se tomaron fotografías a diferentes Z y, con ayuda del *software* de análisis de imagen ImageJ, se realizó la proyección máxima de las diferentes secciones. Se realizó una selección de los somas de las neuronas transfectadas y se midió la intensidad promedio en el canal de fluorescencia correspondiente a PSD95. Los niveles de expresión de PSD95 de las neuronas transfectadas fueron relativizados a los niveles de expresión de las neuronas no transfectadas del mismo campo, para así minimizar las diferencias de permeabilización y tinción dentro de cada muestra.

Transfección reversa y reportero dual pFlareG

Para la transfección reversa, a la hora se sembrar las células N2A en placas recubiertas de poli-D-lisina, se añadió el DNA conjugado con el reactivo FuGene HD. Se transfectó un total de 1 μ g de DNA con una proporción 3:7 de vector pFlareG y el constructo a co-transfectar. A las 8 horas el medio se substituyó por

DMEM con penicilina/estreptomicina pero sin FBS, a fin de favorecer la neurodiferenciación y detener, parcialmente, el crecimiento.

Los niveles de fluorescencia de las células fueron registrados in vivo a 24, 48 y 72 horas post transfección, utilizando el microscopio de campo amplio Leica Thunder Imager y aplicando un proceso de deconvolución de la imagen para facilitar el análisis de las imágenes. Los niveles de expresión de las isoformas de inclusión (GFP) y exclusión (RFP) del exón 18 de PSD95 fueron medidos como la fluorescencia total menos la fluorescencia procedente de un pocillo sin transfectar.

La ratio de exclusión/inclusión del exón 18 fue calculado en cada punto relativizándolo al control a 24h siguiendo la fórmula:

$$\text{Ratio de exclusión} = \log_2 \left(\frac{RFP}{GFP} \right)_{x,t} - \log_2 \left(\frac{RFP}{GFP} \right)_{\text{control}, 24h}$$

Donde x hace referencia a la muestra a analizar y t al tiempo a estudiar.

Western blot

Las células se limpiaron siempre con PBS frío antes de recogerlas en el volumen deseado de 1xSR. Una vez disueltas en SR, se sonicaron para romper las membranas y el DNA genómico. A continuación, se añadió el volumen correspondiente de 4xSS (20% sacarosa y 0.05% de azul de bromofenol) y B-mercaptoetanol al 2%. Antes de cargar las proteínas en gel de acrilamida o congelarlas, se hirvieron durante 5 minutos a 95°C. La electroforesis se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, SDS-PAGE, utilizando el sistema Miniprotean (Biorad).

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Fisher cat nº 10452792). Seguidamente, la membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% en PBS-T (0.1% Tween20 en PBS) durante una 1 en agitación y temperatura ambiente. Posteriormente se limpiaron las membranas durante 15, 10 y 5 minutos con PBS-T y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en leche en polvo al 0.25% en PBS-T. Después de otras 3 rondas de limpieza, Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido en la misma solución que el anticuerpo primario, durante 40 minutos. Después

de 3 limpiezas finales, las membranas se revelaron o bien mediante el escáner de fluorescencia Odyssey Fc o con reactivos ECL (Bio-Rad cat nº1705060) según el anticuerpo secundario utilizado.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para *Western blot*.

Anticuerpo	Dilución	Referencia
Mouse α -FLAG M2	1:500	MerckSigma, F3165
Rabbit α -Matr3	1:501	BioNova, A300-591A-T
Rabbit α -hnRNP M3/4	1:502	BioNova, A303- 910A-T
α -Mouse IRDye 680RD	1:10000	LI-COR Biosciences, 926-68070
α -rabbit HRP	1:10000	Fisher, 31460, RRID AB_228341

Inmunoprecipitación de proteínas nucleares

Para co-inmunoprecipitar proteínas de *splicing* alternativo se siguió el protocolo descrito anteriormente (54). HEK293T al 70% en placas de 100mm fueron transfectadas con un total de 12 μ g, correspondiente a 1 μ g de pEGFP, 3 μ g de pcDNA43Flag-PTBP2 y 9 μ g de pNBM470-KIS o KIS-KID. 48 horas post-transfección, se limpiaron las células con PBS y se recogieron con tampón de lisis (50mM Tris HCl pH 8, 150mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.25%NP-40, 0.05% deoxicolato sódico, 5% glicerol, 1mM EGTA, 1mM EDTA, inhibidores de fosfatasa e inhibidores de proteasas). A continuación, se incubaron los lisados con RNasa I (Fisher, 10330065) durante 3 minutos a 37°C con la finalidad de lisar el RNA y mantener solamente las interacciones directas entre proteínas.

Tras la digestión, se sonicaron las muestras y se centrifugaron 10 minutos a 12000rpm en frío. Los sobrenadantes se incubaron con un volumen deseado de resina de FLAG M2 agarosa (Sigma cat nº A2220) previamente equilibradas con tampón de lisis. LA mezcla se incubó durante 2 horas a 4°C.

Después de la incubación, la resina se recuperaba mediante centrifugación a 50g durante 1 minuto en frío y se limpió 3 veces con tampón de lisis. Finalmente, la resina se incubaba con un volumen igual de 2xSSR durante 5 minutos a 95°C

para posteriormente analizar el eluido mediante *western blot*. En el caso de querer realizar la fosforilación in vitro, la resina se equilibró con tampón BK tal y como se explica en el siguiente apartado.

Purificación de proteínas exógenas y fosforilación in vitro

La purificación de proteínas se realizó a partir de la cepa BL21 *de Escherichia coli*. Una vez transformadas con el plásmido deseado, se picaba una colonia de BL21 y se dejaba crecer, en 20mL de medio LB con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C en agitación.

Al día siguiente, se diluía el cultivo 50 veces, se añadía 10% de glicerol y se dejaba crecer en agitación a 30°C durante 2-3h hasta que el cultivo alcanzase una OD600 de 0.2-0.3. En este momento, se inducía la producción de proteína con 0.4 mM de IPTG (sigma cat nº I6758) y se dejaban crecer durante 6h a 25°C. Seguidamente, se centrifugaban los cultivos a 10000g durante 15 minutos y se congelaban los pelets a -80°C.

Al día siguiente, y teniendo en cuenta que las proteínas producidas eran GST-KIS y GST-KIS-KID, se resuspendían los pelets en tampón GSB (25mM Hepes a pH 7.5, 0.3M KCL, 1mM EDTA, 0.1%NP40 y 10% glicerol 1mM DTT, 1mM NaF, 1mM β -glicerolfosfato, 1mM EGTA, 5mM pirofosfato sódico, 1mM PMSF), se sónico en intervalos de 15 segundos al 10% de amplitud hasta que quedó totalmente lisado y se centrifugó 14 minutos a 14000rpm a 4°C para deshacernos de los residuos celulares. El sobrenadante se incubó con *beads* de glutatión-sefarosa (GE Healthcare cat no 17-0756-01) lavadas anteriormente tres veces en tampón GSB, en una relación 10 μ L *beads*/ 20mL de cultivo. Dicha incubación se realizó a 4°C durante 2 h en constante agitación. A continuación, se limpiaron las *beads* con la proteína unida centrifugando a 1000rpm durante 1 minuto a 4°C, descartando el sobrenadante y añadiendo tampón GSB, un total de 4 veces. Para la elución de las proteínas se limpió las *beads* añadiendo tampón de elución (40mM GSH, 150mM NaCL, 1mM DTT, 65mM Tris HCL, 0.1% tritón, 10% glicerol y pH 8) sin GSH. Una vez se limpiaron las *beads* tres veces, se añadió tampón de elución con GSH y se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente en constante agitación.

La concentración de proteína se testó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE), siempre utilizando el sistema de Miniprotean (Biorad), y tinción de coomassie.

Para la fosforilación in vitro, los inmunoprecipitados de proteínas nucleares fueron equilibrados en BK buffer (50mM HEPES pH 7.6, 10mM MgCl₂, 2mM DTT, 10μM ATP) y posteriormente incubados con un total de 200 μg de GST-KIS o GST-KIS-KID, 10μM ATP de ATP en buffer BK durante 30 minutos a 30 °C. tras limpiar 3 veces con tampón de lisis (50mM Tris HCl pH 8 , 150mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.25%NP-40, 0.05% deoxicolato sódico, 5% glicerol, 1mM EGTA, 1mM EDTA, inhibidores de fosfatasa e inhibidores de proteasas), se eluyeron las *beads* con un volumen igual de 2xSSR.

En el caso del ensayo quinasa con las proteínas PTBP2, se realizó de la misma manera teniendo un total de 2μg de sustrato.

ICLIP

Las células HEK293T fueron transfectadas con proteínas FLAG-PTBPs. 48h después de la transfección, las células fueron lavadas una vez con PBS y crosslinkadas con 150mJ/cm² de luz UV a 254nm en Stratalinker 2400.

Las células fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en el buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 100mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,1% SDS, 0,5% de desoxicolato de sodio, inhibidores de la proteasa y la fosfatasa). Después de la sonicación, los lisados se digirieron con 4U/mL Turbo DNase (Fisher, AM2238) y 1.5U/μL RNase I (Fisher, 10330065). Los lisados fueron clarificados e incubados con *beads* α-FLAG M2 pre-equilibradas durante 2h a 40C. Las *beads* se lavaron dos veces con buffer de lavado de alta concentración salina (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato de sodio, inhibidores de la proteasa y la fosfatasa). Seguidamente, las *beads* fueron equilibradas dos veces con el tampón PNK (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2% Tween-20) y los extremos de RNA 5' fueron marcados con [γ-³²P]-ATP y T4 PNK (NEB, M0201L) a 37°C durante 5 min. Las *beads* fueron eluidas a 70°C durante 5 minutos con el tampón de carga NuPAGE (Fisher, 11549166) y cargadas en gel de 4-12% NuPage Bis-Tris (Fischer, 10247002) para su posterior

electroforesis y transferencia a la membrana de nitrocelulosa (Merck-Sigma, GE10600003).

CLIP de PTBP2 y pFlareG

El protocolo utilizado para el ensayo CLIP del plásmido pFlareG fue esencialmente como en la sección anterior con algunas modificaciones. En resumen, las células HEK293T fueron transfectadas con el reportero pFlareG-PSD95 en combinación con vectores plasmídicos que expresan las proteínas FLAG-PTBP2 y la proteína HA-KIS. Después del *crosslink*, las células fueron resuspendidas en *buffer* de lisis más 40U/ml inhibidor de la RNasa (Attendbio, RNIG), sonicados e incubados con *beads* α -FLAG M2 afinidad gel durante la noche a 4 ° C. Las *beads* se lavaron dos veces con *buffer* de lisis, dos veces sin detergentes y una vez con *DNase buffer*. (10Mm Tris-HCl, pH 7.4, 2,5 Mm MgCl₂, 0.5 Mm CaCl₂). Las *beads* fueron digeridas con DNasa I (Merck-Sigma, DN25) durante 15 minutos y seguidamente se inactivó. Los RNA unidos a las *beads* se utilizaron como un molde para la síntesis de cDNA utilizando el kit mencionado en el apartado anterior. Se analizó la cantidad de RNA mediante qPCR. Los niveles de pFlareG fueron relativizados a los de GAPDH y normalizados en relación con los niveles de proteína FLAG-PTBP2 inmunoprecipitada, verificados por *western blot*.

FRET

Los cultivos de neuronas hipocampales fueron transfectados a 6 DIV con plásmidos biosensores para FRET mGFP-PTBP2 y pmScarlet-hnRNPM, junto con KIS o KIS^{K54A}. La imagen en vivo se realizó 16 horas después de la transfección. Las neuronas fueron tomadas en vivo utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM780 con una lente de inmersión en agua de 40x1.2. Las imágenes eran de 1024 x 1024 píxeles, con una anchura de píxel de 65 nm. En resumen, la proteína donante (mGFP-PTBP2) se excitó a 488 nm, y su emisión se midió a 490 a 532 nm. (ID). El aceptor (pmScarlet-hnRNPM) se excitó a 561 nm, y la emisión se midió en 563 a 695 nm. (IA). También medimos la señal total emitida a 563 a 695 nm cuando se excitó a 488 nm (IF) para obtener la eficiencia FRET como

$$F\% = \frac{100 * (IF - kD * ID - kA + IA)}{IA}$$

Donde k_A y k_D son los parámetros de corrección para la excitación cruzada del aceptor y la emisión residual del donante, respectivamente. La cuantificación se realizó con la ayuda de FRETmapJ, un plugin que también proporciona mapas con la señal FRET, como valor de píxel para la cuantificación local. Para los experimentos de HEK293T, las células fueron transfectadas con plásmidos que expresaban mGFP-PTBP2 y pmScarlet-hnRNPM o pmScarlet-Matr3, junto con KIS o KISK54A.

Fosfoproteoma

Células HEK293T fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP-KIS y pEGFP-KIS-KID, 48 horas post transfección. Los métodos utilizados para la preparación de muestras y la obtención de datos fueron como se describió anteriormente (103) con algunas modificaciones. En resumen, se utilizaron 100 μ g delisado total para la preparación de muestras por iFASP. La digestión con tripsina y quimotripsina se realizó en dos experimentos diferentes antes del etiquetaje isobárico mediante TMT (TMT- 126TM y TMT-131TM, Thermo Fisher). Los eluados digeridos con tripsina (Promega, V5280) y con quimotripsina, V106A, fueron luego agrupados de forma independiente. Las dos mezclas agrupadas se fraccionaron en cuatro fracciones utilizando el kit *PierceTM High pH reverse-phase fractionation* (Life Technologies, 84868), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron sometidas al enriquecimiento en fosfopeptido mediante *TiO enrichment kit* (GL Sciences, 5010-21308), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fosfopéptidos se analizaron utilizando un espectrómetro de masa *Q Exactive plus Orbitrap* (Barts Cancer Institute, London). Se utilizó software MaxQuant (versión 1.6.3.3) para el análisis de los datos crudos de espectrometría de masas y la identificación de péptidos. La búsqueda se realizó contra un archivo FASTA del proteoma de *Homo sapiens* extraído de Uniprot (2016). El análisis de los datos se realizó utilizando Perseus. (version 1.6.2.3).

El cálculo del PPS de cada proteína se realizó sumando los valores de $\log_2\text{FoldChange}$ de cada fosfopéptido. Los datos sobre fosfopéptidos publicados en el estudio de Vieira-Vieira y colaboradores (104) fueron descargados y el *delta score* (tal y como se describe en el artículo) se recalculó de nuevo utilizando el promedio de abundancia aquellos fosfopéptidos que se encontraban en más de un replicado. Seguidamente se calculó el delta-PPS utilizando el sumatorio del *delta score* de cada fosfopéptido en \log_2 para poder obtener la lista de proteínas cuya fosforilación permite mayor unión al mRNA (delta-PPS positivo) o menor unión (delta-PPS negativo).

Los mapas de interacciones se realizaron seleccionando las 120 proteínas con los fosfopéptidos más enriquecidos al transfectar KIS y utilizando la base de datos STRING con la configuración por defecto. El mapa se dividió en tres *clusters* de interacciones utilizando el algoritmo de *kmeans clustering* con un valor de $k = 3$.

RNaseq

El RNA de los cultivos neuronales fue extraído a los días pertinentes y se comprobó la integridad de este mediante electroforesis en gel de agarosa, asegurando una ratio 18s/16s de mínimo 1.

Los mRNA fueron secuenciados en BGI utilizando el tipo de librería *DNBSEQ Eukaryotic Strand-specific mRNA library* para *reads* de 100 pares de base en *paired end*. Todas las muestras fueron secuenciadas con una profundidad de 90 millones de *reads*. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el paquete de R Rsubread(105) y la función `align()` sobre el genoma de ratón mm10. Seguidamente los *reads* mapeados se asignaron a cada exón o gen utilizando la función `FeatureCounts()`, especificando el parámetro `useMetaFeatures = TRUE` para asignar los *reads* a genes y el `useMetaFeatrues = FALSE` para asignar los *reads* a exones, en ambos casos se tuvieron cuenta aquellos exones/genes que tenían un mínimo de 5 *reads* en todas las muestras, así como los genes con solo 1 exón. Una vez obtenidos los *counts* por gen y exón, estos se relativizaron a FPKM y se calculó el SI de cada exón, dividiendo los FPKM exónicos entre los FPKM del gen. En un principio el SI está definido como la expresión de un exón respecto a los al promedio de expresión de los exones constantes del gen (aquellos que están presentes en al menos el 75% de las isoformas descritas) (106,107). Para evitar los sesgos por las notaciones, y asumiendo un incremento de la variabilidad, se prefirió utilizar los valores de expresión del gen para relativizar la expresión exónica. Los cálculos de enriquecimiento en diferentes categorías de *Gene Ontology* se realizaron utilizando la base de datos STRING.

Para el calcular los cambios de expresión génica o exónica, se transformaron los datos de SI a Log_2SI para que a la hora de realizar un t-test la diferencia de las medias representas el cambio en la ratio entre condiciones.

El filtraje de los exones en las muestras shKIS se realizó utilizando el factor Fano, el cual se calcula como:

$$F(x) = \frac{\sigma_x^2}{\mu_x}$$

Se seleccionaron los exones que mostraron un factor fano menor a 0.0005 El cálculo de la expresión exónica se realizó relativizando cada exón en las

muestras shKIS al promedio del mismo exón en las muestras shCtrl. A continuación se calculó el FDR con un t-test modificado añadiendo el parámetro de variación de fondo $s_0=0.1$ (108).

La expresión a lo largo del desarrollo de los genes reguladores del *splicing* se realizó utilizando el *Gene Ontology* de *regulation of RNA splicing* GO:0043484 en las muestras de neuronas a 7 y 18 DIV. Se calculó la expresión génica mediante un two-sample t-test asumiendo homocedasticidad. Aquellos genes con un FDR menor a 0,1 y un valor absoluto de *Log2FoldChange* mayor a 0,5 fueron también estudiados en las muestras shCtrl y shKIS.

Los los datos del estudio del knock-out de PTBP2 (109), pertenecientes al estudio GSE84803, fueron descargados y re-analizados como el resto de muestras presentes en este estudio. Este *dataset* consta de dos replicados para cada condición (muestras control y *knockout*), como GSEA necesita tres replicados para poder aplicar el algoritmo de *noise2signal ratio* (explicado en el apartado de GSEA), se simuló una tercera muestra utilizando, para cada exón, un muestreo aleatorio en una distribución normal con el promedio y la desviación correspondiente a los del exón en los dos replicados de origen.

GSEA

Para estudiar la distribución de exones y proteínas en las diferentes muestras se utilizó el programa GSEA en su versión 4.2.3.

El análisis del enriquecimiento de las diferentes categorías de *Gene Ontology* sobre los datos del fosfoproteoma de KIS se realizó utilizando el conjunto de datos *c5.all.v7.5.1.symbols* descargado a través del mismo programa GSEA. Los datos fueron analizados utilizando 1000 permutaciones a nivel de *gene_set* y utilizando *Diff_of_Classes* como métrica para ranquear las proteínas.

Para analizar la distribución de las proteínas fosforiladas presentes en el estudio de Viera-Viera dentro del fosfoproteoma de KIS, se realizaron dos listas de proteínas: una con las 100 proteínas cuya fosforilación favorece más la unión a mRNA (top 100 proteínas con un delta-PPS positivo) y otra con las 100 proteínas cuya fosforilación impide más la unión a mRNA (top 100 proteínas con un delta-PPS negativo). A continuación, se repitió el análisis con las condiciones mencionadas anteriormente.

Para la obtención de las listas de interactores físicos e interactores funcionales y físicos de PTBP1 y PTBP2 se utilizó la base de datos STRING, haciendo una búsqueda de interactores con las especificaciones: *Network type - physical subnetwork (NO textmining, YES Experiments, YES Databases)* o *full string network* (para físicos y funcionales), *Max number of interactors show – no more than 50 interactors*. Para todos los casos se obtuvieron 50 interactores por lista, excepto para los interactores físicos de PTBP2 donde solo se obtuvieron 22.

El análisis de los datos procedentes de RNAseq se realizó aplicando 1000 permutaciones a nivel de *gene_set* y utilizando *Signal2Noise* ratio como métrica para ranquear la expresión de los exones, la cual se introdujo como input en Log2SI. *Signal2Noise* ratio es una métrica proporcionada por GSEA donde se calcula la diferencia de los promedios de las condiciones a testar (dando el *Log2FoldChange* SI) y se escala a la desviación estándar de las muestras. Las listas de top100 exones inhibidos y top100 exones activados por PTBP1 o PTBP2 se extrajeron de Vuong 2016 (109).

$$Signal2Noise = \frac{\mu A - \mu B}{\sigma A + \sigma B}$$

Para simular la muestra aleatorizada del experimento *knockdown* de KIS, para cada exón se simularon 6 muestras de una distribución normal el promedio y la desviación de las 6 muestras (3 shCtrl y 3 shKIS).

Resultados

KIS regula el *splicing* alternativo de exones relacionados con el desarrollo neuronal

Sustentados por los datos de localización (96) y estructura de KIS (92), como primer objetivo de este estudio, se quiso investigar la posible implicación de KIS en la regulación del *splicing* alternativo en neuronas y su posible relevancia en el desarrollo neuronal. La quinasa KIS pertenece es codificada por un gen cuya expresión, en el sistema nervioso de ratón, se ve incrementada en la etapa adulta (93). En cultivos primarios de neuronas corticales, su expresión a nivel de mRNA incrementa hasta alcanzar su nivel máximo a día 10 in vitro (**Figura 11A**), siguiendo el patrón común en las proteínas relacionadas con la maduración y plasticidad neuronal (110–112).

Con el fin de estudiar si KIS regula el *splicing* alternativo durante el desarrollo neuronal, se infectaron neuronas corticales con lentivirus que expresan un shRNA control (shCtrl) o un shRNA contra KIS (shKIS), produciendo una reducción de la expresión de KIS del 80% (**Figura 11B**). Junto a las muestras de neuronas infectadas, se obtuvieron muestras de neuronas a 7 y 18 DIV y, conjuntamente, se realizó un RNAseq de las diferentes muestras.

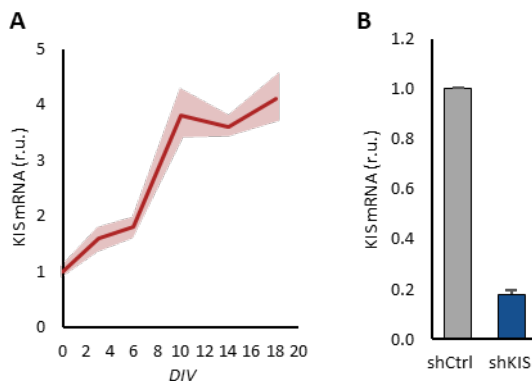


Figura 11. Expresión del mRNA de KIS en cultivos primarios de neuronas corticales.

A. Expresión de KIS en cultivos de neuronas corticales de ratón E17.5 a lo largo del desarrollo. Las muestras fueron recogidas a diferentes días in vitro (DIV) y analizadas por qPCR. Los niveles de expresión fueron relativizados a Gapdh. El gráfico muestra el promedio y la desviación estándar (n=3). **B.** Expresión de KIS en neuronas corticales a 18 DIV infectadas con shCtrl o shKIS. Los

niveles de expresión fueron analizados igual que en A. El gráfico muestra la expresión promedio y la desviación estándar (n=3).

El análisis de los cambios de *splicing* alternativo en las muestras secuenciadas se realizó mediante un estudio del exoma utilizando el parámetro *Spliced Index* (SI) (106,107). Este parámetro representa la expresión relativa de cada exón y se calcula utilizando los datos de expresión de cada exón en referencia a los datos de expresión del gen al que pertenece.

$$SI_{exon} = \frac{FPKM_{exon}}{FPKM_{gen}}$$

El análisis del RNAseq resultó en un total de 153672 exones detectados en un total de 19788 genes, después de aplicar los filtros de exclusión. Al analizar el exoma de las muestras infectadas, encontramos una gran variabilidad entre los replicados. Aun así, cuando estudiamos el conjunto de genes donde la presencia de KIS (shCtrl) implica un incremento del \log_2 *Fold Change* ($SI_{shCtrl/shKIS} > 1$) (**Figura 12A**), encontramos un enriquecimiento significativo en genes relacionados con sinapsis (**Figura 12B**) como son *Campsap1* y *Ncam1* (**Figura 12 C y D**).

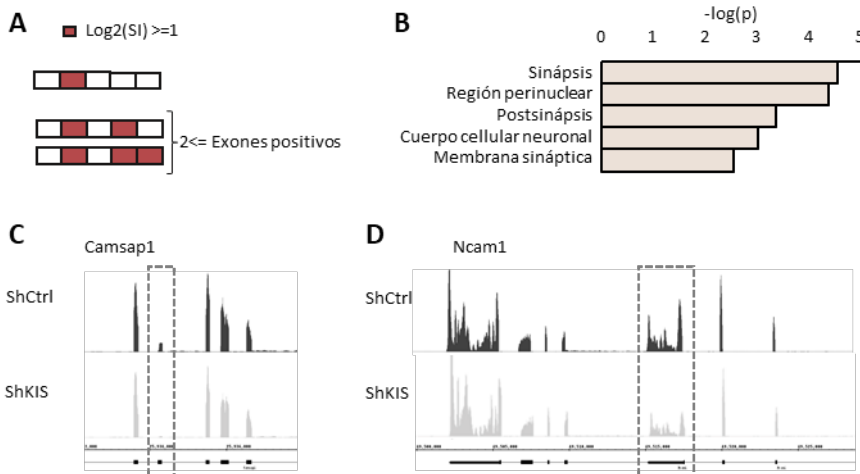


Figura 12. KIS regula la inclusión de exones relacionados con la plasticidad sináptica.

A. Esquema de la selección de genes con más de un exón regulado por KIS. **B.** *Gene Ontology Enrichment* análisis de los genes seleccionados según A. Se muestran las categorías con un FDR < 0.1. **C y D.** Visualizaciones mediante IGV de los exones regulados por KIS en *Campsap1* (Exón 17) y *Ncam1* (Exón 16).

Para minimizar el impacto de esta variabilidad y poder abstraer un conjunto de exones regulados, se filtraron los datos utilizando el factor Fano, el cociente entre la desviación estándar y el promedio, en muestras las shKIS. Se aplicó un límite de factor Fano < 0.0005 , resultando en un total de 8457 exones. Para la detección de los exones que muestran un cambio de expresión significativo, se relativizaron las muestras shKIS con el promedio de las muestras shCtrl estudió la significancia mediante *one-sample t-test*.

Con el fin de comprobar que los exones con un cambio significativo no son artefactuales debido al filtraje por el factor Fano, se aleatorizaron las muestras utilizando el promedio de expresión de cada exón en las seis muestras (tres shCtrl y tres shKIS). De esta manera, se repitió el proceso, seleccionando el mismo número de exones, y se estudió la diferencia de FDR. El gráfico de la **Figura 13A** muestra como los valores de FDR son menores en los datos experimentales respecto a los datos aleatorizados, señalando que exones que muestran cambios significativos son fruto de las condiciones experimentales testadas y no al método de filtraje y análisis.

El análisis identificó un total de 1141 exones para los cuales la presencia de KIS (shCtrl) favorece su inclusión, así como 1106 exones significativamente expresados en el *knockdown* (shKIS) (**Figura 13B**). Cuando se analiza el conjunto de exones up-regulados por KIS, encontramos un enriquecimiento en genes relacionados con proteínas de unión a RNA, genes de la familia de receptores GABAérgicos y proteínas de unión a RNA (**Figura 13C**).

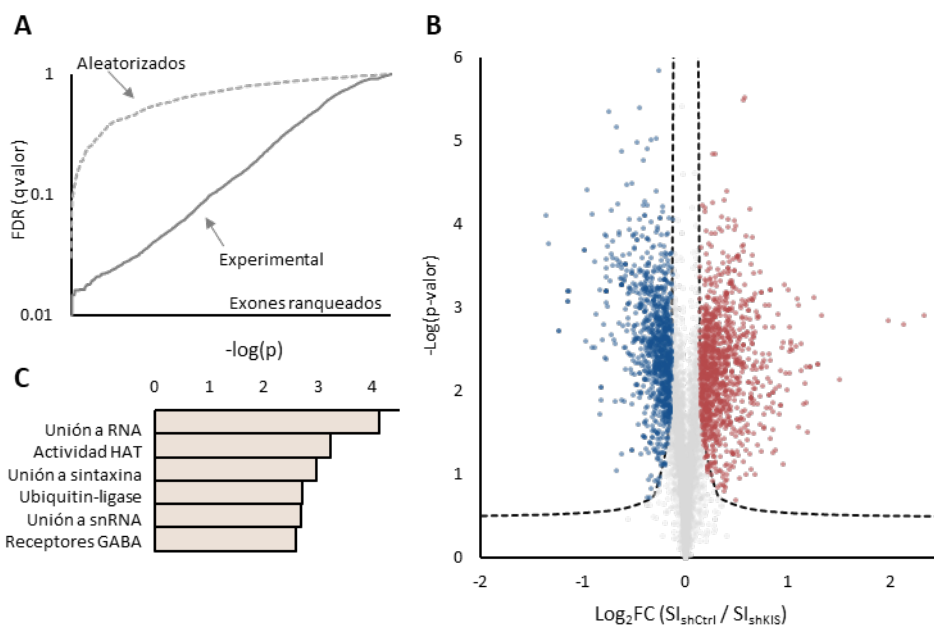


Figura 13. Los exones regulados por KIS pertenecen a genes de unión a RNA y la familia de receptores GABA.

A. Ranking de valores de FDR obtenidos en el experimento del *knockdown* de KIS, así como los datos randomizados. **B.** *Volcano plot* sobre el conjunto de exones filtrados mediante el factor fano. En rojo se señalan los exones significativamente sobreexpresados en presencia de KIS (shCtrl) y en azul los exones que muestran una reducción significativa de su expresión. **C.** *Gene Ontology Enrichment* análisis de los genes con exones up-regulados por KIS.

Con el objetivo de identificar si la actividad de KIS se ve implicada en los cambios de *splicing* alternativo relacionados con el desarrollo neuronal, se estudió la distribución de los 100 exones más *up*-regulados y más *down*-regulados en presencia de KIS en las muestras de neuronas corticales a 7 y 18 DIV. Para realizar este análisis se utilizó el método de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA).

GSEA es un método computacional en el que se comparan dos conjuntos de muestras de carácter ómico y se determina si un conjunto definido de elementos se encuentra sobrerrepresentado en alguna de las condiciones. Estos elementos pueden ser genes, proteínas, exones, entre otros, que pertenecen a una categoría de GO o cualquier otro conjunto deseado. En este caso, los conjuntos de datos corresponden a los exones *up/down*-regulados por el shKIS. Para ello, se comparan las dos condiciones utilizando métricas

como el *foldchange*. Seguidamente se ordena cada elemento según su valor y se estudia la distribución de los conjuntos a analizar, obteniendo el *Enrichment Score* (ES). A continuación, esta distribución se compara con la obtenida cuando se aleatorizan los elementos dentro de las condiciones testadas y se obtiene el *Normalized Enrichment Score* (NES). Este parámetro representa numéricamente qué tan bueno es el enriquecimiento encontrado y nos permite comparar el valor de enriquecimiento entre conjuntos de datos de distinto tamaño. Si los valores de NES son mayores a 1 significa que tenemos un enriquecimiento positivo, si los valores son menores a -1, un enriquecimiento negativo. Los valores comprendidos entre -1 y 1 suelen considerarse poco enriquecidos.

En la **Figura 14** se muestran los *barcode plots* resultantes del análisis. Estos gráficos representan los exones presentes en el RNAseq de 7 vs 18 DIV, ordenados según el valor de *log2 fold change* y cada barra señala la posición de un exón que pertenece a la categoría testada, exones *up*-regulados por el en presencia de KIS. Además, se adjuntan la curva de enriquecimiento, que muestra una idea del total acumulado de exones de esa categoría a lo largo de la muestra.

El análisis muestra como los exones *up*-regulados en presencia de KIS están enriquecidos en las muestras de neuronas corticales a 18 DIV, con un NES de 2.22 y un FDR menor a 0.001 (**Figura 14**). Esto sugiere que KIS es necesaria para el correcto cambio en el patrón de *splicing* a lo largo del desarrollo. El conjunto de exones *down*-regulados por KIS no mostró ninguna distribución significativa (datos no mostrados)

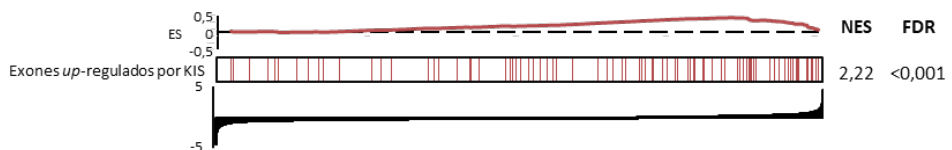


Figura 14. KIS regula un conjunto de exones relacionados con el desarrollo neuronal.

Barcode plots del top 100 exones *up*-regulados por KIS (shCtrl vs ShKIS) sobre el RNAseq de neuronas a 7 y 18 DIV. En el gráfico se muestra, también, la curva de enriquecimiento.

Se conoce que, a lo largo del desarrollo, el patrón de expresión de las proteínas relacionadas con la regulación del *splicing* en neuronas cambia. Algunos ejemplos son la bajada de expresión de PTBP2 (12,109,113), así como el incremento en las proteínas de la familia MBNL (62,63). Estos cambios son

también mostrados en nuestras muestras de neuronas corticales a 7 y 18 DIV (**Figura 15A**). En cambio, ninguno de los reguladores de *splicing* que muestran un cambio significativo de expresión entre los 7 y 18 DIV sufren cambios tras el *knockdown* de KIS (**Figura 15B**).

Mientras que estos cambios de expresión sí son conocidos y, en parte, explican el cambio en el patrón de *splicing* los mecanismos por los cuales estas proteínas son reguladas son desconocidos. Los datos del RNAseq del *knockdown* de KIS y como los exones que KIS regula se asocian a los cambios en el patrón de *splicing* a lo largo del desarrollo, sugieren que KIS podría estar implicada en la regulación de proteínas reguladoras del *splicing* alternativo.

Estos resultados podrían indicar que los efectos observados en la expresión diferencial de exones y, por tanto, en el patrón de *splicing* alternativo producidos por la depleción de KIS podrían deberse a una regulación en la actividad de las proteínas reguladoras del *splicing* alternativo y no a cambios en la composición y expresión de estas.

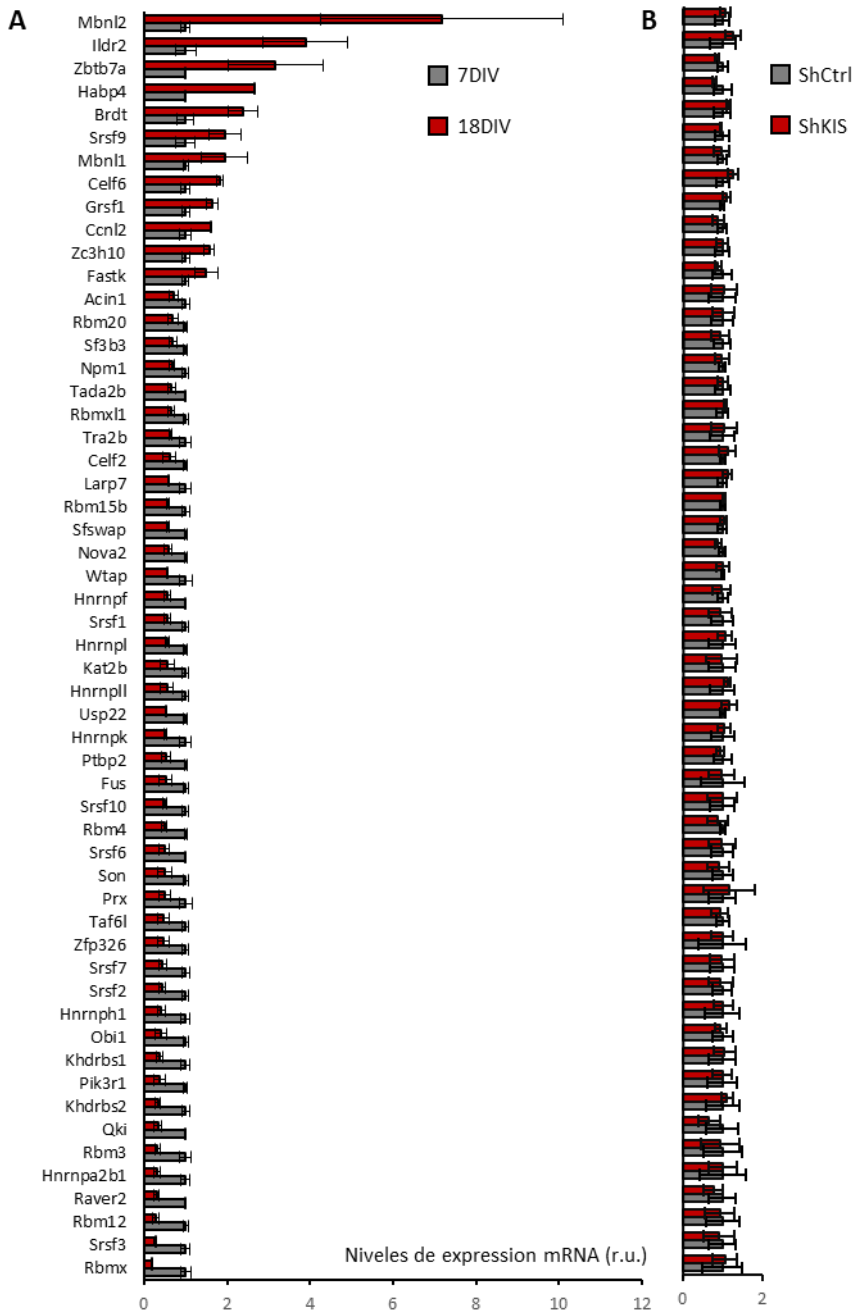


Figura 15 Los genes reguladores del *splicing* de mRNA que cambian a lo largo del desarrollo no se ven afectados por el *knockdown* de KIS.

A. Valores de expresión relativos a 7 DIV de los genes pertenecientes al GO de mRNA *splicing* regulation (GO:0043484) en las muestras de neuronas corticales a 7 y 18DIV. Los datos están filtrados para aquellos genes que presentan un valor de log2 fold change mayor a 0.5 y un FDR menor a 0.1. **B.** Valor de expresión de los genes en A en las muestras de shCtrl y shKIS. el promedio de la expresión se muestra relativo a las muestras shKIS.

KIS fosforila proteínas de *splicing* alternativo y podría regular la actividad de Ptbp2

Para estudiar si KIS pudiera estar regulando proteínas asociadas al *splicing* alternativo, se quiso describir sus dianas de fosforilación. Para ello, se realizó un análisis del fosfoproteoma de la línea celular HEK 293T transfectada con KIS y se comparó contra la transfección del mutante sin actividad quinasa KIS^{K54A} o KIS^{KID} (**Figura 16A**). Las células HEK 293T fueron utilizadas por su facilidad de transfección y manipulación. Además, estas células son capaces de expresar genes específicos de neuronas, se cree que debido a un posible origen en los tejidos de la glándula adrenal, confiriendo un linaje neuronal (114,115).

Los lisados celulares fueron digeridos con tripsina y quimiotripsina para mejorar la sensibilidad a la hora de detectar un mayor número de fosfopéptidos y marcados con TMT para que las muestras pudiesen ser analizadas simultáneamente, mejorando el cálculo de sus abundancias relativas.

Tras el análisis, 9994 fosfopéptidos fueron detectados en un total de 2743 proteínas. Entre las proteínas diferencialmente fosforiladas en presencia de KIS encontramos proteínas relacionadas con el *splicing* alternativo, como son RAVR1, hnRNPM y MATR3 (116–118), así como uno de los reguladores de *splicing* clave en el desarrollo neuronal, PTBP2(113,119). Entre estas fosforilaciones, la más abundante es la serina 308 de PTBP2 (**Figura 16B**).

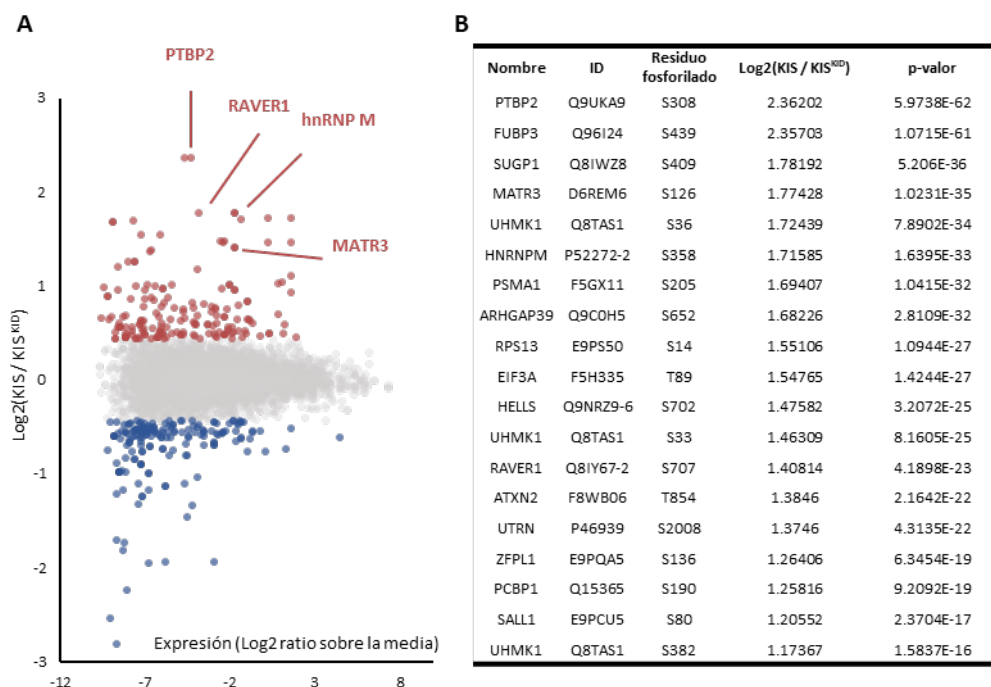


Figura 16. KIS fosforila proteínas importantes del *splicing* alternativo.

A. MA-plot de los fosfopéptidos encontrados en los proteomas de células HEK transfectadas con KIS y KIS^{KID}. En rojo se muestran las fosforilaciones enriquecidas en KIS y en azul las enriquecidas en KIS^{KID}. (n=1) **B.** Tabla representativa donde se muestran los 20 fosfopéptidos más fosforilados en presencia de KIS. La tabla contiene información de la proteína detectada, así como su ID y el residuo fosforilado. También se adjunta el valor de *Log₂ Fold Change* así como el p-valor asociado.

Para comprobar los procesos moleculares afectados por la fosforilación de KIS necesitamos un parámetro que resuma el $\text{Log}_2(\text{KIS}/\text{KIS}^{\text{KID}})$ de cada fosfopéptido en un solo valor por proteína, a fin de evitar redundancias en el análisis.

En un principio se decidió dar a cada proteína el valor más extremo entre sus fosfopéptidos detectados, siendo el que tuviera un valor absoluto de Log_2 más alto. Finalmente, teniendo en cuenta que las diferentes fosforilaciones de una proteína suelen ir en la misma dirección (activación o inhibición) decidimos utilizar un parámetro que hemos denominado como *Phospho Protein Score* (PPS), donde el valor de cada proteína resulta de la suma de sus fosfopéptidos analizados (**Figura 17A**). Un ejemplo sería PTBP2 donde encontramos

fosforilaciones en la serina 308, con un *foldchange* de 2.36, y la serina 434, con un *foldchange* de 0.84, que combinado tiene un PPS de 3.2 .

Estudiando la correlación entre el fosfopéptido más extremo de cada proteína y su valor de PPS, encontramos una correlación significativamente positiva con un promedio de cambio del 18%. Además, el 94% de las proteínas estudiadas mantienen la direccionalidad (signo positivo o negativo) entre el fosfopéptido más extremo y el valor de PPS (**Figura 17B**).

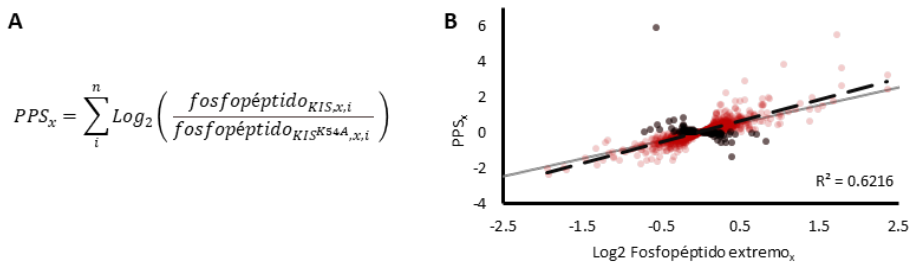


Figura 17. Definición y descripción del PPS.

A. Fórmula para el cálculo de la métrica PPS. El cálculo se realiza para cada proteína (x), teniendo en cuenta el sumatorio de cada uno de los fosfopéptidos analizados (i) sobre el total(n) **B.** Comparación, a nivel de proteína (x), entre el fosfopéptido con un valor de *Log2 fold change* más extremos (en positivo o negativo). En rojo se muestran todas las proteínas y en negro (18%) aquellas cuyo signo en el PPS es diferente al del fosfopéptido más extremo.

Una vez categorizadas las proteínas según su PPS, siendo las más positivas las proteínas más fosforiladas en presencia de KIS y las más negativas, las más fosforiladas en presencia de KIS^{KID}, se realizó un análisis de enriquecimiento en categorías de *Gene Ontology* (GO) utilizando el método de GSEA.

Este análisis resultó en un total de nueve categorías de GO enriquecidas en KIS (enriquecimiento positivo) con un *False Discovery Rate* (FDR) menor a 0.05 entre las cuales se destacan las categorías de *splicing*, regulación del *splicing* y unión a mRNA. En cambio, no encontramos ningún enriquecimiento significativo en las fosforilaciones más abundantes al sobreexpresar KIS^{KID} (**Figura 18**).

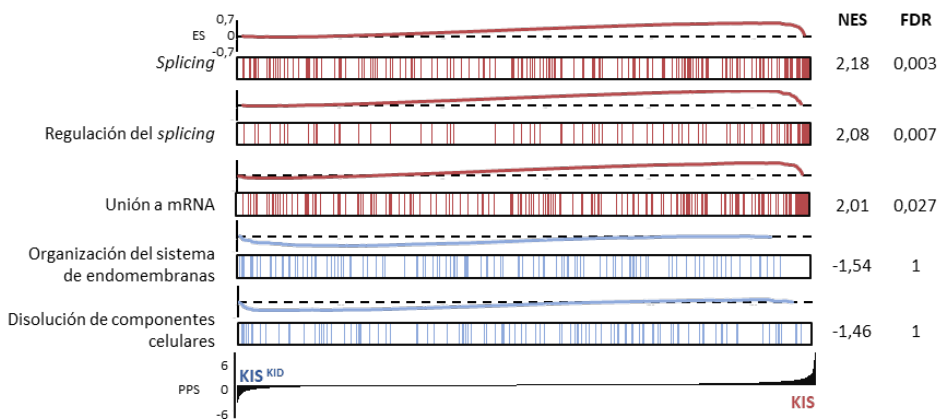


Figura 18. Entre las dianas de fosforilación de KIS existe un enriquecimiento de proteínas relacionadas con el *splicing* y su regulación.

Barcode-plots para diferentes categorías de *Gene Ontology* y sus correspondientes curvas de enriquecimiento, tras el análisis mediante GSEA. En rojo se muestran las categorías con un NES positivo y en azul las categorías con un NES negativo.

Con el fin de averiguar cómo la fosforilación de KIS puede afectar a sus dianas, se utilizaron los datos publicados en el artículo de Vieira-Vieira et al., 2022 (104). En este trabajo los investigadores utilizan la línea celular HEK 293T para determinar la capacidad de unión a RNA de diferentes RBP. Para ello, realizan un *crosslink* de RNA-proteína mediante luz ultravioleta y, posteriormente, precipitan el mRNA utilizando *beads* de *polyT*. A continuación, analizan el precipitado y el input para determinar con qué eficiencia precipitan las proteínas de unión a RNA. A su vez, realizan un enriquecimiento en fosfopéptidos para determinar cómo afecta cada fosforilación a la unión a RNA de las diferentes RBPs.

Como los métodos de digestión y marcaje de los fosfopéptidos son distintos entre este trabajo y nuestro estudio, decidimos reanalizar los resultados publicados para obtener el delta-PPS de cada proteína. En este caso, un delta-PPS positivo indica una mayor unión a mRNA cuando la proteína está fosforilada y un delta-PPS negativo una menor unión.

Para comprobar que las posibles relaciones encontradas no se deben a un sesgo en el cálculo del PPS, se estudió la correlación entre el número de péptidos encontrados por cada proteína y su valor de PPS (**Figura 19A y B**). El análisis de

correlación muestra una baja dependencia entre el número de péptidos y el valor de PPS dando unos valores de correlación (R^2) entre 0,26 y 0,1.

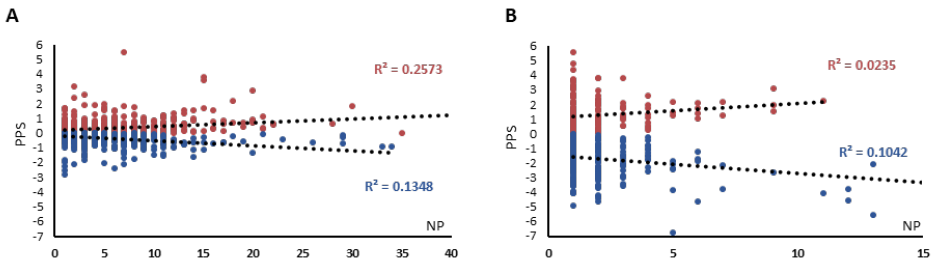


Figura 19. El valor de PPS no muestra una dependencia por el número de péptidos.

A. Estudio de la correlación entre el número de péptidos (NP) y el PPS en las muestras de HEK 293T fosforiladas por KIS y KIS^{K1D}. En rojo se muestran los valores de PPS positivos (más fosforilados en presencia de KIS) y en azul los negativos (más fosforilados en presencia de KIS^{K1D}). **B.** Igual que A, utilizando los datos publicados en Vieira-Vieira et al., 2022. En rojo se muestran los valores de delta-PPS positivos (mayor unión a mRNA al estar fosforilado) y en azul los negativos (menor unión a mRNA al estar fosforilados)

Con el propósito de estudiar si entre las dianas de KIS existe una fosfodependencia en su unión a mRNA, los datos de Vieira-Vieira y colaboradores fueron divididos en dos categorías: más unión a mRNA (el top 100 de proteínas con un delta-PPS positivo) y menos unión a mRNA (el top 100 de proteínas con un delta-PPS negativo) y se realizó un análisis de enriquecimiento mediante GSEA sobre el fosfoproteoma de KIS (en PPS).

En la **Figura 20** se muestra como entre las proteínas fosforiladas por KIS existe un enriquecimiento significativo en aquellas cuya fosforilación disminuye su unión a mRNA (NES = 1.93, FDR = 0), hecho que no encontramos para las proteínas fosforiladas con mayor unión a mRNA (FDR = 1). Aunque en el estudio de Viera-Viera et al. no se detectan fosforilaciones en PTBP2, la proteína con el fosforesiduo más fosforilado por KIS, entre las proteínas fosforiladas por KIS y que muestran una menor unión al mRNA al ser fosforiladas encontramos algunos interactores de PTBP1/2 como son MATR3 y hnRNPM (55,120)

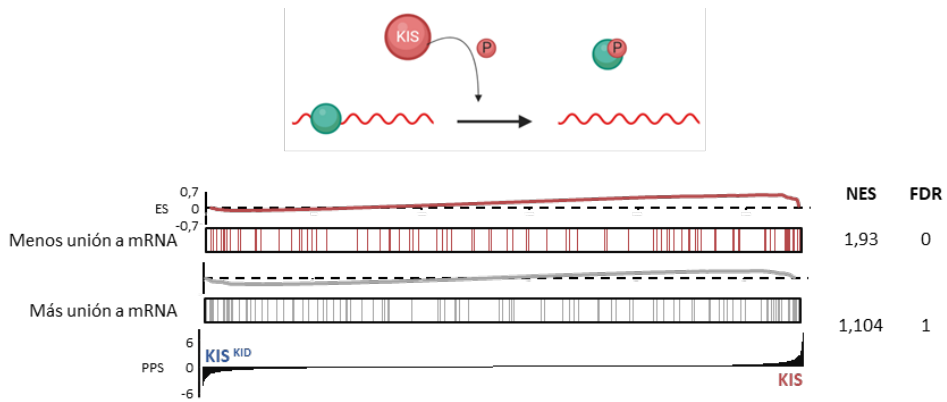


Figura 20. Entre las dianas de KIS hay un enriquecimiento en proteínas cuya fosforilación inhibe la unión a mRNA.

Barcode-plots de las categorías extraídas del estudio de Vieira-Vieira et al., 2022 y sus correspondientes curvas de enriquecimiento tras el análisis utilizando GSEA.

En vista de los resultados obtenidos, parece que KIS está implicado en los mecanismos de *splicing*, además de ser capaz de inhibir la unión a mRNA de algunas de sus dianas, tal y como está descrito para SF1 (91). Estos resultados sugieren que KIS podría jugar un papel en la regulación del *splicing* alternativo inhibiendo algunos de sus reguladores.

PTBP2, la proteína que presenta el péptido con mayor fosforilación en presencia de KIS (**Figura 16B**), es una proteína reguladora del *splicing* alternativo y está altamente implicada en el proceso de neurodiferenciación. En cultivos primarios, a 0 DIV los niveles de PTBP2 son bajos (dado que su expresión se ve reprimida por PTBP1), y a medida que la neurona se desarrolla, sus niveles van en aumento, alcanzando un máximo a 5 DIV. A partir de este momento los niveles de PTBP2 disminuyen hasta 10 DIV donde la expresión se estabiliza. Estos cambios en el patrón de expresión de PTBP2 modifican el patrón de *splicing* permitiendo que las neuronas maduren y se desarrollen correctamente. En ratón los niveles de PTBP2 incrementan durante los días E14 y E18 y comienzan a disminuir en la etapa postnatal (12,109,113). Justo lo contrario ocurre con KIS, cuya expresión aumenta en el cerebro postnatal (93).

Debido a las fosforilaciones encontradas y al patrón inverso de expresión, hipotetizamos que KIS podría estar regulando el remanente de PTBP2 que queda a medida que las neuronas avanzan en el desarrollo. Para testar esta relación se

quiso estudiar la distribución de los exones regulados por PTBP2 en las muestras del RNAseq del *knockdown* de KIS.

En el estudio publicado para del *knockout* de PTPBP2 (109) el parámetro utilizado para estudiar el *splicing* de cada exón es el denominado *Percentage of Spliced In* (PSI), el cual se basa en los *reads* secuenciados que corresponden a las uniones entre exones. En nuestro caso, durante el estudio del *knockdown* se decantó por utilizar el SI debido a la profundidad de nuestro RNAseq y al poder tener en cuenta todos los *reads* presentes en cada exón, no solo los que pertenecen al as *exón-junction*.

De esta forma, para validar nuestro parámetro, se reanalizó el RNAseq presente en el trabajo de Vuong et al., 2016 calculando la expresión de cada exón mediante SI. En este artículo, se estudiaron los cambios de *splicing* alternativos producidos por los *knockout* de PTBP1 y PTBP2 y se clasificaron los exones regulados por cada uno de estos genes. De este modo, se calculó la expresión de cada exón en SI y, seguidamente, se realizó un análisis de enriquecimiento mediante GSEA. Para ello, se utilizaron los exones publicados como Exones Inhibidos por PTBP2 (top 100) y Exones Activados por PTBP2 (top 50) pertenecientes al mismo artículo y cuyos valores de expresión están calculados en PSI.

Tras el análisis, se observa una correlación significativa entre los datos publicados y calculados por PSI (109) y los datos reanalizados utilizando el SI, siendo de -2,74 para los exones inhibidos por PTBP2 y de 2,12 para los exones activados por PTBP2 (**Figura 21**). Cabe mencionar que, aunque los datos de enriquecimiento son favorables, el patrón de expresión no es exacto entre las dos metodologías. Esto es algo esperable ya que se ha reportado en estudios donde se utilizan diferentes metodologías para analizar el *splicing* alternativo, que estas siempre muestran cierta variabilidad (121).

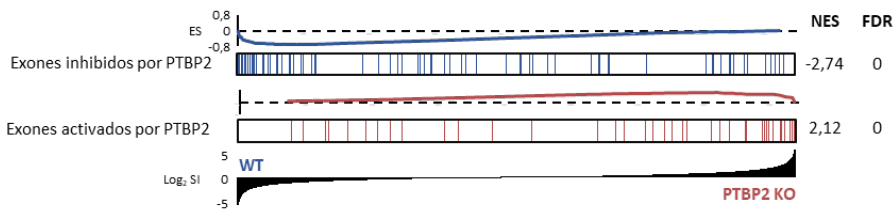


Figura 21. El cálculo de la expresión exónica mediante SI muestra una buena correlación respecto al PSI.

Barcode-plots y gráficas de enriquecimiento de las categorías extraídas de Voung et al., 2016 calculadas en PSI y analizadas sobre los mismos datos calculados mediante SI.

A continuación, se testó la distribución de los exones regulados PTBP2 sobre el RNAseq del *knockdown*. Dado que el GSEA es una técnica que precia la distribución sobre una población de elementos (exones), se decidió usar la población entera de exones presentes en el RNAseq de KIS, sin el filtraje por el factor Fano, con la finalidad de poder trabajar con la mayor cantidad de información posible. **La Figura 22A** muestra como los Exones Inhibidos por PTBP2 están enriquecidos significativamente en las muestras infectadas con shCtrl, sugiriendo una menor actividad de PTBP2 en presencia de KIS. Este estudio de enriquecimiento también se llevó a cabo con los exones activados por PTBP2, no mostrando un enriquecimiento significativo. También se analizaron los exones específicamente inhibidos por PTBP1 (top 50), conjunto en el que no esperábamos diferencias debido a la nula expresión de PTBP1 en neuronas maduras (49).

Debido a la variabilidad en las muestras del RNAseq, decidimos diseñar un control adicional basado en la aleatorización de los valores de $\log_2 SI_{shKIS/shCtrl}$ y se repitió el análisis de enriquecimiento con los exones inhibidos por PTBP2. En este caso, la **Figura 22B**, muestra una pérdida del enriquecimiento mostrado cuando analizamos la muestra original (**Figura 22A**), aportando robustez a los datos presentados.

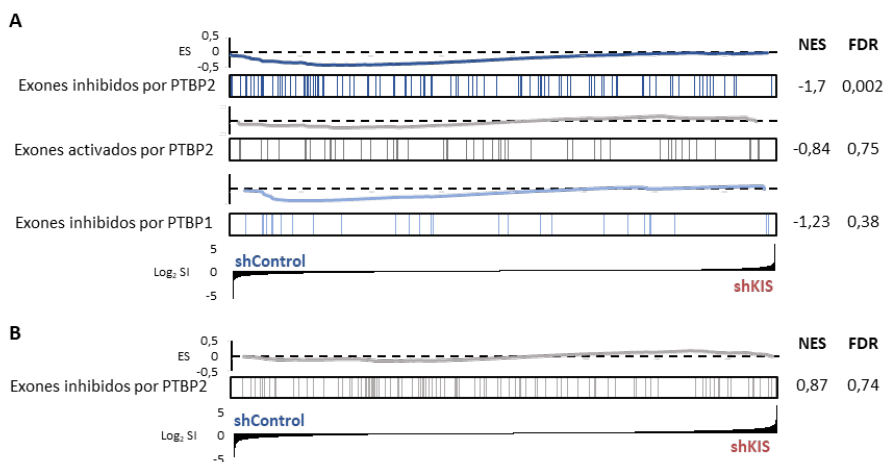


Figura 22. La expresión de KIS correlaciona con una inhibición de PTBP2.

A. Barcode-plots y curvas de enriquecimiento de los exones inhibidos y activados por PTBP2 e inhibidos por PTBP1 extraídos de Vuong et al., 2016 sobre los exones expresados en neuronas corticales infectadas con shCtrl y shKIS (n=3). **B.** Barcode-plot y curva de enriquecimiento de los exones inhibidos por PTBP2 sobre las muestras aleatorizadas en A.

Al estudiar los genes a los que pertenecen los exones inhibidos por PTBP2 más enriquecidos en las muestras shCtrl (**Figura 22A**) nos encontramos con un total de 32 genes distintos que presentan una disminución en uno de sus exones cuando *down*-regulamos KIS. Un ejemplo son el exón 2 de *Ikzf4* (**Figura 23A**) y el exón 28 de *Kmt2c* (**Figura 23B**). Dentro de este conjunto de genes encontramos un enriquecimiento significativo (FDR < 0.05) los GO de proyección celular, proyección neuronal, uniones celulares y postsinápsis (**Figura 23C**).

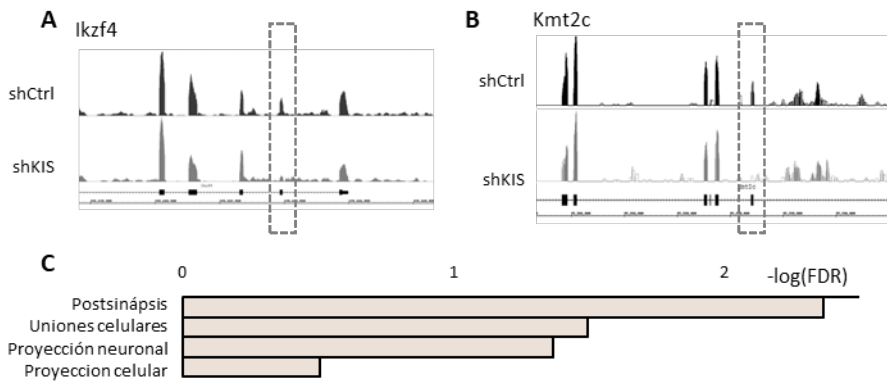


Figura 23. Los exones inhibidos por PTBP2 y modulados por la actividad de KIS se encuentran enriquecidos en funciones relacionadas procesos neuronales.

A. Visualización de los *reads* de las muestras shCtrl y shKIS mapeados sobre la región ch10:128.639.000-128.651.000. La flecha señala el exón 2 de *Ikzf4* **B.** Visualización de los *reads* de las muestras shCtrl y shKIS mapeados sobre la región ch5:25.322.000-25.339.000. La flecha señala el exón 28 de *Kmt2c*. **C.** Estudio de *Gene Ontology Enrichment* utilizando los exones inhibidos de PTBP2 que muestran un mayor enriquecimiento en las muestras shCtrl (n=32).

En conjunto, los datos de fosfoproteómica y RNAseq indican que KIS podría fosforilar PTBP2 regulando e inhibiendo su actividad. De esta forma mientras que en ausencia de KIS, PTBP2 es capaz de inhibir la expresión de ciertos exones, en presencia de la quinasa, PTBP2 es inhibido, produciendo un aumento en la expresión de estos exones (**Figura 24**).

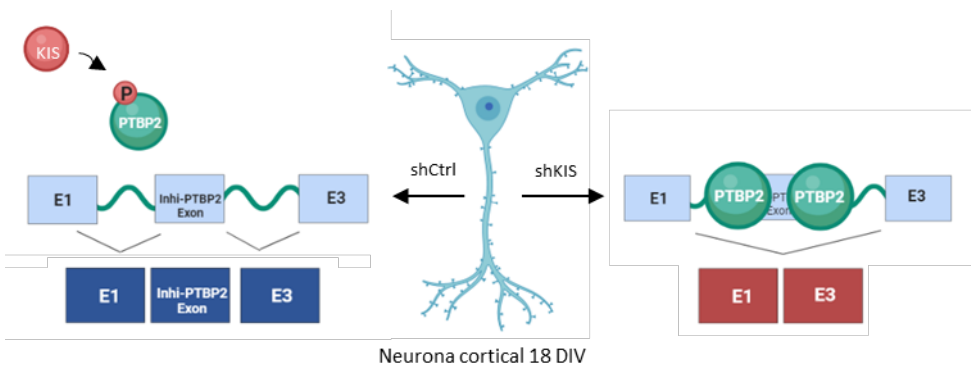


Figura 24. Modelo de inhibición de KIS sobre PTBP2.

En condiciones normales (shCtrl), KIS fosforilaría PTBP2, inhibiendo su actividad y permitiendo que los exones regulados por esta RBP se expresen. Por el contrario, cuando se fuerza la ausencia de KIS (shKIS), PTBP2 permanecería en un estado constitutivo de activación, reprimiendo la inclusión exónica.

La fosforilación de PTBP2 regula su actividad sobre PSD95

Las secuencias a nivel de proteína de PTBP1 y PTBP2 comparten una gran similitud, teniendo un 73% de identidad (**Figura 25A**). La serina 308, el residuo más fosforilado en presencia de KIS (**Figura 16B**), es específica de PTBP2, siendo una alanina en PTBP1. Esta serina se encuentra localizada en el *linker 2*, región que pertenece a la fracción mínima represora del *splicing* al menos para PTBP1 (122). Adicionalmente, también detectamos fosforilación en la serina 434 (*foldchange*: 0.85), localizada en el *linker 3* de PTBP2 y compartida con PTBP1. Al analizar la secuencia de PTBP2 buscando patrones de fosforilación de KIS (S-P-X-residuo apolar) encontramos la serina 178 de PTBP2 que se encuentra en el *linker 1* y es compartida con PTBP1. Esta última serina no se encontró en el fosfoproteoma, pero sí ha sido previamente reportada en otros estudios (123).

Para comprobar si la fosforilación de PTBP2 tiene un efecto en la regulación del *splicing* alternativo, realizamos mutaciones puntuales en las tres serinas mencionadas. Reemplazando las serinas a alaninas obtenemos el mutante fosfonulo (PTBP2^{3S/A}), correspondiente al estado no fosforilado de la proteína. Reemplazando las serinas a ácidos aspártico obtenemos el mutante fosfomimético (PTBP2^{3S/D}) (**Figura 25B**), capaz de mimetizar el estado fosforilado de la proteína gracias a las cargas negativas aportadas por los residuos de ácido aspártico. Según los resultados obtenidos anteriormente, esperaríamos que el mutante fosfomimético actuara como constitutivamente inhibido y el mutante S/A como constitutivamente activo.

Con el fin de comprobar estas fosforilaciones, se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro*, o ensayo quinasa, con los mutantes fosfonulos individuales (S178A, S308A, S434A) y triple (3S/A) en presencia de KIS. La **Figura 25C** muestra cómo, en condiciones *in vitro*, KIS es capaz de fosforilar PTBP2 pero es incapaz de fosforilar el triple mutante. De la misma forma los mutantes individuales muestran una reducción de la fosforilación donde la serina 308 parece ser la mayor contribuyente a los niveles de fosforilación de PTBP2 por parte de KIS.

A

PTBP2 1	MDGIVTEVAVGKRGSDSELLSGSVLSSPNHSSHVVTANGNDSKFKGDEKHDGAPSRV	60
PTBP1 1	MDGIV++AVG KRGSDL 5 V + P + 5+ ANGNDSKFKG+ + G PSRV	60
PTBP2 61	LHIRKLGPEVTEVIALGLPFGKVTNHLMLKGGKQAFLELATEEAAITMNVNYSVATPH	120
PTBP1 61	LHIRKLPIDVTEGEVITSLGLPFGKVTNHLMLKGGKQAFIENHTEEAANTMNVNYSVTPV	120
PTBP2 121	LRNQPIYIQVSHHKELKTDNITLNQRAQVLAQ-VTAVQTAN--TPLSGTTVSEAVTPAQ	177
PTBP1 121	LR QPIYIQVSHHKELKTD++ NQ V +VQ+ N S V Q	180
PTBP2 178	SPVLRRIIDNHYYPVTLVDVLHQIFSKFGAVLKIIITFTKNQFQALLQVGDVNAQAKLA	237
PTBP1 181	SPVLRRII++N++YPVTLVDVLHQIFSKFG VLKIIITFTKNQFQALLQV DPV+AQ AKL+	240
PTBP2 238	LDGQIYNACCTLRIDFSKLVNLNVKYNKSRDYTRDPLPSGDGQALDPAIAAFAKE	297
PTBP1 241	LDGQIYNACCTLRIDFSKLT+LNVKYNKSRDYTRDPLPSGD QP+LD +AAAF	298
PTBP2 298	TSLLAVP--GALPLAIPHAIAAAAAAAAAAGRVGMPGVSAGGNTVLLVSNLNEHVTPQS	354
PTBP1 299	--LSPVPHVHGALPLAI--PSAAAAAAAAAGRIATPLAGAGNSVLLVSNLPERVTPQS	353
PTBP2 355	LFTLFGVYGDVQRVKILYNNKDSALIQMADGNQSLAMHHLHGQHYGKIRIVTLSKHQT	414
PTBP1 354	LF LFGVYGDVQRVKIL+NKK++AL+QMDGNQ+QLAM+HLNG K+GK IR+TLSKHQN	413
PTBP2 415	VQLPREGDDGGLTKDFGFLHRRFKKPGSKNFQNIFFPSATLHLSNIPPSVAEEDLRTL	474
PTBP1 414	VQLPREGEDGGLTKDYGFLLHRRFKKPGSKNFQNIFFPSATLHLSNIPPSVAEEDLKL	473
PTBP2 475	FANTGGTVKAKFFQ-DHKKALLQMATVEEAIQALIDLHNYLGENHHLRVSFSKSTI	531
PTBP1 474	F++ GG VR KRFQ D KNAL+QI +VEEA+QALIDLH++LGENHHLRVSFSKSTI	531

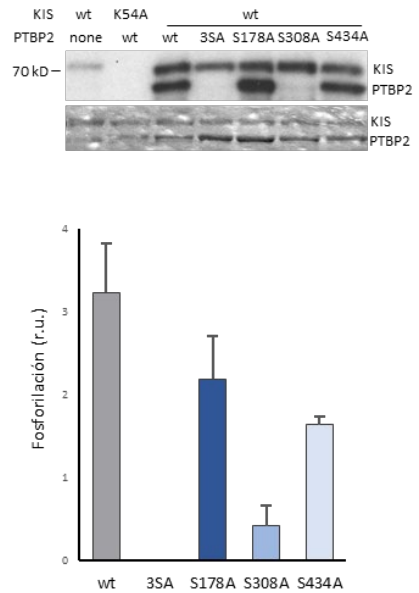
B**C**

Figura 25. Esquema de PTBP2 y localización de las fosforilaciones.

A. Resultados de Blastp entre PTBP2 (Q9UKA9-1) y PTBP1 (P26599-1). En gris se resaltan los dominios de unión a RNA RRM1, RRM2, RRM3 y RRM4, las cajas amarillas resaltan las fosforilaciones seleccionadas como reguladoras de PTBP2, todas ellas localizadas en *linkers*. **B.** Esquema de los mutantes de fosforilación de PTBP2. **C.** Ensayo quinasa in vitro de KIS sobre PTBP2 y sus mutantes. Arriba, imagen de autoradiografía de ³²-P (señal de fosforilación) e imagen de tinción de coomassie para detección de proteína total. Abajo, gráfico de barras mostrando la cuantificación de los valores de fosforilación sobre la proteína total como la media y SEM (n=3).

Uno de los genes más estudiados cuyo *splicing* se ve regulado por PTBP1 y PTBP2 es PSD95 (*post-synaptic density 95*, en inglés) (12,124). Este gen neuronal, relacionado con el crecimiento de espinas dendríticas así como su maduración (125,126), sufre cambios de *splicing* a lo largo del desarrollo. Se conoce que tanto PTBP1 como PTBP2 tienen la capacidad de unirse a los intrones que flanquean el exón 18, impidiendo que este sea incluido en el mRNA maduro. La exclusión de este exón produce un cambio en el patrón de expresión que induce a que el mRNA se degrade mediante NMD. A lo largo del desarrollo, y a medida

que los niveles de PTBP2 disminuyen, la inclusión del exón 18 permite la expresión de la proteína madura (12).

PSD95 es una proteína localizada en la densidad postsináptica, la cual actúa como anclaje para los receptores de membrana en las espinas dendríticas. Dado que esta proteína tiene un tiempo de semivida largo (48h) (127), para poder ver efectos en sus niveles las transfecciones realizadas se tienen que mantener durante varios días. De esta forma, los cultivos primarios de neuronas hipocámpales fueron transfectados a 10 DIV y fijados a 14 DIV para poder medir los niveles de PSD95 mediante inmunofluorescencia (**Figura 26A**).

Los niveles de expresión de PSD95 fueron calculados midiendo la fluorescencia presente en el soma de las neuronas transfectadas y relativizándolo por el promedio de la fluorescencia somática de las neuronas no transfectadas, dentro del mismo campo. La sobreexpresión de PTBP2 produce una disminución significativa de los niveles de expresión de PSD95 respecto al control tal y como estaba reportado (12). Tal y como se esperaba, la transfección del mutante fosfonulo muestra una reducción de los niveles de PSD95, comportándose de manera similar a PTBP2. Siguiendo la hipótesis de la inhibición por fosforilación, la sobreexpresión del mutante 3S/D no produce cambios significativos en la expresión de PSD95 comparado con el control (**Figura 26B**). De esta forma observamos que el estado de fosforilación de PTBP2 altera su actividad sobre PSD95.

Para comprobar el efecto de KIS sobre PTBP2, se decidió repetir el experimento co-transfectando KIS con PTBP2. Tal y como se muestra en la **Figura 26C**, la co-transfección de PTBP2 con KIS produce un rescate sobre el fenotipo de disminución de PSD95 observado al transfectar PTBP2 con GFP. Este rescate es dependiente de la actividad quinasa de KIS ya que la co-transfección del mutante KIS^{KID} sigue produciendo una disminución de los niveles de PSD95 comparado con el control. De la misma manera KIS no es capaz de revertir el fenotipo cuando se co-transfecta con el mutante fosfonulo.

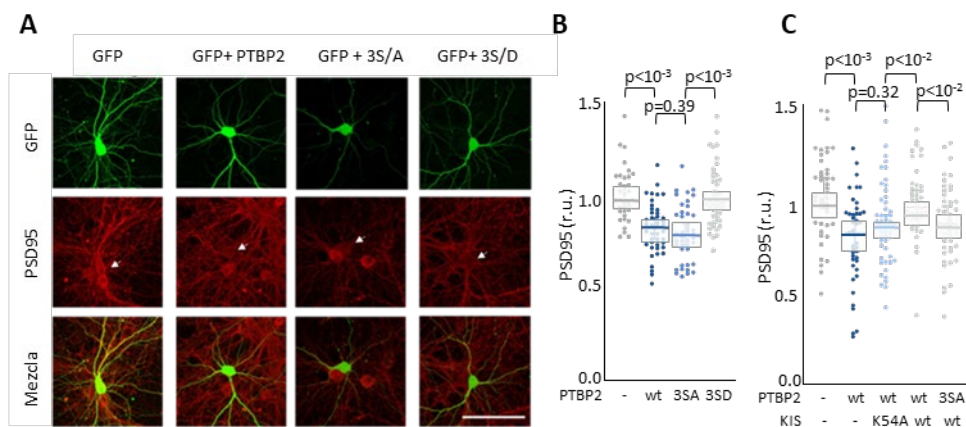


Figura 26. El estado de fosforilación de PTBP2 regula su capacidad de inhibir la expresión de PSD95 en cultivos primarios de neuronas.

A. Cultivos primarios de neuronas hipocámpales co-transfectados a 10DIV y fijados a 14DIV con GFP y Flag, Flag-PTBP2, Flag-PTBP2^{3S/A} o Flag-PTBP2^{3S/D}. En verde se muestran las neuronas transfectadas y en rojo los niveles de PSD95 por inmunofluorescencia. Las flechas blancas señalan neuronas transfectadas. **B.** *Zeppeling plot* donde se muestran los niveles somáticos de PSD95 para cada neurona transfectada en A. Se representan también la mediana y los cuartiles (n=3, 45 neuronas). Los niveles de PSD95 de las células transfectadas se relativizaron a los niveles somáticos de las neuronas no transfectadas. **C.** *Zeppeling plot* los niveles somáticos de PSD95 de cada neurona co-transfectada con KIS o KIS^{KID} en presencia de PTBP2 o el mutante PTBP2^{3S/A} (n=3, 45 neuronas). Se representan también la mediana y los cuartiles. Tanto en **B** y **C** se muestran los p-valores fruto de análisis mediante ANOVA 1 factor y múltiple t-test.

En estudios anteriores en el laboratorio, no se ha observado que la sobreexpresión de KIS produjera un incremento en los niveles de PSD95 (datos no mostrados). Dado que en cultivos maduros de neuronas hipocámpales los niveles de PTBP2 son reducidos, decidimos testar el efecto de la sobreexpresión de KIS a 5 DIV, donde encontramos una mayor expresión de PTBP2 (12,109,113) y menor de KIS (**Figura 27A**).

En este caso, la sobreexpresión de KIS, y no de KIS^{KID}, produce un incremento significativo en los niveles de PSD95 (**Figura 27A y B**), presumiblemente mediante la regulación de PTBP2 endógeno, ya que la actividad de esta proteína es la principal causa de la baja expresión de PSD95 en esta etapa del desarrollo.

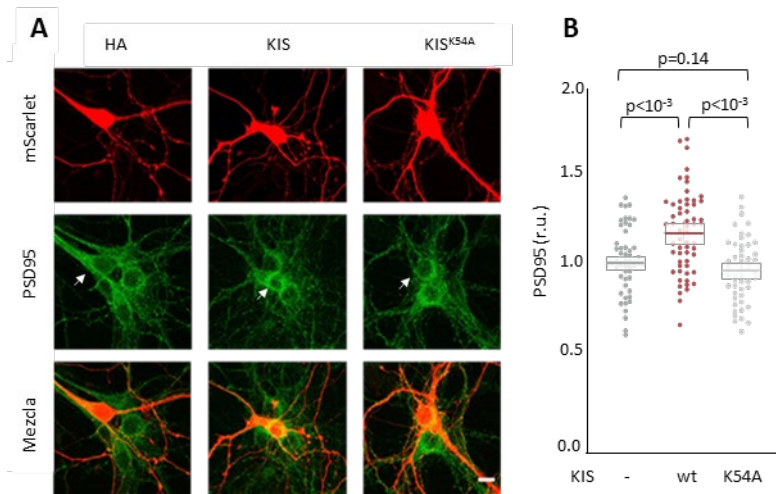


Figura 27. La sobreexpresión de KIS aumenta los niveles de PSD95 en neuronas hipocámpales inmaduras.

A. Cultivos primarios de neuronas hipocámpales co-transfectados a 5DIV y fijados a 6DIV con mScarlet y Flag, KIS, o KIS^{KID}. En rojo se muestran las neuronas transfectadas y en verde los niveles de PSD95. Las flechas blancas señalan neuronas transfectadas. **B** Zeppeling plot donde se muestran los niveles somáticos de PSD95 para cada neurona transfectada en A. Se representan también la mediana y los cuartiles (n=3, 45 neuronas). Los niveles de PSD95 de las células transfectadas se relativizaron a los niveles somáticos de las neuronas no transfectadas. Se muestran, también, los p-valores fruto del análisis mediante ANOVA 1 factor y múltiple t-test.

Pese a que se ha demostrado que los cambios de expresión de PSD95 tras la sobreexpresión de PTBP2 se deben a una mayor exclusión en el exón 18, se intentó demostrar los cambios de *splicing* mediante PCR semicuantitativa. Para ello se infectaron neuronas corticales con lentivirus a 7DIV de sobreexpresión de PTBP2 y mutantes y se recogieron a 18 DIV. De este experimento no pudimos extraer ningún resultado ya que no fuimos capaces de observar el producto de amplificación de la isoforma de exclusión del exón 18 a ciclos no saturantes para la isoforma de inclusión (datos no mostrados).

En 2013, Sika Zheng y colaboradores diseñaron un plásmido para poder testar el *splicing* del exón 18 mediante fluorescencia (124). El reportero fluorescente dual pFlareG-e18-PSD95 (abreviado como pFlareG) contiene el exón 18 de PSD95, así como 200 pares de bases intrónicas, tanto a 5' como a 3' del exón. Este reportero es capaz de sufrir *splicing*: cuando se produce la inclusión del exón 18 el mRNA resultante codifica para GFP mientras que si se da la exclusión del exón, codifica para RFP (**Figura 28A**).

Para realizar el experimento, se co-transfectó la línea celular Neuro2A (N2A) con el vector pFlareG y el constructo a testar en una relación 3:7 y se midieron los niveles de fluorescencia a las 24, 48 y 70h post-transfección. Las células transfectadas expresan tanto GFP como RFP (**Figura 28B**) y de la ratio de intensidad de estas proteínas (RFP/GFP, exclusión/inclusión) se puede deducir la actividad PTBP.

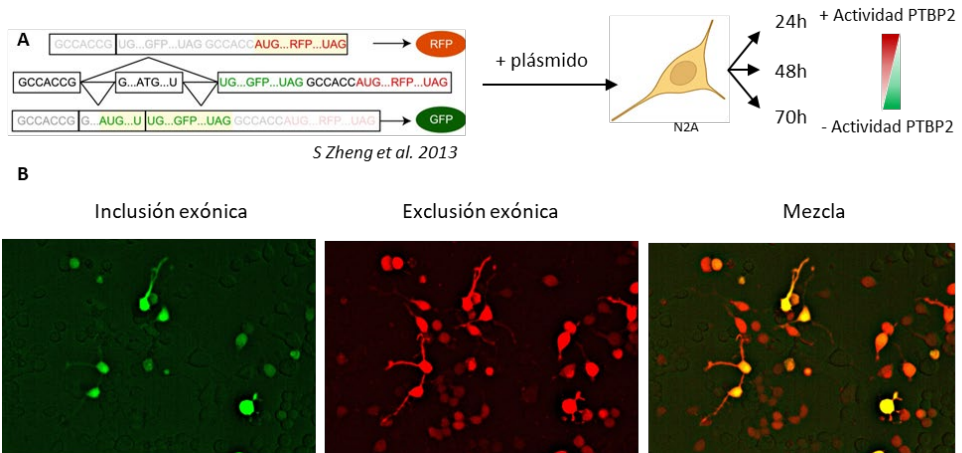


Figura 28. Descripción del reportero fluorescente dual pFlareG-e18-PSD95.

A. Esquema de los productos de *splicing* del vector pFlareG-e18-PSD95 (124) en función de la inclusión (GFP) o exclusión (RFP) del exón 18 de PSD95 y diseño del experimento de *timecourse* en células N2A. **B.** Imagen representativa de los niveles de expresión de GFP en verde (inclusión exónica) y de RFP en rojo (exclusión exónica) en N2A transfectadas con pFlareG.

En la **figura 29A** se puede observar como KIS, a las 70h post-transfección, es capaz de disminuir significativamente la ratio RFP/GFP comparado con Flag y KIS^{KID}. Esta disminución en la ratio se traduce como un aumento en la exclusión del exón 18 de PSD95 presente en pFlareG y, por consiguiente, una inhibición de la actividad PTBP2 (**Figura 29B**). Por el contrario, no encontramos cambios en la ratio RFP/GFP al transfectar PTBP2 y sus fosfomutantes (**Figura 29C**). Esta falta de fenotipo podría deberse al hecho de que las células N2A expresan PTBP1 y PTBP2 a altos niveles (128,129), desbalanceando el sistema hacia la exclusión del exón 18. Esta posibilidad se ve respaldada por el incremento de la ratio RFP/GFP a lo largo del tiempo al simplemente sobreexpresar Flag (**Figura 29A**), lo que indica que las células producen mucha más exclusión que no inclusión.

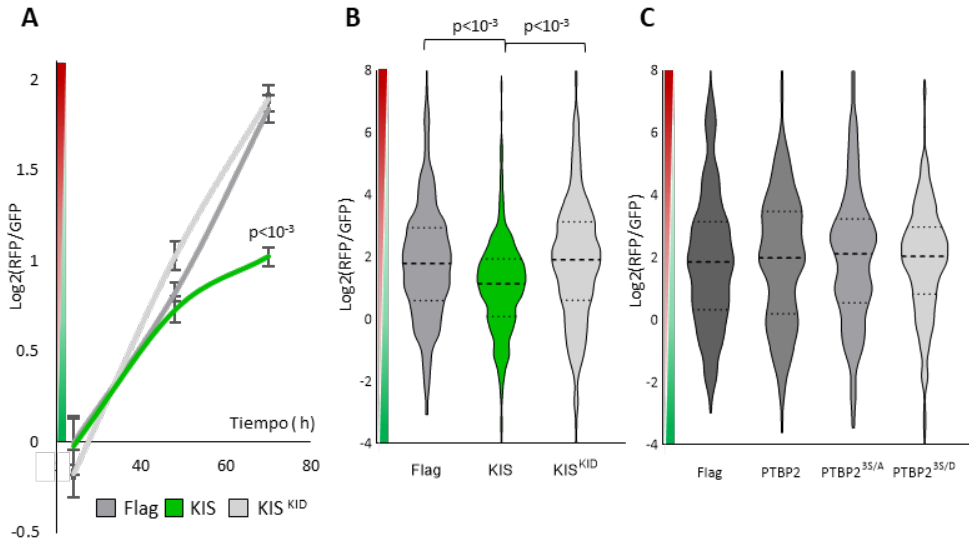


Figura 29. KIS modifica el *splicing* alternativo de pFlareG-e18-PSD95.

A. Análisis de la ratio de exclusión del exón 18 de PSD95 en células N2A a lo largo del tiempo (24, 48 y 70h) y en presencia de Flag (control) KIS o KIS^{KID}. Los resultados se muestran en líneas de crecimiento representando la media en cada punto junto al SEM (n=300 células). **B.** Gráficos de barras del punto 70h en A. **C.** Análisis de la ratio de exclusión del exón 18 de PSD95 en células N2A 70h después de co-transfectar el plásmido pFlareG junto a Flag, PTBP2, PTBP2^{35/A} o PTBP2^{35/D}. Los resultados se muestran en gráfico de barra la media en cada punto junto al SEM (n=300 células). En los gráficos A y B se adjuntan los p-valores frutos del análisis mediante ANOVA 1 factor y múltiple t-test.

Los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas hipocampales muestran como el estado de fosforilación de PTBP2 modifica su capacidad de regular la expresión de PSD95. Tal y como se describe en la hipótesis planteada gracias a los experimentos de fosfoproteoma y RNAseq, la fosforilación de PTBP2 (bien por co-transfección con KIS o el mutante fosfomimético), reprime su actividad dándose una pérdida en la regulación de la expresión de PSD95. Aunque no hemos conseguido resultados de que muestren cambios en el *splicing* alternativo para PTBP2, los resultados utilizando pFlareG en N2A muestran como la actividad quinasa de KIS es capaz de regular el *splicing* alternativo del exón 18 de PSD95, pudiendo correlacionar con una inhibición de PTBP2. Estos datos de *splicing* se ven respaldados por el aumento en la expresión de PSD95 cuando se transfecta KIS en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

KIS disocia los complejos proteína-proteína entre PTBP2-MATR3-hnRNPM así como impide su unión a RNA

Dado que el *splicing* alternativo se regula gracias a la acción sinérgica de diferentes RBP, decidimos investigar si la inhibición de PTBP2 podría deberse a una pérdida de interacciones proteína-proteína. Es conocido que su parálogo, PTBP1, es capaz de unirse a diferentes proteínas que actúan de manera sinérgica en la regulación del *splicing* alternativo (32,110,124,130) y, en algunos casos, modificando su especificidad por algunos mRNAs (55).

A fin de determinar qué proteínas podrían ser las candidatas para regular la actividad de PTBP2 tras la fosforilación de KIS, se utilizó la base de datos STRING para analizar las interacciones físicas y funcionales entre las top 120 proteínas que presentaban algún péptido significativamente fosforilado en presencia de KIS.

Uno de los parámetros que el software de STRING utiliza para determinar cómo de relacionado está el conjunto proporcionado es el número de aristas presentes en el mapa de interacciones. Estas aristas son las líneas que conectan cada proteína en el mapa y que vienen determinadas por el número de estudios que demuestran algún tipo de asociación entre dos proteínas, como pueden ser ensayos de co-precipitación, interacciones genéticas, expresión en los mismos tejidos, etc.

El análisis del conjunto de proteínas fosforiladas por KIS, resultó en un número de aristas significativamente mayor al esperado (389 contra 151 esperadas por procesos aleatorios), señalando que el conjunto está biológicamente relacionado. Tras realizar una clasificación del conjunto de datos utilizando el algoritmo de *k-means clustering* (con $k=3$), la red de interacciones se separó en 3 conjuntos, siendo el conjunto azul el que más aristas presenta respecto a las esperadas (208 contra 28) (**Figura 30A y B**).

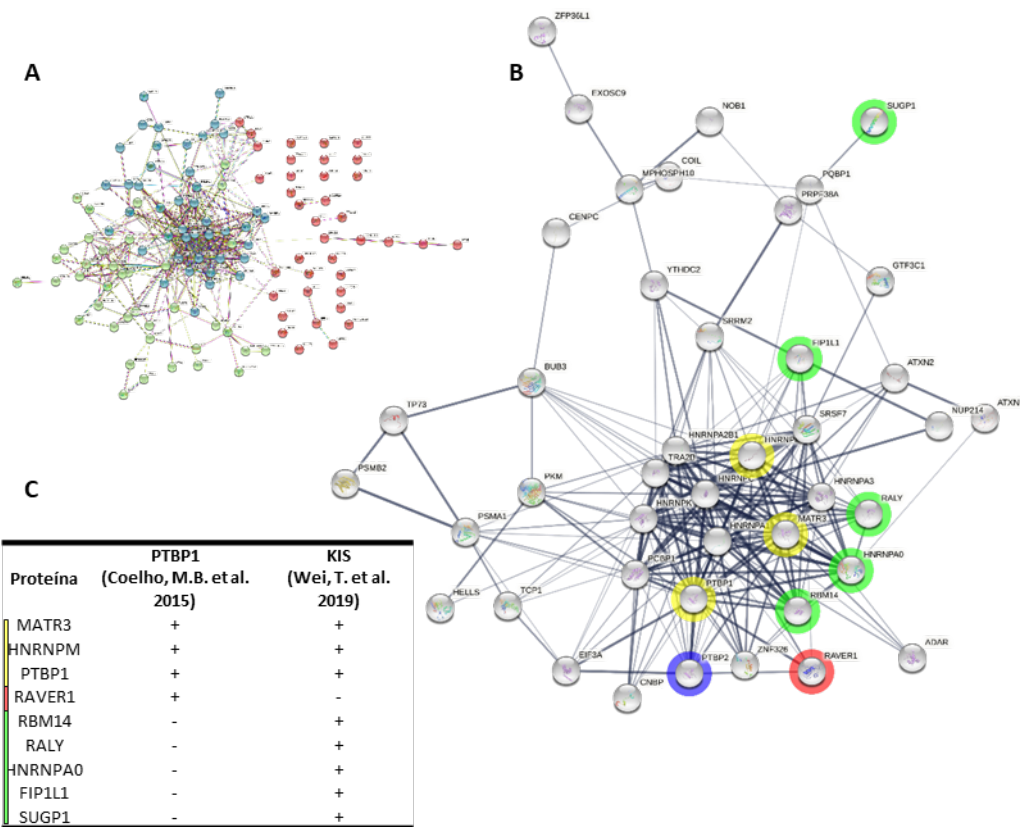


Figura 30. El complejo PTBP-MATR3-hnRNPM destaca entre las proteínas fosforiladas por KIS.

A. Mapa de interacciones, generado con STRING, de las proteínas altamente fosforiladas por KIS en la Figura X. El mapa se encuentra dividido en tres conjuntos: azul, rojo y verde utilizando el método de clasificación no supervisado *k-means clustering*. **B.** Ampliación del conjunto azul de A. Las proteínas se han marcado según su presencia en interactomas publicados de PTBP1 (rojo) (54), de KIS (verde) (98) o ambos (amarillo). En azul se muestra PTBP2. El grosor de las aristas es mayor cuantas más evidencias haya de la interacción. **C.** Tabla resumen de las proteínas marcadas en B.

Dentro del conjunto azul encontramos proteínas previamente detectadas en estudios de interactoma tanto de PTBP1 (54) como de KIS (98), entre las cuales las más presentes en el núcleo central del conjunto son MATR3 y hnRNPM (**Figura 30B y C**). Se conoce que estas dos proteínas interactúan con PTBP1 (113,122), así como entre ellas (132) y que MATR3 tiene la capacidad de regular la unión de PTBP1 a pre-mRNAs donde PTBP1 no puede unirse por sí solo (55). PTBP2 (marcada en azul en la **Figura 30B**) queda desplazada del conjunto central de interactores, aunque creemos que este resultado se debe más a la falta de estudios que no a una falta de interacción entre estas proteínas.

Desde la base de datos STRING se substraen los 50 principales interactores físicos (aquellos encontrados en experimentos de co-inmunoprecipitación o espectrometría de masas) y funcionales (aquellos descritos mediante interacciones génicas, co-expresión, *textmining*, etc) para PTBP1 y PTBP2, así como los 50 principales interactores físicos de PTBP1. Para PTBP2, en cambio el máximo de interactores físicos que pudieron obtenerse fueron solo 20, debido probablemente a la falta de estudio de PTBP2 respecto a PTBP1. En la **Figura 31** se muestra el análisis de la distribución/enriquecimiento de estos conjuntos de datos en la población de proteínas fosforiladas por KIS/KIS^{KID}. Por falta de candidatos, los interactores físicos de PTBP2 no se muestran. Se puede observar un enriquecimiento significativo entre las proteínas fosforiladas por KIS en los conjuntos de interactores físicos y funcionales de PTBP1 y PTBP2, así como en el conjunto específico de interactores físicos de PTBP1.

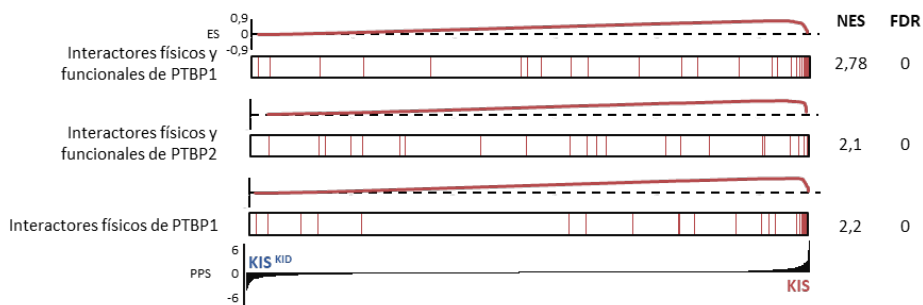


Figura 31. Los interactores de PTBP1 y PTBP2 se encuentran mayormente fosforilados en presencia de KIS.

Barcode plots y curvas de enriquecimiento de los top 50 interactores físicos y funcionales de PTBP1, PTBP2 y los interactores físicos de PTBP1, según la base de datos STRING.

Entre las proteínas enriquecidas destacan, al igual que en la **Figura 30B**, MATR3 (presente y enriquecida en los cuatro conjuntos de datos analizados) y hnRNPM (presente y enriquecida en los conjuntos pertenecientes a PTBP1). Consideramos, entonces, MATR3 y hnRNPM como candidatos de proteínas cuya unión a PTBP2 podría verse modificada por la fosforilación de KIS.

Para comprobar si la actividad de KIS produce una alteración en la unión de estas proteínas, se co-transfectaron células HEK 293T con Flag-PTBP2 y GFP, KIS o KIS^{KID} a fin de realizar una co-inmunoprecipitación del complejo. 48 horas post-transfección, se lisaron las células y se digirió con RNAsa a fin de preservar

únicamente las interacciones proteína-proteína. A continuación, se inmunoprecipitó Flag-PTBP2 y se cuantificó la cantidad de MATR3 y hnRNPM que había co-inmunoprecipitado (**Figura 32A**).

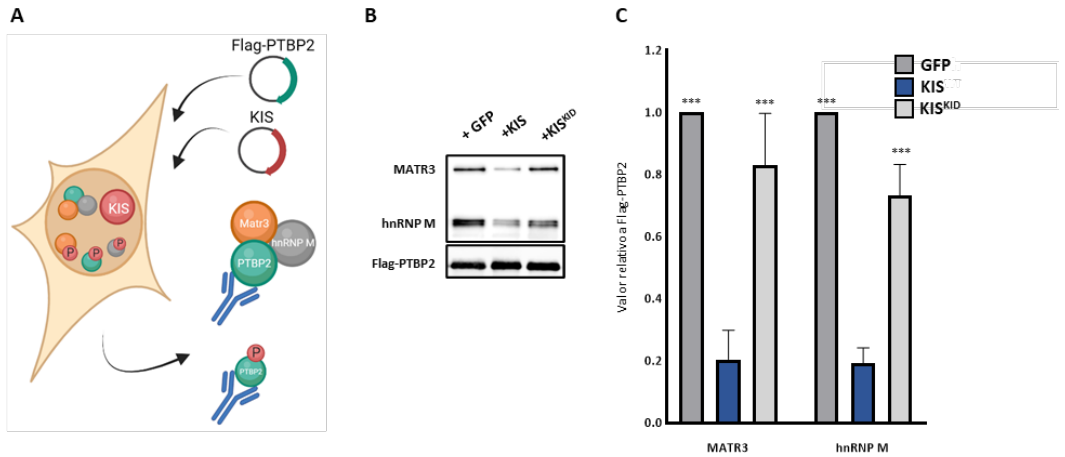


Figura 32. La fosforilación de KIS disocia las uniones entre PTBP2 y MATR3/hnRNPM in vivo.

A. Esquema representativo del experimento in vivo, células HEK293T fueron cotransfectadas con Flag-PTBP2 y KIS o KIS^{KID} y se inmunoprecipitó Flag-PTBP2. **B.** Inmunoprecipitación de Flag-PTBP2 en células HEK 293T co-transfectadas con GFP, KIS o KIS^{KID}. *Westernblot* del eluido utilizando anticuerpos contra MATR3, hnRNPM y Flag. **C.** Cuantificación de B (n=3). El gráfico de barras muestra el promedio del valor de intensidad de cada proteína, relativo a Flag-PTBP2, junto a la desviación estándar. ***: p-valor <0.01 respecto a KIS. Los datos fueron analizados mediante ANOVA 1 factor y múltiple t-test.

Al inmunoprecipitar PTBP2 somos capaces tanto de detectar MATR3 como hnRNPM (interacción no descrita anteriormente). Nuestros resultados demuestran que la co-transfección con KIS produce una disminución significativa en la unión de PTBP2 a MATR3 y hnRNPM, de aproximadamente el 80% en ambos casos (**Figura 32B y C**). Esta disminución no se da, en cambio, cuando co-transfectamos junto a KIS^{KD}, significando que esta disociación se da mediante fosforilación.

Para comprobar la especificidad de KIS en la disolución de estos complejos, se planteó un ensayo *in vitro*. Para ello, se transfectaron células HEK 293T con Flag-PTBP2 y se inmunoprecipitó la proteína utilizando *beads* anti-Flag. Posteriormente, se incubó el inmunoprecipitado con ATP y KIS o KIS^{KID}

producidas previamente en *E. coli* para realizar un ensayo de fosforilación *in vitro* (Figura 33A). Tras limpiar el inmunoprecipitado y eluir, se analizó mediante *western blot* si las uniones entre PTBP2, MATR3 y hnRNPM se veían alteradas. Nuevamente observamos que KIS es capaz de disminuir, parcialmente, la unión de PTBP2 a MATR3 y hnRNPM, comparado con el mutante sin actividad quinasa (Figura 33C y D). Este resultado demuestra que KIS tiene una participación directa sobre la disolución de los complejos PTBP2-MATR3-hnRNPM.

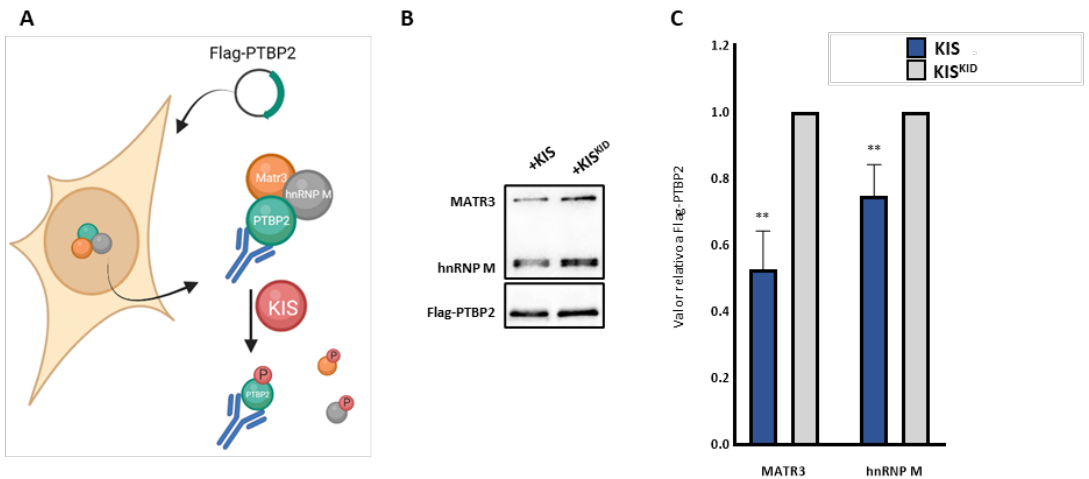


Figura 33. La fosforilación de KIS disocia las uniones entre PTBP2 y MATR3/hnRNPM *in vitro*.

A. Esquema representativo del experimento *in vitro*, células HEK293T fueron cotransfectadas con Flaf-PTBP2, se inmunoprecipitó Flag-PTBP2 y, anteriormente a la elución, el inmunoprecipitado fue tratado *in vitro* con KIS o KIS^{KID}. **B.** Inmunoprecipitación de Flag-PTBP2 en células HEK 293T transfectadas y tratas como se indica en A. *Western blot* del eluido utilizando anticuerpos contra MATR3, hnRNPM y Flag. **C.** Cuantificación de B (n=3). El gráfico de barras muestra el promedio del valor de intensidad de cada proteína, relativo a Flag-PTBP2, junto a la desviación estándar. ***: p-valor <0.01. Los datos fueron analizados mediante t-test.

Dado que las inmunoprecipitaciones conllevan el riesgo de falsas interacciones fruto de los detergentes utilizados en la extracción de proteína, quisimos corroborar los resultados obtenidos mediante técnicas de fluorescencia. Para ellos se analizó la interacción entre PTBP2 y MATR3 o hnRNPM mediante FRET (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Esta técnica consiste en la transfección de las proteínas de interés, fusionadas a proteínas fluorescentes (en este caso GFP y mScarlet). Si las proteínas a testar interaccionan, se da un proceso de transferencia de energía entre la proteína donadora (GFP) y la

acceptora (mScarlet). Midiendo esta transferencia (%FRET) se puede determinar la interacción entre proteínas. Para ello, se sobreexpresó GFP-PTBP2 y Scarlet-MATR3 o Scarlet-hnRNPM, juntamente con HA-KIS o HA-KIS KID en la línea celular HEK293 y se analizaron los niveles de FRET en el núcleo celular. Tal y como esperabamos, la presencia de KIS produjo una disminución en la señal de FRET entre GFP-PTBP2 y Scarlet-MATR3 (**Figura 34A**), al igual que para Scarlet-hnRNPM. Estos resultados corroboran que la actividad quinasa de KIS es capaz de disociar las interacciones entre estas proteínas.

Se quiso comprobar si este mismo fenómeno ocurría también en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Lamentablemente los niveles de expresión de mScarlet-MATR3 no fueron suficientes para poder tener lecturas fiables de la señal FRET. Por otra parte, si obtenemos diferencias significativas en cuanto a la unión entre PTBP2 y hnRNPM al ser co-transfectas con KIS (**Figura 34C y D**), señalando que esta regulación de la interacción entre las proteínas de *splicing* se da también en cultivos neuronales.

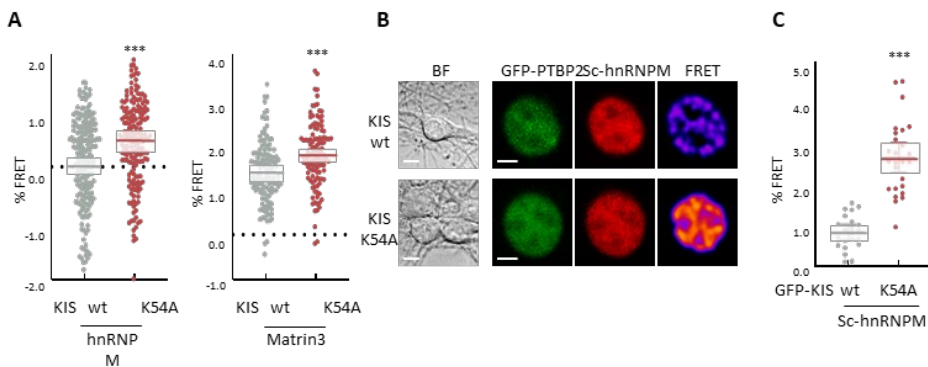


Figura 34. Los experimentos de FRET corroboran como KIS disocia los complejos entre PTBP2 y MATR3/hnRNPM.

A. Niveles de FRET entre PTBP2 y hnRNPM (izquierda) o MATR (derecha) en células HEK293T co-transfectadas con KIS/KIS^{K54A}. El gráfico muestra los valores individuales de cada núcleo y los cuartiles. **B.** Imágenes de campo claro (CF), fluorescencia y FRET de núcleos representativos en cultivos de neuronas hipocampales transfectadas con GFP-PTBP2, mScarlet-hnRNPM y KIS^{WT/K54A}. **C.** cuantificación de B, el grafico muestra los valores individuales de cada núcleo neuronal (n =23) y los cuartiles.

Estos resultados demuestran que uno de los mecanismos moleculares que podrían explicar la inhibición de PTBP2 por partes de KIS sería la pérdida de

interacciones proteína-proteína, al menos con proteínas como hnRNPM y MATR3. Adicionalmente, para PTBP1 es conocido que la unión a MATR3 es relevante para una correcta unión al RNA. De la misma forma ya se han reportado casos en los que la fosforilación por parte de KIS produce una disminución afinidad de unión al RNA en diferentes proteínas como SF1(91)y SF3B1 (96). Esta información, en conjunto con el análisis de los datos publicados por Viera-Viera et al (**Figura 20**) sugieren que la fosforilación de PTBP2 podría estar regulando también su unión al RNA.

Para comprobar esta regulación, se realizó un ensayo de *crosslink* proteína-RNA mediante luz ultravioleta. En este ensayo células HEK293T fueron co-transfectadas con PTBP2 y el reportero pFlareG. Ya que el reportero contiene las regiones intrónicas colindantes al exón 18 de PSD95, donde las proteínas PTBP son capaces de unirse para regular el *splicing* alternativo, se estudió mediante qPCR la cantidad relativa del RNA de pFlareG que inmunoprecipita con PTBP2. La **Figura 35A** muestra como PTBP2 efectivamente se une al RNA de pFlareG y como el estado de fosforilación de PTBP2 (ya sea con el fosfomutante o bien mediante la co-transfección con KIS) disminuye drásticamente su afinidad por el mRNA testado.

Adicionalmente, Se realizó el mismo tipo de ensayo pero mediante marcaje con radiactividad, se testó la capacidad de PTBP2 para unirse a la población total de RNA, en lugar de a RNAs concretos. En la **Figura 35B y C** se observa como el mutante fosfomimético muestra menor afinidad al RNA total, aunque el cambio es menor al cuando se compara con el mRNA de pFlareG.

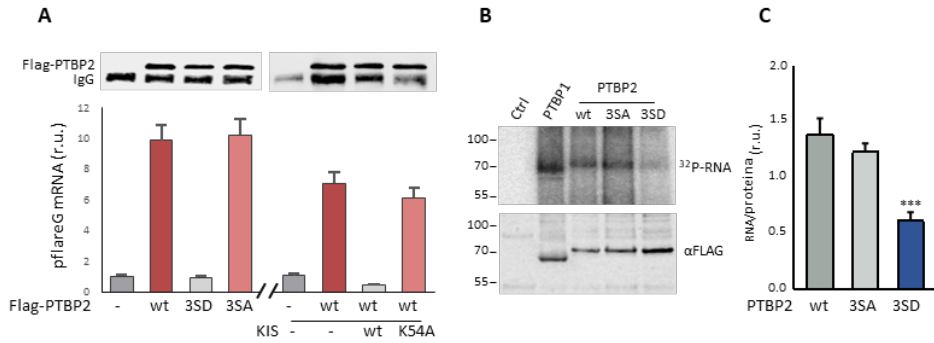


Figura 35. La fosforilación de PTBP2 impide su unión al RNA.

A. Ensayo de CLIP sobre Flag-PTBP2 y el RNA de pFlareG. Células HEK 293 fueron transfectadas con Flag-PTBP2 y fosfomutantes (izquierda) o co-transfectadas con KIS/KIS^{K54A} (derecha). La señal del RNA fue medida mediante qPCR y relativizada a GAPDH y a la cantidad de proteína inmunoprecipitada (*western blot*). El gráfico de barras muestra el promedio de la señal junto a la desviación estándar (n=3). **B y C.** Ensayo de ICLIP sobre Flag-PTBP2. Células HEK 293T fueron transfectadas con Flag-PTBP2 y fosfomutantes y, gracias al marcaje con 32P-ATP, se analizó la fracción total del RNA unido a PTBP2 mediante autoradiografía (**B**). El gráfico en **C** representa la cantidad total de RNA unido a PTBP2, normalizado por la cantidad de proteína inmunoprecipitada. Se muestra el promedio de la señal junto a la desviación estándar (n=3). El análisis se realizó mediante ANOVA 1 factor y múltiple t-test. Se adjuntan los p-valores.

Estos resultados sugieren que la fosforilación de PTBP2 impide su unión al RNA aunque parece ser que se debe a un mecanismo que podría afectar específicamente a algunos conjuntos de exones, quizás dependiendo del resto de proteínas de unión al pre-mRNA implicadas y a sus uniones proteína-proteína.

Discusión

La regulación del *splicing* alternativo es un proceso clave para el desarrollo neuronal, estando implicado en diferentes aspectos como la diferenciación axonal, la migración neuronal, la maduración y la correcta expresión de proteínas sinápticas. Aunque se conoce que las diferentes proteínas reguladoras del *splicing* alternativo cambian sus niveles de expresión a lo largo del desarrollo, poco se conoce sobre cómo se regula la actividad de éstas así como las interacciones entre ellas.

Estudios anteriores plantean a KIS como un posible regulador del *splicing*, dada su co-localización junto a la maquinaria de *splicing* y su capacidad para fosforilar SF1 y SF3B1. Un estudio reciente demuestra cómo KIS es capaz de regular la inclusión exónica en células NIH3T3 regulando la proliferación de estas células, siendo el primer estudio publicado donde se entrevé la capacidad de KIS para regular el *splicing* alternativo (133).

KIS es una proteína ubicua, pero con mayores niveles de expresión en el sistema nervioso, donde alcanza sus niveles más altos durante la maduración neuronal. Dado el patrón de expresión de KIS y la importancia de los cambios en el *splicing* alternativo en neuronas, durante esta tesis se ha querido estudiar la relevancia de la quinasa KIS como posible regulador de los procesos de *splicing* en el sistema nervioso, así como los mecanismos moleculares que subyacen a esta posible regulación.

KIS supone un nuevo regulador del *splicing* durante el desarrollo neuronal

El RNAseq del *knockdown* de KIS a 18 DIV demuestra cómo la presencia de KIS regula la inclusión de 1141 exones así como la exclusión de 1106. Este análisis abre una primera puerta a que KIS pueda ser un regulador del *splicing* alternativo en neuronas. Entre los genes con exones up-regulados por KIS se encuentran genes pertenecientes a los *Gene Ontology* de unión a RNA. Unión a sintaxina y receptores GABA, este último ya reportado anteriormente, aunque en un estudio de expresión génica (93). Adicionalmente, cuando estudiamos los genes que muestran más de un exón cuya inclusión es favorecida por KIS,

encontramos genes relacionados con los *Gene Ontology* de Sinapsis, Postsinapsis y Membrana sináptica, lo que sugiere que el set de genes cuyo *splicing* se ve regulado por KIS está relacionado con la formación de estructuras sinápticas y con la maduración neuronal.

Un estudio anterior en el laboratorio demostró cómo el *knockdown* de KIS en neuronas corticales presenta un fenotipo de baja maduración neuronal, donde el árbol dendrítico se ve afectado y hay una disminución en el número de espinas maduras. Estos fenotipos vienen acompañados con una disminución en la amplitud de los mESPC, lo que produce una disminución en la plasticidad sináptica (134). Estos resultados podrían correlacionar con el conjunto de *gene ontology* afectados por el *knockdown* de KIS (**Figuras 12B, 13C y 23C**).

Combinando el RNAseq del *knockdown* de KIS junto al de neuronas corticales a 7 y 18 DIV, observamos cómo los exones cuya inclusión se ve favorecida por la presencia de KIS están enriquecidos en el conjunto de exones con mayor inclusión a 18 DIV, lo que sugiere que KIS regula un conjunto de exones cuya inclusión es necesaria a lo largo del desarrollo. La disminución de estos exones cuando, artificialmente, se pierde la expresión de KIS podría explicar el fenotipo de no-maduración neuronal mencionado anteriormente.

Cabe destacar que durante el desarrollo neuronal muchas proteínas reguladoras del *splicing* alternativo varían de expresión, como es el caso de Ptbp2, Raver2, Nova1/2, Mbnl1/2, etc (**Figura 15**) pero estas no muestran cambios de expresión a nivel de mRNA en el *knockdown* de KIS. Este resultado sugiere que KIS no regula el *splicing* alternativo durante el desarrollo modificando la expresión de diferentes proteínas relacionadas con el *splicing* alternativo sino, probablemente, regulando su actividad.

En la literatura existen algunos ejemplos sobre cómo proteínas de *splicing* alternativo son reguladas mediante fosforilación, como es el caso de NOVA2. La fosforilación de esta proteína provoca su exportación nuclear y modifica el patrón de *splicing* de canales de calcio (79). Aun con esto, poco se conoce en general sobre las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas reguladoras del *splicing* alternativo.

Una aproximación *in silico* que se podría haber realizado para averiguar cuáles podrían ser las proteínas reguladoras del *splicing* alternativo que explicaran los cambios producidos por la presencia/ausencia de KIS hubiese sido la búsqueda de patrones o secuencias consenso en los intrones colindantes y dentro de los exones regulados por KIS (38). Dado el tamaño del conjunto de exones testados (100 exones) para la correlación entre KIS y el desarrollo, se descartó esta opción y se prefirió realizar un estudio del fosfoproteoma de KIS, el cual sería más informativo.

La actividad de KIS recae sobre las proteínas reguladoras del *splicing* e inhibe PTBP2 en el sistema nervioso

Para estudiar qué categorías de *Gene Ontology* se muestran sobrerrepresentadas entre los fosfopéptidos de una quinasa, usualmente se seleccionan los fosfopéptidos significativamente fosforilados y se estudia mediante *Gene Ontology Enrichment*. Para poder utilizar la información de todas las proteínas fosforiladas y no solo aquellas con una ratio de fosforilación KIS/KISK54A mayor, se decidió utilizar el análisis por GSEA, transformando la información en $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$ de cada fosfopéptido a PPS por proteína.

De esta forma, se barajaron diferentes aproximaciones como por ejemplo la de asociar a cada proteína solo el valor de su fosfopéptido con un valor absoluto mayor, o la de calcular el PPS tal y como la suma del $\text{Log}_2 \text{Fold Changes}$ (tal y como se ha realizado finalmente) pero restringiéndose a péptidos con un $|\text{LogFC}| > 0.1$. Las diferentes aproximaciones dieron resultados muy similares entre ellos, incluso con valores de enriquecimiento mayor en el caso de filtrar por $|\text{LogFC}| > 0.1$. Finalmente, se decidió usar el cálculo con todos los péptidos a fin de utilizar toda la información disponible y cometer el menor sesgo posible, aunque existe cierta correlación entre el número de fosfopéptidos que una proteína muestra y el valor del PPS resultante (**Figura 17**).

Finalmente, el análisis del fosfoproteoma revela que entre las proteínas mayormente fosforiladas por KIS existe un enriquecimiento en proteínas relacionadas con la unión a mRNA, con el *splicing* y con su regulación.

No encontramos diferencias significativas para SF1 y SF3B1, proteínas descritas in vitro como dianas de KIS. Este resultado puede deberse a que estas proteínas sufren un ciclo de fosforilación/desfosforilación durante el proceso de *splicing* (10,91,97) y de esta manera no podemos apreciar cambios en su estado de fosforilación. Una forma alternativa para ver la contribución específica de KIS sobre la fosforilación de estas proteínas hubiera sido la de mutar el centro catalítico de la quinasa a fin de que pudiera utilizar análogos del ATP como sustrato y ser capaces de detectar las fosforilaciones directas fruto de la actividad de KIS y no cambios globales en el fosfoproteoma (135).

La unión y desunión al pre-mRNA es un proceso clave para que pueda llevarse a cabo el proceso de *splicing*, ya no solo por parte de los componentes de espliceosoma (9,92,96), sino también por parte de las proteínas reguladoras del *splicing*, donde sus patrones de unión explican el producto final de *splicing* (**Figura 5**). Adicionalmente, gracias a los datos proporcionados en el estudio de Viera-Viera, observamos que entre las proteínas fosforiladas por KIS, existe un enriquecimiento en RBP las cuales, tras ser fosforiladas muestran una menor unión a mRNA. Aunque en este estudio el *pull-down* se realiza sobre la población de RNAs que están poliadenilados, se muestra como algunas de las fosforilaciones encontradas resultan en la regulación del *splicing* alternativo.

Entre las proteínas mayormente fosforiladas tras la expresión de KIS se encuentran PTBP2, MATR3 y hnRNPM y RAVR1. Estas cuatro proteínas son capaces de regular el *splicing* alternativo (aunque en las categorías de GO MATR3 y hnRNPM no aparecen) y putativamente actúan en conjunto (aunque las interacciones y la actuación como co-factores está menos estudiada para Ptbp2, sí se ha descrito para Ptbp1).

Ptbp2, la proteína mayormente fosforilada en el fosfoproteoma de KIS, es un regulador del *splicing* imprescindible durante la formación y maduración del sistema nervioso (12,50,109,113,119,136,137). Al inicio del desarrollo neuronal, la expresión de Ptbp2 se ve inhibida por su parólogo Ptbp1 y a medida que éste se silencia, Ptbp2 comienza a expresarse, cambiando el patrón de *splicing*. Durante el desarrollo y la maduración neuronal, la expresión de Ptbp2 se reduce aproximadamente un 50%. La disminución de la expresión de Ptbp2 se ve negativamente correlacionada con el aumento de la expresión de KIS (**Figura 11**) (93), lo que podría añadir una capa de regulación sobre ésta.

El reanálisis del *knockdown* de KIS, en comparación con los datos publicados sobre el *knockout* de Ptbp2, correlaciona con una menor actividad Ptbp2 cuando KIS se expresa en neuronas maduras, ya que encontramos una mayor expresión de los exones que son específicamente inhibidos por Ptbp2. Esta correlación no se encuentra cuando se estudian los exones específicamente inhibidos por Ptbp1, proteína que no se expresa a 18 DIV (49,138).

Es conocido que Ptbp2 compete en el equilibrio de inclusión/exclusión e incluso por lugares de unión al pre-mRNA con otras proteínas reguladoras del *splicing*

alternativo como son Nova2, Mbnl2 y Rbfox (36,84,139). En análisis futuros, sería interesante estudiar la distribución de estos exones, así como los exones específicamente regulados por estas proteínas en el RNAseq del *knockdown* de KIS a fin de comprobar, también, la afección de estas proteínas, aunque no las hayamos encontrado como dianas de KIS.

La actividad quinasa de KIS regula los complejos proteína-proteína durante la regulación del *splicing* alternativo

Ptbp2 reprime la inclusión de exones en genes relacionados con la maduración neuronal, permitiendo que estos se expresen correctamente una vez sus niveles disminuyen. Uno de los ejemplos más estudiados es la regulación del exón 18 de PSD95. El mRNA de PSD95 se expresa desde momentos tempranos, 1 DIV en cultivos de neuronas corticales de ratón a E17.5, pero la expresión de la proteína se ve condicionada por la inclusión del exón 18. Mientras la expresión de PTBP1/2 se mantiene elevada, el exón 18 de PSD95 sufre exclusión, lo cual produce un cambio en la pauta de lectura y un codón de stop prematuro. De este modo la isoforma de exclusión se degrada por NMD y así se impide la expresión, a nivel de proteína, de PSD95 (12).

Los experimentos de inmunofluorescencia en cultivos de neuronas hipocámpales corroboran el fenotipo mencionado en el análisis anterior: KIS inhibe la actividad de Ptbp2, de forma dependiente de la actividad quinasa, e impide su regulación sobre PSD95. De la misma forma, la sobreexpresión de KIS en sistemas donde Ptbp2 está altamente expresado (N2A y neuronas a 5 DIV), es capaz de regular el *splicing* alternativo del exón 18 de PSD95 y su expresión.

Las fosforilaciones estudiadas en Ptbp2, la serina 178, la serina 308 y la serina 434; se encuentran localizadas en los *linkers* 1, 2 y 3, respectivamente. Estas estructuras desordenadas se encuentran separando los dominios de unión a RNA (**Figura 25**) y juegan un papel importante para el correcto funcionamiento de Ptbp. En concreto, se ha reportado que la unidad mínima represora del *splicing* en Ptbp1 se compone del RRM2 y el linker2 (122). Ptbp1 tiene dos isoformas las cuales difieren en el tamaño del linker 2. La isoforma corta (exclusión del exón 9) presenta menor actividad a la hora de reprimir el *splicing* de Tropomiosina (140). Esto se cree que puede deberse a una menor flexibilidad a la hora de que los dominios RRM2 y RRM3 pueden disponerse correctamente para unir al RNA, pero también a que los dominios desordenados juegan un papel importante a la hora de reclutar proteínas, mediante la formación de condensados por *liquid-liquid phase separation*, que permite más eficientemente la represión del *splicing* (141) (**Figura 36A y D**).

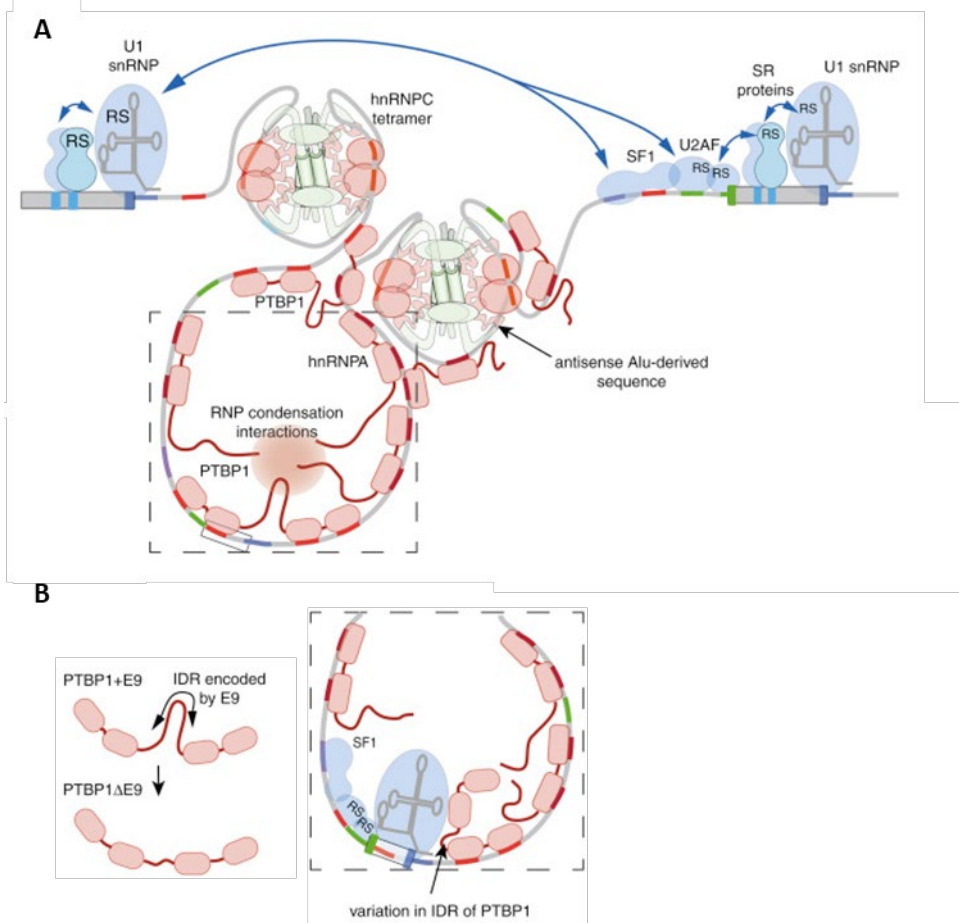


Figura 36. Los dominios desordenados juegan un papel fundamental en la formación de complejos y la regulación del *splicing*.

Las uniones mediante dominios desordenados pueden formar condensados proteicos que permiten la regulación del *splicing* así como la definición de intrones y exones (**A**). Cambios en estos dominios pueden desencadenar cambios en la identificación de elemento reguladores del *splicing* y un cambio en la inclusión/exclusión exónica (**B**). Figura adaptada de Ule j. et al, 2016 (141)

Las redes de interacciones entre las RBP son un elemento clave en la regulación del *splicing* alternativo. Existen proteínas capaces de alterar la inclusión de diferentes exones sin unirse directamente al pre-mRNA, sino uniéndose a otras proteínas, como es el caso de Rbm38 que se une a Ptp1. Estas uniones incluso pueden estar reguladas a lo largo del desarrollo, como es el caso de Puf60, donde el cambio de isoforma tras la inclusión de un exón alternativo modifica

su patrón de unión ganando afinidad a Ptbp1/2 y perdiendo afinidad a Matr3 y a Nova2, entre otras (110).

La serina 308 de PTBP2, el residuo más enriquecido en el fosfoproteoma de KIS (**Figura 16**) y el cual se encuentra altamente fosforilado por KIS in vitro (**Figura 25C**), se encuentra precisamente en el linker2, zona cuyas propiedades modifican la actividad de PTBP1. El fenotipo de inhibición del fosfomutante de PTBP2, así como cuando se co-transfecta con KIS, y el hecho de que las fosforilaciones se localicen en estos dominios desordenados, siendo la fosforilación del linker 2 específica de PTBP2, sugieren que PTBP2 podría estar perdiendo sus capacidades de interacción.

Análisis bioinformáticos señalan que las fosforilaciones suelen ocurrir con mayor frecuencia en dominios desordenados y que las cargas electroestáticas que los grupos fosfato otorgan pueden modificar las capacidades de unión de las proteínas diana (142). De la misma forma se ha descrito cómo la regulación por fosforilación es capaz de cambiar la estructura de la familia de reguladores del *splicing* SR, pasando de una conformación desordenada a una conformación compacta al ser fosforiladas y regulando así su actividad (143).

El estudio de interacciones demuestra que, entre las 120 proteínas con péptidos enriquecidos en el fosfoproteoma de KIS, existe una red de interacciones significativas entre las dianas de KIS. Adicionalmente, encontramos un enriquecimiento en los interactores de PTBP1 y PTBP2.

Entre los candidatos a proteínas que interactúan con PTBP y podrían ser reguladas por KIS, aparecen MATR3 y hnRNPM. Las fosforilaciones en estas proteínas se encuentran, también, en regiones desordenadas (**Figura 37**) y, aunque la unión de MATR3 y PTBP se encuentra mediada por el RRM2 de PTBP2 (120) los experimentos de co-inmunoprecipitación y FRET, en sistemas ortólogos, demuestran que KIS es capaz de de disruptar la unión entre PTBP2 y MATR3 y hnRNPM.

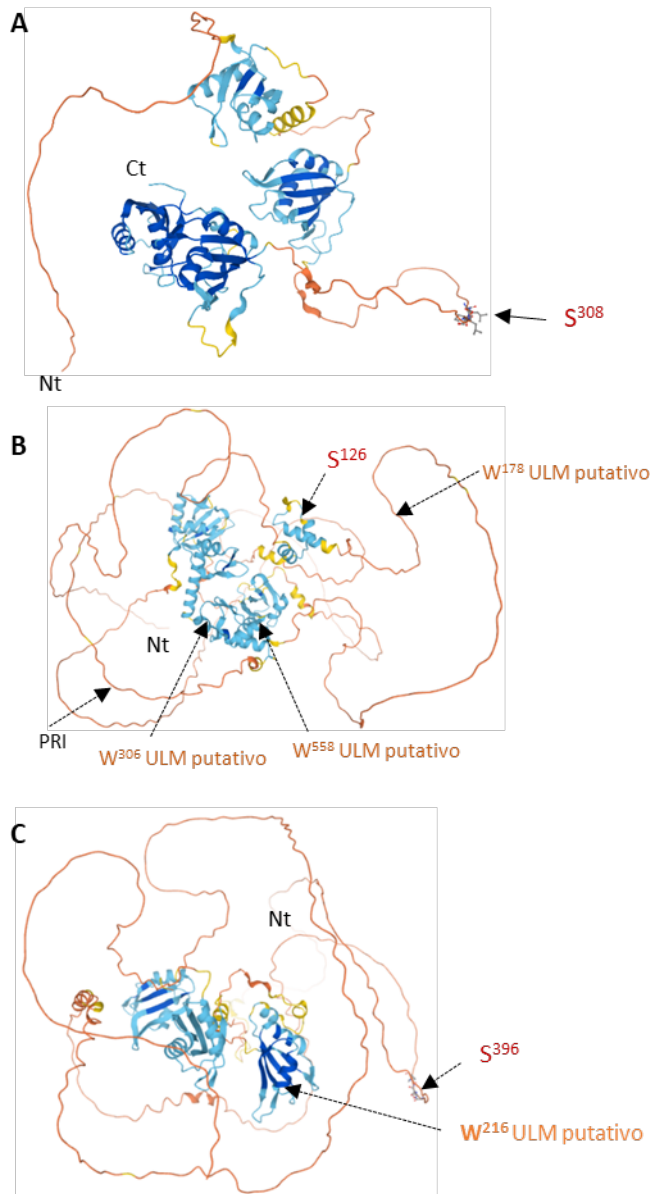


Figura 37. Las fosforilaciones de KIS sobre PTBP2 MATR3 y hnRNPM se encuentran en dominios desordenados.

Predicciones de estructura terciaria de PTBP2 (A), MATR3 (B) y hnRNPM (C) generadas a partir de AlphaFold2. En azul se muestran los dominios RRM de las tres proteínas, 4 para PTBP2, 2 para MATR3 y 3 para hnRNPM. En las estructuras se muestran las serinas encontradas en el fosfoproteoma de KIS y, adicionalmente, los residuos que podrían formar parte de un dominio ULM putativo (triptófano rodeado de cargas positivas).

Se conoce que PTBP1 actúa en conjunto con MATR3 y hnRNPM para regular la inclusión/exclusión de exones específicos y que Matr3 es capaz de modificar el patrón de unión de PTBP1, permitiendo su unión a nuevos motivos (55,144). Ptbp1, Matr3 y hnRNPM se encuentran y actúan en conjunto en la regulación de secuencias LINE-derivadas (55,145), por lo que los complejos entre estas proteínas son importantes para la correcta regulación del *splicing* alternativo. Se ha descrito que PTBP1 y MATR3 se localizan conjuntamente en un 96% de los genes regulados por PTBP1 y en un 77 % de sus clústeres de unión (146), reforzando aún más su acción conjunta. De la misma forma, se ha descrito que en *Drosophila melanogaster* hnRNPM modifica la actividad de MATR3 y ambas proteínas se unen en regiones comunes al pre-mRNA (132).

Adicionalmente, la fosforilación de PTBP2 inhibe dramáticamente su unión al pre-mRNA de pFlare-PSD95-e18 (**Figura 35**) así como el mutante fosfomimético reduce levemente la unión a la fracción total de RNA. Estos cambios de eficiencia pueden deberse a la especificidad de cada una de las técnicas utilizadas, donde la qPCR proporciona la señal específica del pre-mRNA de pFlare, mientras que el crosslink y el estudio de la unión total a RNA puede estar contaminada por uniones específicas fruto de la propia técnica de *crosslink*.

Esta pérdida en la unión a RNA podría deberse a la fosforilación y la regulación sobre el linker2 de PTBP2, siendo un efecto directo o bien un efecto indirecto de la pérdida de las uniones proteína-proteína. Como se comentaba anteriormente, el linker2 de PTBP1 juega un papel fundamental en su regulación, siendo que la distancia de este condiciona la actividad de PTBP1 y puede cambiar su patrón de unión (147). De la misma forma, la co-expresión de los cofactores de PTBP1 es también un punto crítico en su capacidad de unión a RNA. Un ejemplo es el ratón *knockdown* de MATR3, donde produce una reducción considerable de la afinidad de PTBP1 al RNA (55).

De esta manera, la regulación de KIS es capaz de inhibir PTBP2 no sólo impidiendo su unión a otras proteínas reguladoras del *splicing* alternativo sino, también, impidiendo su unión al RNA.

Dado que los experimentos de co-inmunoprecipitación se han llevado a cabo en condiciones de ausencia de RNA, gracias al tratamiento con RNAsa, podemos afirmar que estas uniones son específicas e independientes a la unión a RNA. En

cambio, con los resultados obtenidos no podemos confirmar si la pérdida de afinidad de PTBP2 al RNA tras ser fosforilada se debe a la fosforilación per se o a que es necesario que PTBP2 se encuentre formando complejos con MATR3 y hnRNPM. Para averiguarlo, un experimento interesante sería la producción de PTBP2 y sus mutantes de manera exógena y titrar su afinidad al RNA mediante oligonucleótidos de polipirimidinas marcados radiactivamente. Este experimento permitiría conocer si el estado de fosforilación afecta netamente a la capacidad de unión al RNA.

Los resultados de este trabajo proporcionan una nueva capa de regulación sobre el *splicing* alternativo, donde KIS, mediante la fosforilación de PTBP2 y algunos de sus cofactores, permite la inclusión de exones relacionados con el desarrollo neuronal. Esta regulación se lleva a cabo mediante la disociación de los complejos entre PTBP2, MATR3 y hnRNPM y una disminución en la capacidad de unión al RNA.

El incremento de la expresión de KIS durante el desarrollo, en paralelo con la disminución de la expresión de PTBP2 podría crear un evento sinérgico en la inhibición de la actividad PTBP, permitiendo de una manera más eficiente el cambio en el patrón de *splicing* alternativo. De esta forma, proponemos el modelo ilustrado en la **Figura 38** en el cual, en las primeras etapas del desarrollo neuronal, los bajos niveles de KIS permiten que PTBP2 sea activa. Esto permite la formación de complejos con MATR3 y hnRNPM y la regulación del *splicing* alternativo. A medida que las neuronas maduran, los niveles de Ptbp2 disminuyen y los de KIS aumentan, favoreciendo una inhibición de Ptbp2, así como una disociación de estos complejos proteína-proteína y al RNA lo que desencadena un cambio en el patrón de *splicing* permitiendo la expresión de isoformas específicas de neuronas adultas.

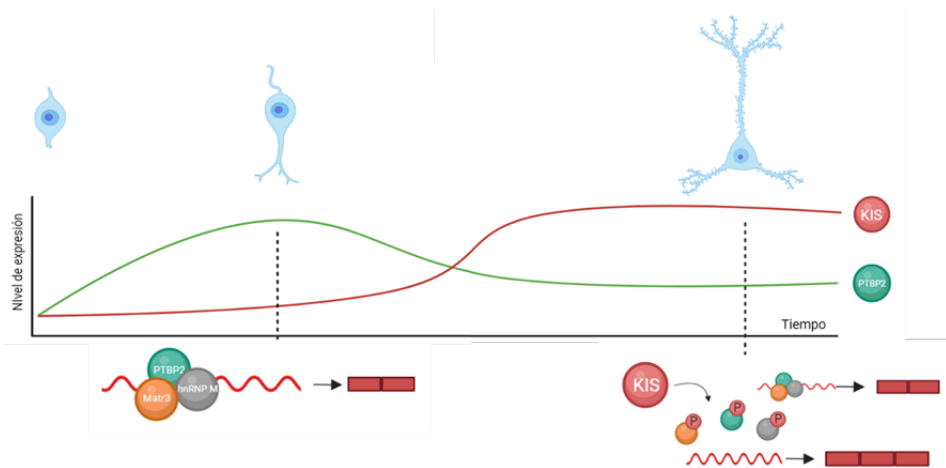


Figura 38. Modelo de la regulación del *splicing* alternativo a través de KIS/PTBP2 a lo largo del desarrollo neuronal.

En paralelo, aunque se desconoce el mecanismo por el cual KIS es activada, experimentos preliminares de fosforproteómica en neuronas corticales muestran sutil aumento sugieren que Ptbp2 podría estar perdiendo sus capacidades de interacción. de la fosforilación en la serina 308 de PTBP2 así como diferentes residuos de MATR3 y hnRNPM tras la estimulación con DHPG (datos no mostrados). Se ha reportado que la actividad sináptica, mediante estimulación con kainato y DHPG, es capaz de cambiar rápidamente el patrón de *splicing* alternativo de las neuronas estimuladas, favoreciendo la inclusión/exclusión de exones específicos (88) así como incluso permitir la exportación de mRNAs los cuales se encuentran secuestrados en el núcleo mediante retención intrónica (89).

Creemos que los resultados obtenidos durante este proyecto, así como algunos resultados preliminares sobre KIS, podrían apuntar a que, en neuronas adultas, KIS podría estar mediando cambios en el *splicing* alternativo tras la actividad sináptica. Este planteamiento puede abrir las puertas a continuar estudiando la quinasa como un enlace entre la plasticidad sináptica y la regulación del *splicing*.

Conclusiones

- KIS es capaz de modificar el patrón de *splicing* alternativo en cultivos primarios de neuronas corticales.
- Los cambios en el *splicing* alternativo fruto del *knockdown* de KIS correlaciona con un desarrollo neuronal incompleto.
- KIS es capaz de fosforilar proteínas relacionadas con la regulación del *splicing*.
- Los cambios en el *splicing* alternativo fruto del *knockdown* de KIS correlacionan con un cambio en la actividad de PTBP2.
- Las fosforilaciones en PTBP2 mediada por KIS inhiben su actividad, perdiendo su regulación sobre PSD95.
- KIS regula la disolución de los complejos proteína-proteína entre PTBP2, MATR3 y hnRNPM.
- La fosforilación por parte de KIS reduce la capacidad de unión de PTBP2 al RNA.

Referencias

1. Gilbert W. Why genes in pieces? *Nature*. 1978 Feb;271(5645):501.
2. HOROWITZ NH. The one gene-one enzyme hypothesis. *Genetics*. 1948 Nov;33(6):612.
3. Black DL. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 May 30];72(1):291–336. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626338>
4. Colak D, Ji S-J, Porse BT, Jaffrey SR. Regulation of axon guidance by compartmentalized nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*. 2013 Jun;153(6):1252–65.
5. Hubé F, Francastel C. Mammalian introns: when the junk generates molecular diversity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Feb 20;16(3):4429–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25710723>
6. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008 Nov;456(7221):470–6.
7. Kretova M, Selicky T, Cipakova I, Cipak L. Regulation of Pre-mRNA Splicing: Indispensable Role of Post-Translational Modifications of Splicing Factors. *Life (Basel, Switzerland)*. 2023 Feb;13(3).
8. Pabis M, Corsini L, Vincendeau M, Tripsianes K, Gibson TJ, Brack-Werner R, et al. Modulation of HIV-1 gene expression by binding of a ULM motif in the Rev protein to UHM-containing splicing factors. *Nucleic Acids Res*. 2019 May;47(9):4859–71.
9. Corsini L, Bonnal S, Basquin J, Hothorn M, Scheffzek K, Valcárcel J, et al. U2AF-homology motif interactions are required for alternative splicing regulation by SPF45. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Jul;14(7):620–9.
10. Hluchý M, Gajdušková P, Ruiz de Los Mozos I, Rájecký M, Kluge M, Berger B-T, et al. CDK11 regulates pre-mRNA splicing by phosphorylation of SF3B1. *Nature*. 2022 Sep;609(7928):829–34.
11. Dvinge H, Bradley RK. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Med*. 2015;7(1):45.
12. Zheng S, Gray EE, Chawla G, Porse BT, O’Dell TJ, Black DL. PSD-95 is post-transcriptionally repressed during early neural development by PTBP1 and PTBP2. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2019

May 30];15(3):381–8. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nn.3026>

13. Franz A, Weber AI, Preußner M, Dimos N, Stumpf A, Ji Y, et al. Branch point strength controls species-specific CAMK2B alternative splicing and regulates LTP. *Life Sci alliance*. 2023 Mar;6(3).
14. Yap K, Xiao Y, Friedman BA, Je HS, Makeyev E V. Polarizing the Neuron through Sustained Co-expression of Alternatively Spliced Isoforms. *Cell Rep*. 2016 May;15(6):1316–28.
15. Koren E, Lev-Maor G, Ast G. The emergence of alternative 3' and 5' splice site exons from constitutive exons. *PLoS Comput Biol*. 2007 May;3(5):e95.
16. Zheng J-T, Lin C-X, Fang Z-Y, Li H-D. Intron Retention as a Mode for RNA-Seq Data Analysis. *Front Genet*. 2020;11:586.
17. Ortiz R, Georgieva M V, Gutiérrez S, Pedraza N, Fernández-Moya SM, Gallego C. Recruitment of Staufen2 Enhances Dendritic Localization of an Intron-Containing CaMKII α mRNA. *Cell Rep*. 2017 Jul;20(1):13–20.
18. Alfonso-Gonzalez C, Legnini I, Holec S, Arrigoni L, Ozbulut HC, Mateos F, et al. Sites of transcription initiation drive mRNA isoform selection. *Cell*. 2023 May;186(11):2438–2455.e22.
19. Iijima Y, Tanaka M, Suzuki S, Hauser D, Tanaka M, Okada C, et al. SAM68-Specific Splicing Is Required for Proper Selection of Alternative 3' UTR Isoforms in the Nervous System. *iScience*. 2019 Dec;22:318–35.
20. Liu Q, Fang L, Wu C. Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases. *Genes (Basel)*. 2022 Feb;13(3).
21. Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, et al. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*. 2000 Jun;101(6):671–84.
22. Baten AKMA, Chang BCH, Halgamuge SK, Li J. Splice site identification using probabilistic parameters and SVM classification. *BMC Bioinformatics*. 2006 Dec;7 Suppl 5(Suppl 5):S15.
23. Wang T-Y, Liu Q, Ren Y, Alam SK, Wang L, Zhu Z, et al. A pan-cancer transcriptome analysis of exon splicing identifies novel cancer driver genes and neoepitopes. *Mol Cell*. 2021 May;81(10):2246–2260.e12.
24. Vigevani L, Gohr A, Webb T, Irimia M, Valcárcel J. Molecular basis of differential 3' splice site sensitivity to anti-tumor drugs targeting U2

- snRNP. *Nat Commun.* 2017 Dec;8(1):2100.
25. Davis-Turak J, Johnson TL, Hoffmann A. Mathematical modeling identifies potential gene structure determinants of co-transcriptional control of alternative pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 2018 Nov;46(20):10598–607.
 26. Lovci MT, Ghanem D, Marr H, Arnold J, Gee S, Parra M, et al. Rbfox proteins regulate alternative mRNA splicing through evolutionarily conserved RNA bridges. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Dec;20(12):1434–42.
 27. Lin C-L, Taggart AJ, Fairbrother WG. RNA structure in splicing: An evolutionary perspective. *RNA Biol.* 2016 Sep;13(9):766–71.
 28. Fu X-D, Ares MJ. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet.* 2014 Oct;15(10):689–701.
 29. Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jul;18(7):437–51.
 30. Urbanski L, Brugiolo M, Park S, Angarola BL, Leclair NK, Yurieva M, et al. MYC regulates a pan-cancer network of co-expressed oncogenic splicing factors. *Cell Rep.* 2022 Nov;41(8):111704.
 31. Chao Y, Jiang Y, Zhong M, Wei K, Hu C, Qin Y, et al. Regulatory roles and mechanisms of alternative RNA splicing in adipogenesis and human metabolic health. *Cell Biosci* [Internet]. 2021;11(1):66. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00581-w>
 32. Sayed ME, Yuan L, Robin JD, Tedone E, Batten K, Dahlson N, et al. NOVA1 directs PTBP1 to hTERT pre-mRNA and promotes telomerase activity in cancer cells. *Oncogene.* 2019 Apr;38(16):2937–52.
 33. Calarco JA, Zhen M, Blencowe BJ. Networking in a global world: Establishing functional connections between neural splicing regulators and their target transcripts. *RNA* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2019 May 30];17(5):775–91. Available from: <http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.2603911>
 34. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;15(2):108–21. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
 35. Sutandy FXR, Ebersberger S, Huang L, Busch A, Bach M, Kang H-S, et al. In vitro iCLIP-based modeling uncovers how the splicing factor U2AF2 relies on regulation by cofactors. *Genome Res.* 2018 May;28(5):699–

713.

36. Weyn-Vanhentenryck SM, Feng H, Ustianenko D, Duffié R, Yan Q, Jacko M, et al. Precise temporal regulation of alternative splicing during neural development. *Nat Commun.* 2018 Jun;9(1):2189.
37. Tapial J, Ha KCH, Sterne-Weiler T, Gohr A, Braunschweig U, Hermoso-Pulido A, et al. An atlas of alternative splicing profiles and functional associations reveals new regulatory programs and genes that simultaneously express multiple major isoforms. *Genome Res.* 2017 Oct;27(10):1759–68.
38. Feng H, Moakley DF, Chen S, McKenzie MG, Menon V, Zhang C. Complexity and graded regulation of neuronal cell-type-specific alternative splicing revealed by single-cell RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Mar;118(10).
39. Zhang M, Ergin V, Lin L, Stork C, Chen L, Zheng S. Axonogenesis Is Coordinated by Neuron-Specific Alternative Splicing Programming and Splicing Regulator PTBP2. *Neuron* [Internet]. 2019 Feb 20 [cited 2019 May 16];101(4):690-706.e10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30733148>
40. Chen Z, Gore BB, Long H, Ma L, Tessier-Lavigne M. Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron.* 2008 May;58(3):325–32.
41. Zheng S, Gray EE, Chawla G, Porse BT, O’Dell TJ, Black DL. PSD-95 is post-transcriptionally repressed during early neural development by PTBP1 and PTBP2. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2019 May 30];15(3):381–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn.3026>
42. Allen SE, Toro CP, Andrade A, López-Soto EJ, Denome S, Lipscombe D. Cell-Specific RNA Binding Protein Rbfox2 Regulates Ca(V)2.2 mRNA Exon Composition and Ca(V)2.2 Current Size. *eNeuro.* 2017;4(5).
43. Su C-H, D D, Tarn W-Y. Alternative Splicing in Neurogenesis and Brain Development. *Front Mol Biosci.* 2018;5:12.
44. Raj B, Blencowe BJ. Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles. *Neuron* [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 May 30];87(1):14–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315004110>
45. Vuong CK, Black DL, Zheng S. The neurogenetics of alternative splicing.

- Nat Rev Neurosci [Internet]. 2016;17(5):265–81. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.27>
46. Boutz PL, Stoilov P, Li Q, Lin C-H, Chawla G, Ostrow K, et al. A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons. *Genes Dev* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2019 May 30];21(13):1636–52. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1558107>
 47. Black DL. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 May 30];72(1):291–336. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720>
 48. Markovtsov V, Nikolic JM, Goldman JA, Turck CW, Chou M-Y, Black DL. Cooperative Assembly of an hnRNP Complex Induced by a Tissue-Specific Homolog of Polypyrimidine Tract Binding Protein. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Oct 15 [cited 2019 May 30];20(20):7463–79. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.20.20.7463-7479.2000>
 49. Makeyev E V., Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Aug [cited 2019 May 30];27(3):435–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507004881>
 50. Keppetipola N, Sharma S, Li Q, Black DL. Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2012 Aug 2 [cited 2019 May 30];47(4):360–78. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409238.2012.691456>
 51. Li Q, Zheng S, Han A, Lin C-H, Stoilov P, Fu X-D, et al. The splicing regulator PTBP2 controls a program of embryonic splicing required for neuronal maturation. *Elife* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 24];3:e01201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24448406>
 52. Sharma S, Falick AM, Black DL. Polypyrimidine Tract Binding Protein Blocks the 5' Splice Site-Dependent Assembly of U2AF and the Prespliceosomal E Complex. *Mol Cell* [Internet]. 2005 Aug [cited 2019 May 30];19(4):485–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276505014784>

53. Hüttelmaier S, Illenberger S, Grosheva I, Rüdiger M, Singer RH, Jockusch BM. Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol.* 2001 Nov;155(5):775–86.
54. Coelho MB, Attig J, Bellora N, König J, Hallegger M, Kayikci M, et al. Nuclear matrix protein Matrin3 regulates alternative splicing and forms overlapping regulatory networks with PTB. *EMBO J.* 2015 Mar;34(5):653–68.
55. Attig J, Agostini F, Gooding C, Chakrabarti AM, Singh A, Haberman N, et al. Heteromeric RNP Assembly at LINEs Controls Lineage-Specific RNA Processing. *Cell.* 2018 Aug;174(5):1067-1081.e17.
56. Artero R, Prokop A, Paricio N, Begemann G, Pueyo I, Mlodzik M, et al. The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol.* 1998 Mar;195(2):131–43.
57. Bargiela A, Llamusi B, Cerro-Herreros E, Artero R. Two enhancers control transcription of *Drosophila* muscleblind in the embryonic somatic musculature and in the central nervous system. *PLoS One.* 2014;9(3):e93125.
58. Pascual M, Vicente M, Monferrer L, Artero R. The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation.* 2006 Mar;74(2–3):65–80.
59. Wang ET, Cody NAL, Jog S, Biancolella M, Wang TT, Treacy DJ, et al. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell.* 2012 Aug;150(4):710–24.
60. Charizanis K, Lee K-Y, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, et al. Muscleblind-like 2-Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy. *Neuron* [Internet]. 2012 Aug [cited 2019 May 30];75(3):437–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312005259>
61. Konieczny P, Stepniak-Konieczna E, Sobczak K. MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(17):10873–87.
62. Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshire MG, Harper PS, et al. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with

- nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet.* 2002 Apr;11(7):805–14.
63. Kanadia RN, Urbinati CR, Crusselle VJ, Luo D, Lee Y-J, Harrison JK, et al. Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns.* 2003 Aug;3(4):459–62.
 64. Nitschke L, Hu R-C, Miller AN, Lucas L, Cooper TA. Alternative splicing mediates the compensatory upregulation of MBNL2 upon MBNL1 loss-of-function. *Nucleic Acids Res [Internet].* 2023 Feb 22;51(3):1245–59. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1219>
 65. Kalsotra A, Cooper TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet [Internet].* 2011 Oct 16 [cited 2019 May 30];12(10):715–29. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg3052>
 66. Han H, Irimia M, Ross PJ, Sung H-K, Alipanahi B, David L, et al. MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature.* 2013 Jun;498(7453):241–5.
 67. McKinney BC, Sze W, Lee B, Murphy GG. Impaired long-term potentiation and enhanced neuronal excitability in the amygdala of Ca(V)1.3 knockout mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2009 Nov;92(4):519–28.
 68. Han S, Nam J, Li Y, Kim S, Cho S-H, Cho YS, et al. Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2010 Nov;30(45):15102–12.
 69. Yamamoto H, Kokame K, Okuda T, Nakajo Y, Yanamoto H, Miyata T. NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia. *J Biol Chem.* 2011 Jul;286(29):26158–65.
 70. Jin Y, Suzuki H, Maegawa S, Endo H, Sugano S, Hashimoto K, et al. A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* 2003 Feb;22(4):905–12.
 71. Nakahata S, Kawamoto S. Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(7):2078–89.
 72. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing

- factors. *J Biol Chem*. 2009 Nov;284(45):31052–61.
73. Weyn-Vanhentenryck SM, Mele A, Yan Q, Sun S, Farny N, Zhang Z, et al. HITS-CLIP and integrative modeling define the Rbfox splicing-regulatory network linked to brain development and autism. *Cell Rep*. 2014 Mar;6(6):1139–52.
 74. Zhou H-L, Lou H. Repression of prespliceosome complex formation at two distinct steps by Fox-1/Fox-2 proteins. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5507–16.
 75. Gehman LT, Meera P, Stoilov P, Shiu L, O'Brien JE, Meisler MH, et al. The splicing regulator Rbfox2 is required for both cerebellar development and mature motor function. *Genes Dev [Internet]*. 2012 Mar 1 [cited 2019 May 30];26(5):445–60. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.182477.111>
 76. Gehman LT, Stoilov P, Maguire J, Damianov A, Lin C-H, Shiu L, et al. The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain. *Nat Genet [Internet]*. 2011 Jul 29 [cited 2019 May 30];43(7):706–11. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.841>
 77. Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron*. 1993 Oct;11(4):657–72.
 78. Yang YY, Yin GL, Darnell RB. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct;95(22):13254–9.
 79. Li B, Suutari BS, Sun SD, Luo Z, Wei C, Chenouard N, et al. Neuronal Inactivity Co-opts LTP Machinery to Drive Potassium Channel Splicing and Homeostatic Spike Widening. *Cell [Internet]*. 2020;181(7):1547-1565.e15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420305754>
 80. Ule J. CLIP Identifies Nova-Regulated RNA Networks in the Brain. *Science (80-) [Internet]*. 2003 Nov 14 [cited 2019 May 30];302(5648):1212–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1090095>
 81. Ule J, Stefani G, Mele A, Ruggiu M, Wang X, Taneri B, et al. An RNA map

- predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature*. 2006 Nov;444(7119):580–6.
82. Jensen KB, Dredge BK, Stefani G, Zhong R, Buckanovich RJ, Okano HJ, et al. Nova-1 Regulates Neuron-Specific Alternative Splicing and Is Essential for Neuronal Viability. *Neuron* [Internet]. 2000 Feb [cited 2019 May 30];25(2):359–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627300809009>
 83. Huang CS, Shi S-H, Ule J, Ruggiu M, Barker LA, Darnell RB, et al. Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition. *Cell*. 2005 Oct;123(1):105–18.
 84. Saito Y, Yuan Y, Zucker-Scharff I, Fak JJ, Jereb S, Tajima Y, et al. Differential NOVA2-Mediated Splicing in Excitatory and Inhibitory Neurons Regulates Cortical Development and Cerebellar Function. *Neuron*. 2019 Feb;101(4):707-720.e5.
 85. Irimia M, Weatheritt RJ, Ellis JD, Parikshak NN, Gonatopoulos-Pournatzis T, Babor M, et al. A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. *Cell*. 2014 Dec;159(7):1511–23.
 86. Quesnel-Vallières M, Dargaei Z, Irimia M, Gonatopoulos-Pournatzis T, Ip JY, Wu M, et al. Misregulation of an Activity-Dependent Splicing Network as a Common Mechanism Underlying Autism Spectrum Disorders. *Mol Cell*. 2016 Dec;64(6):1023–34.
 87. Diering GH, Nirujogi RS, Roth RH, Worley PF, Pandey A, Huganir RL. Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science*. 2017 Feb;355(6324):511–5.
 88. Denkena J, Zaisser A, Merz B, Klinger B, Kuhl D, Blüthgen N, et al. Neuronal activity regulates alternative exon usage. *Mol Brain*. 2020 Nov;13(1):148.
 89. Mauger O, Lemoine F, Scheiffle P. Targeted Intron Retention and Excision for Rapid Gene Regulation in Response to Neuronal Activity. *Neuron* [Internet]. 2016 Dec 21 [cited 2019 May 30];92(6):1266–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28009274>
 90. Huang Y, Yario TA, Steitz JA. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun;101(26):9666–70.

91. Manceau V, Swenson M, Le Caer J-P, Sobel A, Kielkopf CL, Maucuer A. Major phosphorylation of SF1 on adjacent Ser-Pro motifs enhances interaction with U2AF65. *FEBS J* [Internet]. 2006 Feb [cited 2019 May 30];273(3):577–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16420481>
92. Kielkopf CL, Lücke S, Green MR. U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2019 May 30];18(13):1513–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231733>
93. Manceau V, Kremmer E, Nabel EG, Maucuer A. The Protein Kinase KIS Impacts Gene Expression during Development and Fear Conditioning in Adult Mice. Lyons LC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Aug 24 [cited 2019 May 30];7(8):e43946. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043946>
94. Cambray S, Pedraza N, Rafel M, Gari E, Aldea M, Gallego C. Protein Kinase KIS Localizes to RNA Granules and Enhances Local Translation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2019 May 30];29(3):726–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015237>
95. Pedraza N, Ortiz R, Cornadó A, Llobet A, Aldea M, Gallego C. KIS, a Kinase Associated with Microtubule Regulators, Enhances Translation of AMPA Receptors and Stimulates Dendritic Spine Remodeling. *J Neurosci* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2019 May 30];34(42):13988–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25319695>
96. Manceau V, Kielkopf CL, Sobel A, Maucuer A. Different requirements of the kinase and UHM domains of KIS for its nuclear localization and binding to splicing factors. *J Mol Biol*. 2008 Sep;381(3):748–62.
97. Chatrikhi R, Wang W, Gupta A, Loerch S, Maucuer A, Kielkopf CL. SF1 Phosphorylation Enhances Specific Binding to U2AF(65) and Reduces Binding to 3'-Splice-Site RNA. *Biophys J*. 2016 Dec;111(12):2570–86.
98. Wei T, Weiler SME, Tóth M, Sticht C, Lutz T, Thomann S, et al. YAP-dependent induction of UHMK1 supports nuclear enrichment of the oncogene MYBL2 and proliferation in liver cancer cells. *Oncogene*. 2019 Jul;38(27):5541–50.
99. Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2406–15.
100. Jiang M, Chen G. High Ca²⁺ -phosphate transfection efficiency in low-

- density neuronal cultures. 2006;1(2).
101. Ritter B, Ferguson SM, De Camilli P, McPherson PS. A lentiviral system for efficient knockdown of proteins in neuronal cultures [version 1; referees: 2 approved]. *MNI open Res.* 2017;1(2).
 102. John Wiley & Sons I. *Current Protocols in Molecular Biology.* 2001.
 103. Azman MS, Alard EL, Dodel M, Capraro F, Faraway R, Dermit M, et al. An ERK1/2-driven RNA-binding switch in nucleolin drives ribosome biogenesis and pancreatic tumorigenesis downstream of RAS oncogene. *EMBO J.* 2023 Jun;42(11):e110902.
 104. Vieira-Vieira CH, Dauksaite V, Sporbert A, Gotthardt M, Selbach M. Proteome-wide quantitative RNA-interactome capture identifies phosphorylation sites with regulatory potential in RBM20. *Mol Cell.* 2022 Jun;82(11):2069-2083.e8.
 105. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 2019 May;47(8):e47.
 106. Viphakone N, Sudbery I, Griffith L, Heath CG, Sims D, Wilson SA. Co-transcriptional Loading of RNA Export Factors Shapes the Human Transcriptome. *Mol Cell.* 2019 Jul;75(2):310-323.e8.
 107. Furlanis E, Traunmüller L, Fucile G, Scheiffle P. Landscape of ribosome-engaged transcript isoforms reveals extensive neuronal-cell-class-specific alternative splicing programs. *Nat Neurosci.* 2019 Oct;22(10):1709–17.
 108. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr;98(9):5116–21.
 109. Vuong JK, Lin C-H, Zhang M, Chen L, Black DL, Zheng S. PTBP1 and PTBP2 Serve Both Specific and Redundant Functions in Neuronal Pre-mRNA Splicing. *Cell Rep.* 2016 Dec;17(10):2766–75.
 110. Han H, Best AJ, Braunschweig U, Mikolajewicz N, Li JD, Roth J, et al. Systematic exploration of dynamic splicing networks reveals conserved multistage regulators of neurogenesis. *Mol Cell.* 2022 Aug;82(16):2982-2999.e14.
 111. Lou XJ, Bixby JL. Patterns of presynaptic gene expression define two stages of synaptic differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 1995

- Jun;6(3):252–62.
112. Rosenberg T, Gal-Ben-Ari S, Dieterich DC, Kreutz MR, Ziv NE, Gundelfinger ED, et al. The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:86.
 113. Li Q, Zheng S, Han A, Lin C-H, Stoilov P, Fu X-D, et al. The splicing regulator PTBP2 controls a program of embryonic splicing required for neuronal maturation. *Elife* [Internet]. 2014 Jan 21 [cited 2019 May 30];3. Available from: <https://elifesciences.org/articles/01201>
 114. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2002 Jun;16(8):869–71.
 115. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*. 2014 Sep;5:4767.
 116. Joshi A, Coelho MB, Kotik-Kogan O, Simpson PJ, Matthews SJ, Smith CWJ, et al. Crystallographic analysis of polypyrimidine tract-binding protein-Raver1 interactions involved in regulation of alternative splicing. *Structure*. 2011 Dec;19(12):1816–25.
 117. Gattoni R, Mahé D, Mähl P, Fischer N, Mattei MG, Stévenin J, et al. The human hnRNP-M proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. *Nucleic Acids Res*. 1996 Jul;24(13):2535–42.
 118. Salem A, Wilson CJ, Rutledge BS, Dilliot A, Farhan S, Choy W-Y, et al. Matrin3: Disorder and ALS Pathogenesis. *Front Mol Biosci*. 2021;8:794646.
 119. Xue Y, Ouyang K, Huang J, Zhou Y, Ouyang H, Li H, et al. Direct Conversion of Fibroblasts to Neurons by Reprogramming PTB-Regulated MicroRNA Circuits. *Cell* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 May 30];152(1–2):82–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741201433X>
 120. Coelho MB, Ascher DB, Gooding C, Lang E, Maude H, Turner D, et al. Functional interactions between polypyrimidine tract binding protein and PRI peptide ligand containing proteins. *Biochem Soc Trans*. 2016 Aug;44(4):1058–65.
 121. Mehmood A, Laiho A, Venäläinen MS, McGlinchey AJ, Wang N, Elo LL.

- Systematic evaluation of differential splicing tools for RNA-seq studies. *Brief Bioinform.* 2020 Dec;21(6):2052–65.
122. Robinson F, Smith CWJ. A splicing repressor domain in polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem.* 2006 Jan;281(2):800–6.
 123. Tsai C-F, Wang Y-T, Yen H-Y, Tsou C-C, Ku W-C, Lin P-Y, et al. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. *Nat Commun.* 2015 Mar;6:6622.
 124. Zheng S, Damoiseaux R, Chen L, Black DL. A broadly applicable high-throughput screening strategy identifies new regulators of Dlg4 (Psd-95) alternative splicing. *Genome Res.* 2013 Jun;23(6):998–1007.
 125. Cane M, Maco B, Knott G, Holtmaat A. The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability &em>In Vivo J Neurosci [Internet]. 2014 Feb 5;34(6):2075 LP – 2086. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/34/6/2075.abstract>
 126. Subramanian J, Michel K, Benoit M, Nedivi E. CPG15/Neuritin Mimics Experience in Selecting Excitatory Synapses for Stabilization by Facilitating PSD95 Recruitment. *Cell Rep.* 2019 Aug;28(6):1584-1595.e5.
 127. Bulovaite E, Qiu Z, Kratschke M, Zgraj A, Fricker DG, Tuck EJ, et al. A brain atlas of synapse protein lifetime across the mouse lifespan. *Neuron* [Internet]. 2022;110(24):4057-4073.e8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627322008145>
 128. Yeom K-H, Mitchell S, Linares AJ, Zheng S, Lin C-H, Wang X-J, et al. Polypyrimidine tract-binding protein blocks miRNA-124 biogenesis to enforce its neuronal-specific expression in the mouse. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2018 Nov 20;115(47):E11061–70. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1809609115>
 129. Tang ZZ, Sharma S, Zheng S, Chawla G, Nikolic J, Black DL. Regulation of the Mutually Exclusive Exons 8a and 8 in the CaV1.2 Calcium Channel Transcript by Polypyrimidine Tract-binding Protein. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Mar 25 [cited 2019 May 30];286(12):10007–16. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.208116>
 130. Romanelli MG, Diani E, Lievens PM-J. New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *Int J Mol Sci* [Internet].

- 2013 Nov 20 [cited 2019 May 24];14(11):22906–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24264039>
131. Kafasla P, Mickleburgh I, Llorian M, Coelho M, Gooding C, Cherny D, et al. Defining the roles and interactions of PTB. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2019 May 30];40(4):815–20. Available from: <http://www.biochemsoctrans.org/cgi/doi/10.1042/BST20120044>
 132. Ramesh N, Kour S, Anderson EN, Rajasundaram D, Pandey UB. RNA-recognition motif in Matrin-3 mediates neurodegeneration through interaction with hnRNPM. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Aug;8(1):138.
 133. Arfelli VC, Chang Y-C, Bagnoli JW, Kerbs P, Ciamponi FE, Paz LM da S, et al. UHMK1 is a novel splicing regulatory kinase. *J Biol Chem*. 2023 Apr;299(4):103041.
 134. Pedraza N, Ortiz R, Cornadó A, Llobet A, Aldea M, Gallego C. KIS, a kinase associated with microtubule regulators, enhances translation of AMPA receptors and stimulates dendritic spine remodeling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2014 Oct;34(42):13988–97.
 135. Allen JJ, Li M, Brinkworth CS, Paulson JL, Wang D, Hübner A, et al. A semisynthetic epitope for kinase substrates. *Nat Methods*. 2007 Jun;4(6):511–6.
 136. Makeyev E V., Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Aug 3 [cited 2019 May 30];27(3):435–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17679093>
 137. Zhang M, Ergin V, Lin L, Stork C, Chen L, Zheng S. Axonogenesis Is Coordinated by Neuron-Specific Alternative Splicing Programming and Splicing Regulator PTBP2. *Neuron* [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 May 16];101(4):690-706.e10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627319300492>
 138. Ling JP, Chhabra R, Merran JD, Schaughency PM, Wheelan SJ, Corden JL, et al. PTBP1 and PTBP2 Repress Nonconserved Cryptic Exons. *Cell Rep*. 2016 Sep;17(1):104–13.
 139. Polydorides AD, Okano HJ, Yang YYL, Stefani G, Darnell RB. A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci*

- [Internet]. 2000 Jun 6 [cited 2019 May 30];97(12):6350–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.110128397>
140. Keppetipola NM, Yeom K-H, Hernandez AL, Bui T, Sharma S, Black DL. Multiple determinants of splicing repression activity in the polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2. *RNA*. 2016 Aug;22(8):1172–80.
 141. Ule J, Blencowe BJ. Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution. *Mol Cell*. 2019 Oct;76(2):329–45.
 142. Newcombe EA, Delaforge E, Hartmann-Petersen R, Skriver K, Kragelund BB. How phosphorylation impacts intrinsically disordered proteins and their function. Mukhopadhyay S, editor. *Essays Biochem* [Internet]. 2022 Dec 16;66(7):901–13. Available from: <https://doi.org/10.1042/EBC20220060>
 143. Thapar R. Structural Basis for Regulation of RNA-Binding Proteins by Phosphorylation. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2015 Mar 20;10(3):652–66. Available from: <https://doi.org/10.1021/cb500860x>
 144. Markovtsov V, Nikolic JM, Goldman JA, Turck CW, Chou MY, Black DL. Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Oct [cited 2019 May 30];20(20):7463–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11003644>
 145. Attig J, Ule J. Genomic Accumulation of Retrotransposons Was Facilitated by Repressive RNA-Binding Proteins: A Hypothesis. *Bioessays*. 2019 Feb;41(2):e1800132.
 146. Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, et al. Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing. *Genes Cells*. 2017 Sep;22(9):785–98.
 147. Arake de Tacca LM, Pulos-Holmes MC, Floor SN, Cate JHD. PTBP1 mRNA isoforms and regulation of their translation. *RNA*. 2019 Oct;25(10):1324–36.