



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*Identificación del factor de splicing SLU7 como
controlador de la estabilidad genómica*

MADDALEN JIMÉNEZ ANDRÉS

Tesis doctoral

2019



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Identificación del factor de splicing SLU7 como controlador de la estabilidad genómica

Memoria presentada por D^a Maddalen Jiménez Andrés para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Hepatología del Centro de Investigación Médica Aplicada y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 20 de agosto de 2019

Dra. Carmen Berasain Lasarte

Dra. Raquel Urtasun Alonso

Este trabajo se ha llevado a cabo con la ayuda de una Beca Predoctoral concedida por la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

*La mente tiene exactamente el mismo poder que las manos:
no sólo para abrazar al mundo sino para cambiarlo*

(Colin Wilson)

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar esta oportunidad para expresar la gratitud que siento por todos aquellos que habéis hecho posible que hoy pueda dar por finalizada mi tesis doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad de Navarra y al Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral. A la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra por haberme otorgado una beca pre-doctoral, y a todas aquellas personas que año tras año con sus donaciones hacen posible que jóvenes como yo podamos iniciar nuestra carrera investigadora.

Muy especialmente agradecer a mi directora de tesis la Dra. Carmen Berasain. Gracias por toda tu dedicación durante estos cuatro años, en los cuales puedo decir que he alcanzado mis objetivos. Quiero resaltar toda la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, que sin ella y sin la debida supervisión no hubiera sido posible. ¡Eskerrik asko por toda la enseñanza que has dejado en mí!

También aprovecho para agradecer al director del Departamento de Hepatología Dr. Matías Ávila. Tu orientación y aportación han sido fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mi codirectora Raquel, porque si hoy he llegado hasta aquí es por todo lo que ha contribuido ella a esta tesis. Para mí eres un referente, admiro la actitud y humanidad que muestras siempre. Gracias por toda tu dedicación, por no dejar nunca de interesarte por mí, y por sacar siempre tiempo para ayudarme a pesar de no estar a mi lado. Benetan izaten ahal nuen ko-zuzendaririk hoberena izan zara! Seguiremos compartiendo aficiones y espero que poco a poco se vayan cumpliendo nuestros planes de futuro. Zorte on lagun!

Por supuesto esta tesis doctoral tampoco hubiera sido posible sin la colaboración de todas mis compañeras del 4.02.

Elizalde, quiero darte las gracias por tu trabajo, por tu apoyo y por tu comprensión. Pero, sobre todo quiero darte las gracias por tu amistad y por todo el cariño recibido. Ha sido y será un placer trabajar a tu lado. Ahora nos toca lo difícil, el separarnos. Bihotz-bihotzez mila esker eman didazun guztiarengatik!

Areche, tu llegada ha supuesto mucho para mí y no me cabe la menor duda que también para el resto del equipo. Eres uno de los pilares de este grupo, siempre dispuesta a ayudar, a aportar nuevas ideas en nuestros proyectos o a enseñar a las

más jóvenes cómo enfrentarnos a las dificultades de la tesis. Gracias por la dedicación que has puesto en todo lo que he necesitado.

Azkona, gracias por mostrar siempre tan buena disposición y por enseñarme con paciencia a trabajar con los ratones. ¡Eskerrik asko por aportarme esa alegría y buen ambiente durante estos cuatro años!

Por último, agradecer a María Garate y Miriam. Habéis traído aire fresco y alegría al laboratorio, las tardes se han hecho mucho más amenas a vuestro lado. Ya sabéis que la tesis no es un camino fácil, son muchas horas de trabajo y de esfuerzo. Por suerte estáis rodeadas de las mejores personas que puede tener un grupo de investigación. ¡Ánimo chicas!

Me gustaría agradecer también a todas las personas que forman parte del Departamento de Hepatología, siempre os habéis mostrado dispuestos a colaborar y a ayudar en todo lo que habéis podido. Uxue, mis comienzos fueron contigo, durante el TFG me diste a conocer muchas técnicas y, ahora durante la tesis, has estado accesible para sugerirme soluciones rápidas siempre que he acudido a ti. Por supuesto, también quiero agradecerte por el tiempo que has invertido en la generación de las construcciones para nuestros experimentos. Iker y Roberto, gracias a los dos por todos los ratones que tuvisteis que “hepatectomizar”. A ti Roberto también darte las gracias por toda la ayuda que me has ofrecido y por todos esos momentos de desconexión tan necesarios. ¡Eres una gran persona! Agradecer también a las chicas que iniciaron casi a la par mía este mismo camino. Gloria, Marina y Leticia, si tuviera que elegir un momento de todos los vividos con vosotras, sin duda me quedaría con este último congreso en Viena.

Mi reconocimiento a Diego Alignani por toda la ayuda que nos ofreció desde la primera vez que acudimos a él unas inexpertas del citrómetro como nosotras. También, agradecer la generosidad del Dr. A. Aguilera (Sevilla, España) por facilitarnos la enzima RNasa H1 y del Dr. JM Peters (Austria) por cedernos el anticuerpo de sororina. En particular, dar las gracias a los pacientes por su participación y al Biobanco de la Universidad de Navarra por su colaboración.

Durante estos años en el CIMA, he estado rodeada de muchísima gente maravillosa de otros departamentos. Aina, Sheila, Carla y Montse ha sido un placer el haber compartido con vosotras estos años de tesis. En vosotras he encontrado la comprensión y el apoyo necesario para superar los desánimos que a veces conlleva la tesis. También he encontrado un grupo de amigas con el que compartir momentos únicos de risas y diversión. Por mucho que nos distanciamos, espero que nunca se pierda esta amistad. Diego, gracias por regalarme tantos momentos especiales,

gracias por tu amistad, tu compañía y por todo el cariño que he recibido y recibo siempre de ti. No me quiero olvidar tampoco de Esther, Miren, Ana Cris, Cristina, Bea y de muchas otras personas más que he ido conociendo a lo largo de estos años. A todas ellas, gracias por hacer el día a día más fácil y agradable.

Con el permiso de todos, me gustaría dedicarles unas palabras en euskera a mis amigas de la cuadrilla. Naia, Izas, Eneritz, Eila, Ainara, Nahia eta Maddi, zuei ere eskerrik asko! Mila esker behar izan dudanean beti hor egon zaretelako. Bereziki eskertu nahiko nizuke zuri Naia, urrun egon arren, beti hurbil sentitu zaitutelako. Mila esker beti igorri didazun maitasunarengatik! Izas, zuri ere hitz batzuk eskaini nahi dizkizut beti entzuteko prest, ulerkor eta maitekor egon zarelako. Eskerrik asko momentu grisetan kolorea jartzeagatik, maite zaitut lagun! Eneritz, biek pasa behar izan dugu ikasketaren etapa gogor honetatik, zu oposaketekin eta ni tesiarekin. Eskertzen dizut niregan erakutsi duzun kezka eta interes guztiarengatik, eta mila esker ere bai eskatu dizkizudan fabore guztietan laguntzeko prest agertzeagatik! Azkenik, eskertu Iratxe eta Mireni. Zuetaz ere ezin naiteke ahaztu, bata institutuko lagun mina eta bertzea unibertsitatekoa, biak pertsona garrantzitsuak. Mila esker zuei ere!

Me encantaría agradecer a Miriam y a Dani. No sólo habéis hecho del deporte mi momento del día, también habéis sabido animarme y sacarme una sonrisa siempre que he estado más agobiada. Gracias por aportarme tanta alegría y felicidad. ¡Os aprecio muchísimo amigos!

No me quiero olvidar de mis “compis” Héctor, Javi y Lenny. Me quedo con los buenos momentos que hemos pasado en el piso, con los consejos que me habéis ido dando y con lo fácil y divertida que habéis hecho la convivencia. Os deseo lo mejor a los tres y espero que guardéis un recuerdo tan bonito de esta convivencia como el que guardo yo.

Quisiera aprovechar también para agradecer a mi familia que siempre está a mi lado. A todas mis tías, tíos, primas y primos ¡Gracias!

En especial, me gustaría agradecer a ti, tía Lourdes, por el entusiasmo e ilusión que muestras por cada pasito que doy y por todo el cariño que recibo siempre de ti.

Que decirte a ti, Eva... eres mi confidente, mi prima y mi amiga. Siempre unidas, apoyándonos en todas las decisiones. ¡Gracias por ser como eres y por creer tanto en mí! A mi otra prima, Leire gracias por tu generosidad y por la capacidad que tienes de animarme y sacarme una sonrisa.

A ti Amatxito porque un abrazo tuyo vale más que mil consejos. Gracias por todo lo que has supuesto y supones en mi vida. Maite zaitut!

A ti tío Manolo, agradecerte por los mensajes de ánimo que recibo y por mostrarte siempre orgulloso de mi trayectoria.

También me gustaría dedicarte unas palabras a ti Abuela, que siempre has vivido con ilusión cada logro de tus nietos. Gracias por formar un núcleo familiar tan maravillosa dónde siempre me he sentido arropada. ¡Te quiero!

Por último, desde lo más íntimo y personal agradecer a mis pilares.

Julen, admiro tu valentía de abrirte al mundo y de enfrentarte a lo desconocido. No importan los kilómetros que nos separen porque sabemos que siempre estaremos unidos. Zoriontasuna opa dizut!

Aita y Ama, eskerrik asko por todo el cariño y protección que he recibido, por los valores que me habéis inculcado, por aconsejarme y apoyarme en todas las decisiones, por toda la confianza que ponéis siempre en mí, y por hacer de mí una persona libre y feliz. Esta tesis os la dedico con especial cariño a vosotros. Maite zaituztet familia!

ABREVIATURAS

3'UTR: *3' untranslated region* (región 3' no traducida)

AAV: *Adeno-associated virus* (Virus adenoasociado)

AID: *Activation-induced deaminase*

AREG: *Amphiregulin*

APC/C: *Anaphase-promoting complex/cyclosome*

ATCC: *American Type Culture Collection*

AURKB: *Aurora kinase B*

BCA: *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinconínico)

BSA: *Bovine serum albumin*

BER: *Base excision repair* (Reparación por escisión de bases)

BUB: *Budding uninhibited by benzimidazole*

C13orf25: *Human chromosome 13 open reading frame 25*

CDK1: *Cyclin-dependent kinase 1*

cDNA: *Complementary DNA* (DNA complementario)

CIN: *Chromosome instability* (Inestabilidad cromosómica)

CRM1: *Chromosomal region maintenance 1*

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM: *Dubelcco's modified Eagle's medium*

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DNasa: Desoxirribonucleasa

DNMT3B1: *DNA methyltransferase 3B1*

dNTP: *Deoxynucleoside triphosphates* (Desoxinucleósidos trifosfato)

DPBS: *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (Tampón fosfato salino de Dubelcco)

DSB: *Double strand breaks* (Roturas de doble cadena de DNA)

DTT: Ditioneitol

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EJC: *Exon-exon junction complex*

ELK-1: *ETS domain-containing protein*

ESE: *Exonic splicing enhancer* (Elementos exónicos activadores del *splicing*)

ESRP2: *Epithelial splicing regulatory protein 2*

ESS: *Exonic splicing silencer* (Elementos exónicos silenciadores del *splicing*)

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*
(Clasificación de células activadas por fluorescencia)

FBS: *Fetal bovine serum* (Suero fetal bovino)

γ-H2AX: Histona H2AX fosforilada

gDNA: *Genomic DNA* (DNA genómico)

GPS: *Glutamine/penicillin/streptomycin* (Glutamina/penicilina/estreptomicina)

H3S10P: Histona 3 fosforilada en la serina 10

HBx: *Hepatitis B viral protein*

HCC: Hepatocarcinoma

HGF: *Hepatocyte growth factor*

HumHep: *Human hepatocytes* (Hepatocitos humanos)

HNF4α: *Hepatocytes nuclear factor 4α*

hnRNP: *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

HP: Hepatectomía parcial

HR: *Homologous recombination* (Recombinación homóloga)

IHQ: Inmunohistoquímica

IR: *Insulin receptor*

ISE: *Intronic splicing enhancer* (Elementos intrónicos activadores del *splicing*)

ISS: *Intronic splicing silencer* (Elementos intrónicos silenciadores del *splicing*)

JNK1: *c-Jun N-terminal kinase 1*

KLF6: *Krüppel like factor 6*

LPK: *L-pyruvate kinase*

MAD2: *Mitotic arrest deficient 2*

MCC: *Mitotic checkpoint complex*

microRNA: *Small non-coding RNA* (RNA pequeño no codificante)

MMR: *DNA mismatch repair* (Reparación de errores de emparejamiento del DNA)

miR-17: microRNA-17

mRNA: *Messenger RNA* (RNA mensajero)

mRNP: *Messenger ribonucleoprotein*

NER: *Nucleotide excision repair* (Reparación por escisión de nucleótidos)

NHEJ: *Non-homologous end joining* (Ligación de extremos no homólogos)

NLS: *Nuclear localization signal* (Señal localizadora nuclear)

NMD: *Nonsense-mediated mRNA decay* (Degradación de los mRNA sin sentido)

O1: Oligo 1 de RNA biotinilado del intrón 1 de *sororina*

O2: Oligo 2 de RNA biotinilado del intrón 1 de *sororina*

PARP1: *Poly (ADP-ribose) polymerase 1*

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PKM2: *Pyruvate kinase M2*

PLK1: *Polo-like kinase 1*

pre-mRNA: *Precursor messenger RNA* (Precursor de RNA mensajero)

Proteína SR: Proteína rica en serina y arginina

PTC: *Premature termination codon* (Codón de terminación prematuro)

RBP: *RNA-binding protein*

RISC: *RNA-induced silencing complex*

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RNA-CLIP: *RNA cross-link immunoprecipitation*
(Inmunoprecipitación de RNA entrecruzado)

RNasa: Ribonucleasa

RNAP: *RNA polimerase*

RNH1: RNasa H1

ROS: *Reactive oxygen species* (Especies reactivas de oxígeno)

RPA: *Replication protein A*

RPMI: *Rosswell Park Memorial Institute*

RRM: *RNA recognition motif* (Motivo de reconocimiento de RNA)

RT: *Reverse transcription* (Retrotranscripción)

SAC: *Spindle assemble checkpoint*
(Sistema de control del ensamblaje del huso acromático)

SCC: *Sister chromatid cohesion* (Cohesión entre las cromátidas hermanas)

SGO1: Shugoshina 1

shRNA: *Short hairpin RNA* (siRNA con estructura de horquilla)

SH: *Sham* (Control de cirugía)

siRNA: *Small interfering RNA* (RNA pequeño de interferencia)

SLU7: *Synergistic lethal with U5 snRNA*

SMC: *Structural maintenance of chromosome*

snRNP: *Small nuclear ribonucleoprotein*

SNW1: *SNW domain-containing protein 1*

SRSF: *Serine and arginine rich splicing factor*

SRSF1: *Serine and arginine rich splicing factor 1* o ASF/SF2

SRSF2: *Serine and arginine rich splicing factor 2* o SC35

SRSF3: *Serine and arginine rich splicing factor 3* o SRp20

SRSF3-ISO1: Isoforma 1 de SRSF3

SRSF3-ISO2: Isoforma 2 de SRSF3

SRSF3-TR: Proteínas truncadas de SRSF3

TAGIN: *Transcription-associated genome instability*
(Inestabilidad genómica asociada a la transcripción)

TAM: *Transcription-associated mutagenesis*
(Mutaciones asociadas a la transcripción)

TAR: *Transcription-associated recombination*
(Recombinación asociada a la transcripción)

THO/TREX: *Transcription-export complex*

UBL5: *Ubiquitin-like protein 5*

UA: Unidades arbitrarias

UV: Ultravioleta

Var 6: Variante 6 de SRSF1

WAPL: *Wings apart-like protein*

Las abreviaturas referentes a proteínas o a complejos proteicos no se han traducido al castellano.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	21
1. Inestabilidad genómica y cáncer	23
1.1. Daño en el DNA: causas y mecanismos de reparación.....	24
1.1.1. Inestabilidad genómica asociada a la transcripción	25
1.1.2. Formación de híbridos RNA:DNA o R-loops durante la transcripción	27
1.2. Inestabilidad cromosómica: causas y mecanismos de control	29
1.2.1. Sistema de control del ensamblaje del huso acromático (SAC)	30
1.2.2. Cohesión entre las cromátidas hermanas	31
1.3. <i>Splicing</i> alternativo e inestabilidad genómica	34
1.3.1. Proceso de <i>splicing</i> constitutivo y alternativo	35
1.3.2. <i>Splicing</i> alternativo y daño en el DNA	38
1.3.3. <i>Splicing</i> alternativo e inestabilidad cromosómica	40
2. El proceso de hepatocarcinogénesis	42
2.1. Regulación de factores de <i>splicing</i> y hepatocarcinogénesis	44
2.2. Alteraciones de eventos de <i>splicing</i> y hepatocarcinogénesis	45
3. SLU7 y hepatocarcinogénesis.....	48
3.1. Papel de SLU7 en la diferenciación hepática y la hepatocarcinogénesis	49
3.2. SLU7 y supervivencia de células transformadas.....	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS	58
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. Muestras de hígados humanos	61
2. Líneas celulares	61
3. Material y reactivos generales	62
4. Anticuerpos	62
5. Transfección transitoria de células.....	62
6. Extracción de RNA y retrotranscripción	64
7. PCR convencional y PCR a tiempo real.....	65
8. Inmunodetección de proteínas (<i>Western blot</i>).....	67

9. Citometría de flujo	68
10. Extensión de cromosomas	69
11. Inmunofluorescencia	70
12. Detección de R-loops	71
13. RNA-pull down	75
14. RNA <i>cross-linking immunoprecipitation</i> (CLIP)	76
15. Producción de los virus adenoasociados	78
16. Ensayos <i>in vivo</i>	79
17. Inmunohistoquímica de γ -H2AX y Ki-67	80
18. Análisis de la ploidía.....	81
19. Análisis estadístico	82
RESULTADOS	83
1. Implicación de SLU7 en la progresión del ciclo celular	85
1.1. SLU7 es necesario para la correcta progresión del ciclo celular.....	85
1.2. El silenciamiento de SLU7 induce la parada en mitosis de las células transformadas.....	89
2. El silenciamiento de SLU7 en las células transformadas induce alteraciones mitóticas.....	91
2.1. SLU7 es necesario para la correcta formación del huso acromático durante la mitosis.....	91
2.2. SLU7 asegura la correcta cohesión entre las cromátidas hermanas	94
2.3. Implicación de SLU7 en el <i>splicing</i> de <i>sororina</i>	96
3. SLU7 es necesario para evitar la inestabilidad genómica asociada a la transcripción.....	101
3.1. El silenciamiento de SLU7 induce la acumulación de híbridos RNA:DNA (R-loops) y daño en el DNA.....	101
3.2. Implicación de SLU7 en el <i>splicing</i> de <i>SRSF1</i> y <i>SRSF3</i>	109
3.3. Inducción de las proteínas truncadas de <i>SRSF3</i> tras el silenciamiento de SLU7	113
4. Las proteínas truncadas de <i>SRSF3</i> participan en la acumulación de R-loops inducida al silenciar SLU7	115
4.1. El silenciamiento de <i>SRSF3-ISO2</i> previene la alteración del <i>splicing</i> y expresión de <i>SRSF1</i> asociadas al silenciamiento de SLU7	115

4.2. El silenciamiento de SRSF3-ISO2 previene la acumulación de R-loops y la inducción de daño en el DNA asociadas al silenciamiento SLU7	116
4.3. Las proteínas truncadas de SRSF3 pueden actuar como dominante negativo de SRSF3-ISO1.....	118
5. Las proteínas truncadas de SRSF3 participan en las alteraciones mitóticas observadas en las células silenciadas de SLU7.....	121
5.1. La prevención de la expresión de SRSF3-ISO2 en las células silenciadas de SLU7 revierte la parada en el ciclo celular y previene la muerte por apoptosis	121
5.2. El silenciamiento de SRSF3-ISO2 corrige la falta de cohesión entre las cromátidas hermanas inducida al silenciar SLU7	123
5.3. Las proteínas truncadas de SRSF3 regulan de forma directa el <i>splicing</i> alternativo de <i>sororina</i>	125
6. El microRNA miR-17 previene el fenotipo alterado de las células transformadas silenciadas de SLU7	130
6.1. La expresión de miR-17 corrige las alteraciones mitóticas.....	130
6.2. Implicación de miR-17 en la regulación de la expresión de SRSF3-ISO2 ...	134
6.3. miR-17 previene el <i>splicing</i> aberrante de <i>SRSF1</i> y la acumulación de R-loops	137
7. La ausencia de SLU7 en el hígado de ratón induce inestabilidad genómica..	139
7.1. La ausencia de SLU7 compromete el proceso de regeneración hepática .	139
7.2. La disminución de la expresión de SLU7 en el hígado promueve el <i>splicing</i> aberrante de <i>sororina</i> durante la regeneración tras la hepatectomía parcial	142
7.3. SLU7 es esencial para mantener la estabilidad genómica en el hígado del ratón	144
7.4. Papel <i>in vivo</i> de las proteínas SRSF3-TR: expresión en la patología hepática	146
DISCUSIÓN	149
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163
ANEXOS	183

INTRODUCCIÓN

1. INESTABILIDAD GENÓMICA Y CÁNCER

La estabilidad genómica es esencial para preservar la homeostasis y la viabilidad celular, y para garantizar la integridad en la transmisión de la información genética entre generaciones de células. Sin embargo, el genoma está expuesto a continuas agresiones endógenas y exógenas que predisponen a aumentar las variaciones en la secuencia primaria del DNA (*deoxyribonucleic acid*), además de condicionar la dotación del material genómico, eventos que pueden repercutir en la integridad celular¹. A menudo, estas modificaciones genéticas se acompañan por la pérdida de la expresión de genes supresores de tumores junto con la activación de oncogenes que encaminan a la célula hacia la transformación maligna². Para prevenir el desarrollo y la acumulación de estas alteraciones, la célula dispone de una serie de mecanismos de supervisión que actúan de manera coordinada para asegurar la integridad en la duplicación del DNA y permitir así la transmisión completa de la información genética a las células hijas³.

La aparición de alteraciones lleva a la activación de distintos sistemas de control que promueven una parada temporal en el ciclo celular concediendo a la célula la oportunidad de reparar dichas lesiones y, por consiguiente, permitiendo su progresión en el ciclo celular y su supervivencia. Sin embargo, el incremento en la eventualidad y severidad de las agresiones puede generar una situación, en la cual la acumulación de alteraciones sin resolver exceda la capacidad reparadora de la célula. En este contexto, se promueve la senescencia celular o la muerte programada por apoptosis. Ambas respuestas evitan el asentamiento y la transmisión de alteraciones entre generaciones celulares⁴.

En ciertas situaciones, la fidelidad de los mecanismos de respuesta al daño en el DNA y los sistemas de supervisión mitóticos puede fallar, pudiendo conducir a la propagación de células con genomas inestables que albergan alteraciones a distintos niveles: desde lesiones en el DNA asociadas a mutaciones o a reordenamientos cromosómicos, hasta inestabilidad cromosómica por la pérdida o ganancia en el número o fragmentos de cromosomas (*chromosome instability*, CIN) (Figura 1)⁵. Este ambiente de inestabilidad genómica facilita la adquisición por parte de la célula de las habilidades propias de las células transformadas: evasión de los mecanismos de regulación del ciclo celular, proliferación ilimitada, invasión y metástasis⁶. Por todo ello, en diferentes situaciones pre-neoplásicas, incluida la cirrosis, se observa la activación de las vías de respuesta al daño en el DNA⁷⁻¹⁰, lo cual enfatiza la relevancia de la inestabilidad genómica como una característica facilitadora del desarrollo del cáncer⁶.

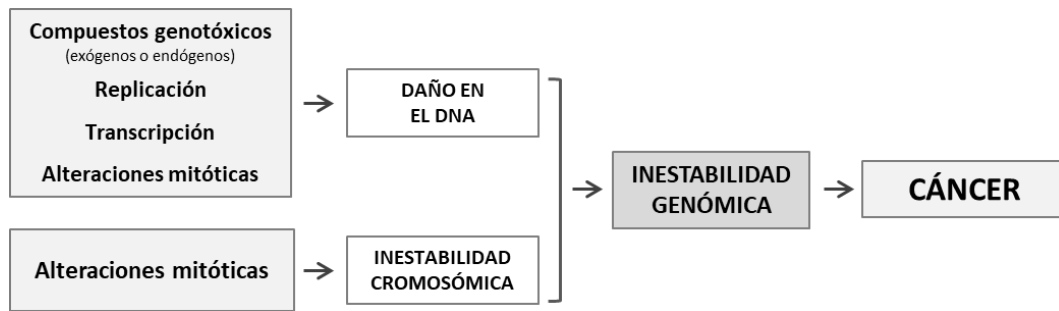


Figura 1. La acumulación de alteraciones genómicas sin reparar predispone al desarrollo de cáncer. La acumulación de alteraciones mitóticas y las lesiones en el DNA promueven inestabilidad genómica, condición que predispone al desarrollo de cáncer.

1.1. Daño en el DNA: causas y mecanismos de reparación

El genoma está sujeto a constantes variaciones que a menudo forman parte de la evolución natural de la especie. No obstante, el incremento de lesiones sin resolver en el DNA da lugar a la inducción de inestabilidad genómica. Estas alteraciones en el DNA se pueden originar por distintos factores ambientales o procesos celulares (Figura 1).

En primer lugar, cabe mencionar el daño en el DNA que se genera por la acción de genotóxicos, incluida la exposición a la radiación ultravioleta o iónica y la acumulación de compuestos endógenos derivados del metabolismo celular ¹¹. En este grupo, las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) son una de las mayores fuentes internas de daño al DNA con efecto dramático sobre la estabilidad genómica ¹². Mayoritariamente, estos agentes promueven roturas de doble cadena de DNA (*double strand break*, DSB) que derivan con facilidad en reordenamientos cromosómicos incluyendo eventos de translocación, deleción, inversión o duplicación de regiones concretas del cromosoma ¹¹.

En segundo lugar, las alteraciones durante los procesos biológicos como la transcripción y la replicación o la mitosis ¹³⁻¹⁵, en los cuales el DNA es más accesible y vulnerable a la acción de agresiones, contribuyen de forma evidente a la inestabilidad genómica por daño en el DNA. En este sentido, la replicación de los "sitios frágiles" ¹⁶, los errores de copia incorporados por la DNA polimerasa ¹³ o la conformación abierta que adquieren las hebras de DNA durante los procesos de replicación y transcripción son algunos otros eventos, que contribuyen de manera significativa a aumentar la frecuencia de mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos y lesiones en el DNA ^{13,17}. Otra forma destacada de inestabilidad genómica, detectada principalmente en las células en proliferación, es el estrés

replicativo asociado a la transcripción. En estas situaciones, los conflictos espacio-temporales que se generan por la simultaneidad de ambos procesos repercuten en la precisión y fidelidad de la replicación, pudiendo dar lugar a cromosomas parcialmente duplicados y a roturas en el DNA^{18,19}. Así mismo y como veremos más adelante, durante la transcripción la formación de estructuras híbridas entre el mRNA (*messenger ribonucleic acid*) y la cadena de DNA complementaria (R-loops) favorece la acumulación de roturas en la cadena de DNA codificante^{17,20}.

No obstante, ante estas situaciones la célula no se encuentra desprotegida. Tras la detección del daño, pone en marcha los mecanismos de reparación oportunos que evitan el asentamiento de alteraciones en el genoma. Para ello, es fundamental una perfecta coordinación entre los sistemas de detección, la regulación de la expresión génica y la acción de las enzimas que participan en el proceso de reparación del daño²¹. Dependiendo del tipo de lesión establecida, los mecanismos de reparación activados serán de un tipo u otro.

Así, las lesiones generadas por cambios puntuales en la secuencia de DNA son restauradas mediante los mecanismos de reparación de errores de emparejamiento (*mismatch repair*, MMR), de escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER) o de escisión de bases (*base excision repair*, BER)¹¹.

Ante la presencia de roturas de doble cadena de DNA (DSB) rápidamente se produce la fosforilación en la serina 139 de la H2AX (γ -H2AX), que promueve la activación de efectores responsables de la iniciación de las principales vías de reparación: la vía de la recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR) y la vía de la ligación de extremos no homólogos (*non homologous end-joining*, NHEJ), siendo esta última el sistema de reparación predominante en las células eucariotas^{22,23}.

Las alteraciones en cualquiera de estas vías de detección y reparación del daño en el DNA conllevan a múltiples variaciones genéticas que, como ya se ha comentado al inicio, a menudo resultan en la activación de oncogenes o en la inhibición de genes supresores de tumores, contribuyendo así a la transformación celular y a la iniciación del proceso de carcinogénesis^{7,8}.

1.1.1. Inestabilidad genómica asociada a la transcripción

Todos los eventos que comprenden el metabolismo del RNA, desde su elongación durante la transcripción, el procesamiento de los intrones o el *splicing*, su transporte al citoplasma hasta su degradación, pueden influir en la estabilidad de la integridad genómica²⁴. El potencial oncogénico de estos procesos viene

asociado entre otros mecanismos a la desregulación del programa de expresión génica²⁵ y, en menor medida, a la acumulación de estructuras híbridas de RNA:DNA (R-loops) durante la transcripción^{17,24,26}.

La inestabilidad genómica asociada a la transcripción, TAGIN (*transcription-associated genome instability*), es consecuencia tanto de la acumulación de altos niveles de mutaciones puntuales (*transcription-associated mutation, TAM*), como de eventos de recombinación (*transcription-associated recombination, TAR*)^{14,27}. Brevemente, el avance de la RNA polimerasa genera enrollamiento positivo o negativo de la doble hélice de DNA por delante o detrás de la maquinaria de transcripción²⁸, condición que puede derivar en estrés torsional y roturas en el DNA si no es resuelto con eficacia por las enzimas DNA topoisomerasas²⁹. La apertura de la doble cadena de DNA y la remodelación de la cromatina que se producen durante la transcripción suponen la exposición de la hebra de DNA no transcrita a posibles agresiones de compuestos genotóxicos, que pueden resultar en la desestabilización de su secuencia primaria y, por tanto, en una fuente importante de variabilidad genética¹⁷. Además, esta apertura se ve favorecida por la formación natural de estructuras híbridas entre el DNA y la nascente hebra de RNA (R-loops)¹⁷, en muchas ocasiones promovida por las restricciones topológicas y estructurales que exhibe la propia hebra de DNA, o por la presencia de secuencias repetidas en ella^{17,23,30}. La persistencia y/o acumulación de R-loops por diferentes motivos resulta en el bloqueo de la transcripción y la inducción de TAGIN y estrés replicativo³¹.

Por último, en las células en proliferación la replicación puede generar importantes reordenamientos cromosómicos o eventos de recombinación asociadas a la transcripción^{17,19}. Como ya se ha adelantado, a veces la maquinaria de transcripción compite con la maquinaria de replicación por la misma hebra de DNA pudiendo suponer la transcripción un obstáculo para la progresión de la replicación^{32,33}. En estas situaciones, ambas maquinarias pueden encontrarse y colisionar tanto de manera co-direccional como enfrentadas la una contra la otra (*head-to-head*), pudiendo derivar ambos eventos en inestabilidad genómica asociada a una parada prolongada de la horquilla de replicación o estrés replicativo^{19,34}. Como consecuencia de esta parada, pueden generarse DSB en el DNA que son resueltas por la activación de efectores responsables de la reparación de la vía de HR o NHEJ²³. Sin embargo, una parada persistente de la horquilla de replicación conduce a sucesivas roturas en la hebra de DNA, que al no ser restauradas favorecen la inducción de inestabilidad genómica¹.

1.1.2. Formación de híbridos RNA:DNA o R-loops durante la transcripción

Los R-loops se forman durante la transcripción cuando la hebra de RNA sintetizada hibrida con la hebra complementaria de DNA formando un híbrido de RNA:DNA (Figura 2).

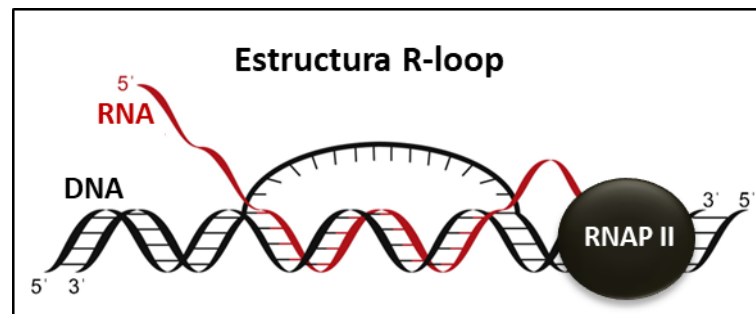


Figura 2. Estructura del híbrido de RNA:DNA o R-loop.

Los R-loops juegan un papel importante en una gran variedad de funciones fisiológicas como el cambio de clase de las inmunoglobulinas en los linfocitos B, la replicación mitocondrial, la regulación de la expresión de genes y la reparación del daño en el DNA ³⁵. En este sentido, ha sido bien caracterizada la funcionalidad de los R-loops en el proceso de desaminación de la citidina asociado a la vía AID (*activation-induced deaminase*), que se lleva a cabo durante el cambio de clase de las inmunoglobulinas y la recombinación somática ³⁶.

La formación y estabilización de los R-loops se favorece sobre todo en determinadas regiones del DNA, las cuales presentan una secuencia rica en guanina (G), torsión negativa que promueve la apertura del DNA, estructuras denominadas cuádruplex-G o lesiones en el DNA ^{35,37}. Por otro lado, la formación de R-loops en las islas CpG de regiones promotoras se ha asociado con la regulación positiva de la transcripción de distintos genes, ya que se ha observado que protegen a estas regiones de la metilación por la acción de DNMT3B1 (*DNA methyltransferase 3B1*), modificación epigenética responsable del silenciamiento de la expresión de distintos genes ³⁸. Por el contrario, la formación de R-loops en regiones más próximas a la cola poliA lleva a la parada y liberación de la RNA polimerasa regulando así la terminación de la transcripción ^{35,38}.

Sin embargo, los cambios en la regulación o localización de los “R-loops fisiológicos” a lo largo del gen pueden llevar a la acumulación aberrante de ellos, siendo un obstáculo para la progresión de la transcripción y suponiendo, por tanto, una importante fuente endógena de inestabilidad genómica asociada al estrés replicativo ¹⁸. Además, la formación de este híbrido de RNA:DNA deja la hebra no transcrita de DNA más expuesta, pudiendo ser susceptible al daño (Figura 2). Por último, este evento también puede ser un motivo de alteración en la expresión de genes esenciales, tales como genes supresores de tumores, oncogenes o genes implicados en la reparación del DNA.

Teniendo en cuenta el impacto que puede suponer la acumulación de los R-loops sobre la integridad del genoma, la célula ha desarrollado distintos mecanismos que regulan su formación tanto a nivel preventivo como resolutivo (Figura 3) ³⁸.

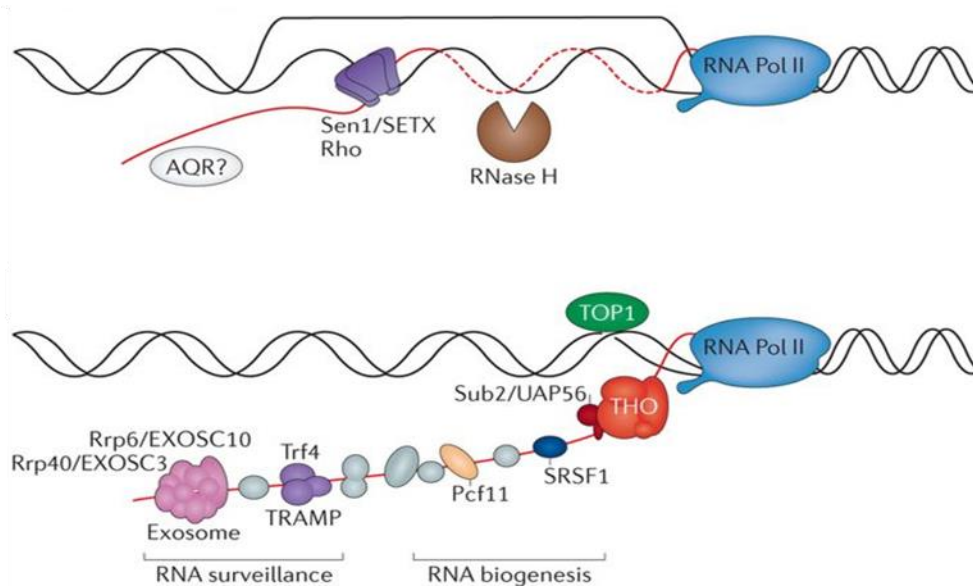


Figura 3. La unión co-transcripcional de proteínas implicadas en el metabolismo del RNA y la acción enzimática previene la acumulación de R-loops. Santos-Pereira JM & Aguilera A. (referencia 38).

En cuanto a la prevención de los R-loops, el estrés torsional generado en la hebra de DNA durante su duplicación y transcripción es resuelto por la acción de la DNA topoisomerasa I y II evitando así la acumulación de ellos (Figura 3) ²⁹. A su vez, existen mecanismos enzimáticos que aseguran la resolución efectiva de los híbridos RNA:DNA. En este contexto, las ribonucleasas (RNasas) H1 y H2 actúan como un sistema de vigilancia en la formación de los R-loops degradando específicamente la

hebra de RNA del híbrido para la recuperación de la estructura canónica de la doble cadena de DNA ³⁹. Recientemente, se ha demostrado que la proteína de unión al DNA de cadena sencilla RPA (*replication protein A*), además de proteger al DNA de la acción de las nucleasas y de reclutar a la maquinaria de reparación del DNA ⁴⁰, actúa como un sensor de los R-loops siendo fundamental para el reclutamiento de la RNasa H1 responsable de su resolución ⁴¹. De acuerdo con el papel de la RNasa H en la resolución de los R-loops, se ha observado que su sobreexpresión previene la acumulación de los R-loops generados por las alteraciones en múltiples factores que participan en la biogénesis del RNA (Figura 3) ⁴².

Así, entre los mecanismos implicados en la prevención de la formación de R-loops, la asociación co-transcripcional de ribonucleoproteínas mensajeras (*messenger ribonucleoprotein*, mRNPs) a la hebra de RNA sintetizada (Figura 3), previene la hibridación del RNA con la hebra complementaria de DNA ⁴³. Se ha observado que numerosos factores nucleares involucrados en el metabolismo del RNA, incluidos factores de *splicing* como la proteína rica en serina y arginina SRSF1, intervienen en la prevención de la acumulación de R-loops y, por consiguiente, en el mantenimiento de la estabilidad genómica ^{38,44,45}. En el apartado 1.3. se tratará más extensamente la repercusión de las alteraciones del *splicing* sobre la integridad genómica.

1.2. Inestabilidad cromosómica: causas y mecanismos de control

La inestabilidad cromosómica (CIN) es una forma de inestabilidad genómica que se produce durante el proceso de mitosis y que hace referencia a una condición de ganancia o pérdida de fragmentos o número de cromosomas (aneuploidía) ^{46,47}. La CIN puede actuar como un promotor de la iniciación y progresión tumoral. De hecho, más del 70% de los tumores sólidos presentan este tipo de alteraciones cromosómicas ⁴⁸. Se han descrito múltiples alteraciones que pueden conducir a una segregación aberrante durante la mitosis y, por tanto, a la inducción de CIN. Estos eventos incluyen alteraciones en el sistema de control del ensamblaje del huso acromático (*spindle assembly checkpoint*, SAC), en la cohesión entre las cromátidas hermanas (*sister chromatid cohesion*, SCC), en el dinamismo de los microtúbulos, en su unión a los cinetocoros y en la formación de los centrosomas ⁴⁹. Para evitar las aberraciones mitóticas que puedan repercutir en la fidelidad de la segregación cromosómica, la célula activa los sistemas de control que supervisan los eventos de cada fase de la mitosis antes de avanzar a la siguiente etapa ⁵⁰.

1.2.1. Sistema de control del ensamblaje del huso acromático (SAC)

La mitosis es la fase del ciclo celular en la cual se produce la división final de la célula dando lugar a dos células hijas dotadas del mismo material genético. Consta de cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. En la profase el DNA comienza a condensarse formando la estructura de cromosoma que en metafase será guiado hacia el centro de la célula por la acción de los microtúbulos del huso mitótico. En anafase, las cromátidas hermanas de cada cromosoma son separadas a los polos celulares opuestos dando paso a la división final de la célula en telofase.

El SAC es un sistema de supervisión del estado de la cohesión entre los microtúbulos del huso mitótico y los cinetocoros de los cromosomas durante la metafase. La asociación estable entre ambos crea la tensión adecuada permitiendo a los microtúbulos ejercer la fuerza conveniente para facilitar la separación de las cromátidas hermanas a cada polo celular y garantizar la segregación correcta del material genético a las células hijas durante la anafase y telofase ⁵⁰.

Este punto de control requiere de la participación coordinada de un complejo de proteínas (*mitotic checkpoint complex*, MCC) compuesto por las proteínas MAD1, MAD2 y MAD3/BUBR1 (*mitotic arrest deficient*, MAD), las proteínas BUB1 y BUB3 (*budding uninhibited by benzimidazole*, BUB) y otras proteínas reguladoras como CDC20 y la proteína quinasa MPS1 ⁵¹. La falta de cohesión en alguno de los cinetocoros o la unión de ambos husos acromáticos a un mismo cinetocoro es suficiente para la asociación y activación de este complejo, que evita la transición de metafase a anafase hasta que todos los cinetocoros estén correctamente cohesionados ⁵². En un primer paso, el complejo MAD1-MAD2 se une al cinetocoro facilitando la interacción de CDC20, un cofactor del complejo APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), con MAD2. Esta interacción genera un cambio conformacional en MAD2 promoviendo la formación del complejo MAD2-CDC20-MAD3-BUB3 que, finalmente, inhibe al complejo de la ubiquitina-ligasa APC/C resultando en la parada del ciclo celular hasta la restauración de la cohesión (Figura 4A) ⁵³.

Las alteraciones en la expresión génica de alguno de los participantes de esta vía pueden repercutir en la actividad del SAC llevando a su hiperactivación o su hipoactivación. Como consecuencia, se favorece el asentamiento de inestabilidad cromosómica por el reparto desequilibrado de las cromátidas hermanas entre las células hijas o por una parada prolongada en el ciclo celular ^{54,55}. No obstante, la inhibición completa de este punto de control conlleva a una excesiva inestabilidad cromosómica que resulta letal tanto para las células normales como para las transformadas, representando una diana terapéutica en el cáncer ^{56,57}.

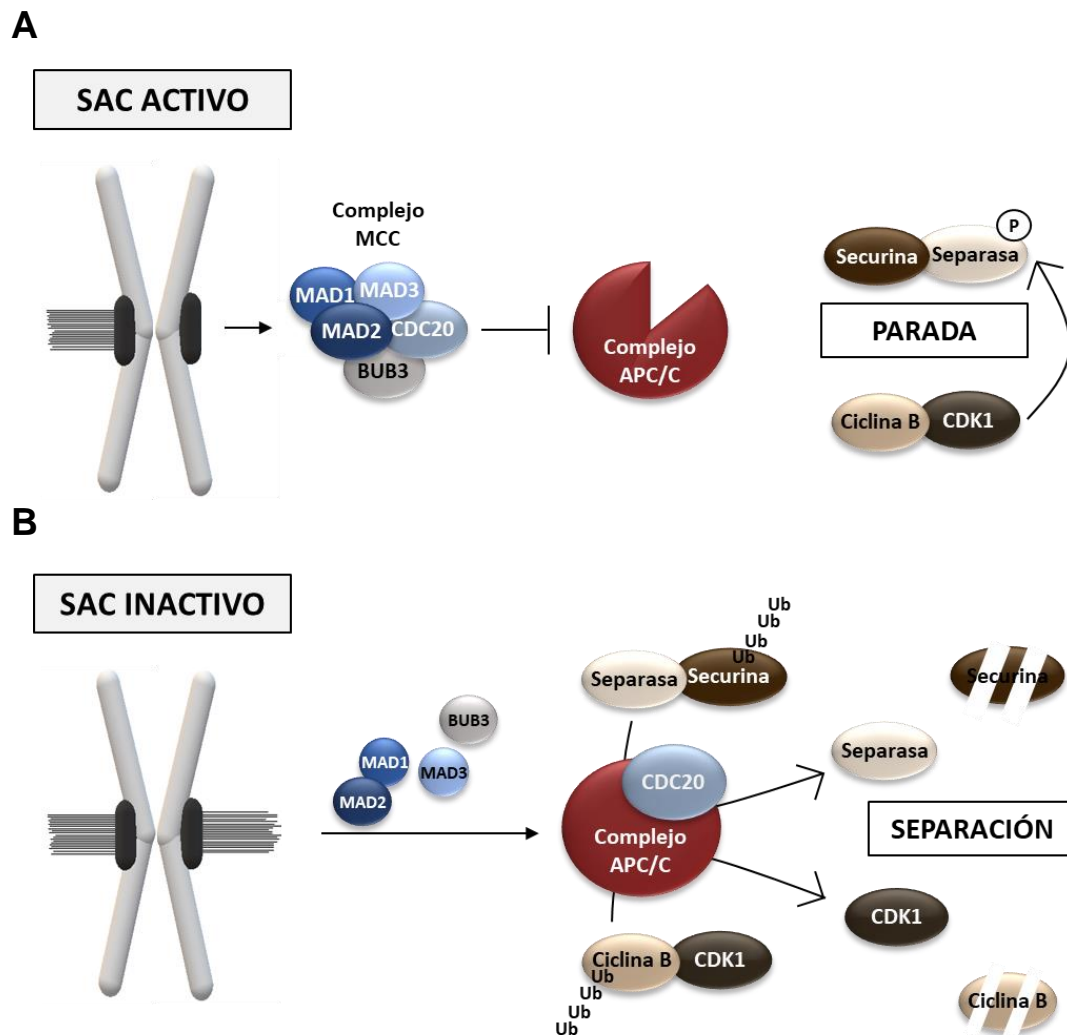


Figura 4. Mecanismo de acción del sistema de control del ensamblaje del huso acromático (SAC). (A) La pérdida de polaridad de los microtúbulos lleva a la formación y activación del complejo de control mitótico (MCC) que inhibe la actividad ubiquitina-ligasa del complejo APC/C. La cohesión entre las cromátidas hermanas es mantenida por la fosforilación de la separasa por CDK1 y la unión de esta proteína con la chaperona securina. (B) La correcta unión de los microtúbulos al cinetocoro lleva a la activación del complejo APC/C encargado de ubiquitinar y degradar a securina y a ciclina B. La liberación de las proteínas separasa y CDK1 da lugar a la separación de las cromátidas hermanas y a la salida de mitosis. Adaptado de Barbosa J. (referencia 58)

1.2.2. Cohesión entre las cromátidas hermanas

El establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas (SCC) es esencial para que se pueda producir la asociación correcta del huso acromático a los cinetocoros, y se genere la tensión adecuada a lo largo de los microtúbulos que permita la separación correcta de las cromátidas a cada célula hija durante la anafase ⁵⁹.

La cohesión la establecen múltiples proteínas que se agrupan escalonadamente para formar una estructura de anillo alrededor de las cromátidas hermanas denominada cohesina. Este complejo está compuesto por un heterodímero (SMC1-SMC3) de la familia SMC (*structural maintenance of chromosome*) que se asocia con la proteína RAD21, la cual a su vez interacciona con las proteínas SA1 y SA2 ⁶⁰. La asociación del complejo de cohesión con la cromatina es regulada a lo largo del ciclo celular, y está altamente controlada por una serie de proteínas que monitorizan en cada etapa de la mitosis su estado para evitar así la propagación de errores entre generaciones celulares ⁶¹.

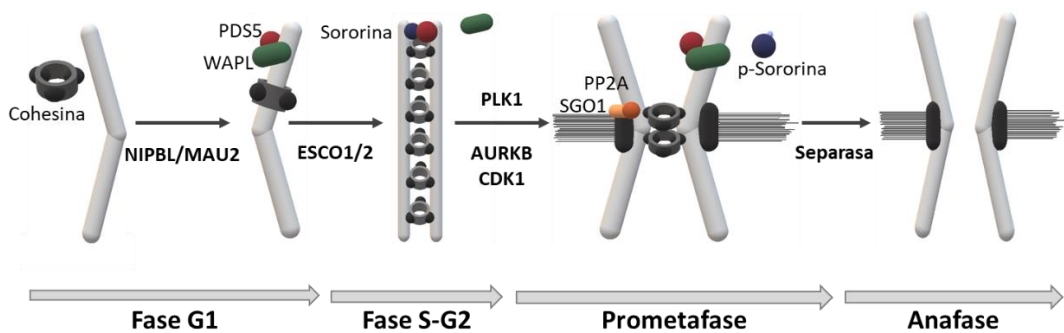


Figura 5. Regulación de la cohesión a lo largo del ciclo celular. En la fase G1, NIPBL/MAU2 promueven el acercamiento del complejo de cohesión a la cromatina. En la fase S, el complejo de cohesión rodea las dos cromátidas hermanas para establecer la unión entre ellas. La proteína sororina impide la acción de la proteína de disociación WAPL mediante la unión a PDS5. En prometafase, la fosforilación de SA2 (miembro del complejo de cohesinas) por PLK1 y la de sororina por AURKB y CDK1 lleva a la disociación de la cohesión en los brazos cromosómicos por la acción de WAPL. La cohesión en el centrómero está protegida por la proteína shugoshina (SGO1) y PP2A. En anafase, la liberación de separasa lleva a la segregación de los cromosomas. Adaptado de Singh VP et al. (referencia 62).

En la fase G1 del ciclo celular (Figura 5), las cohesinas se asocian por primera vez a la cromatina, este acercamiento está regulado por la presencia del heterodímero NIPBL-MAU2 y requiere de la hidrólisis de ATP ⁶³. En la fase S, tras la duplicación del DNA, las cohesinas rodean las dos cromátidas hermanas para establecer la cohesión entre ellas. En vertebrados, en este proceso es fundamental la acción de la proteína sororina, cuyo reclutamiento depende de la replicación del DNA en la fase S y de la acetilación de SMC3 por las proteínas acetil-transferasas ESCO1 y ESCO2 ⁶⁴. Sororina es una proteína que presenta una región C-terminal altamente conservada entre especies, la cual es imprescindible para establecer la SCC ⁶⁵, ya que le permite interactuar con las principales subunidades del complejo de cohesión (RAD21, SMC1, SMC3 y SA1/2) y con las proteínas asociadas a él (PDS5 y WAPL) ^{65,66}. Se ha

observado que la función principal de sororina es antagonizar a la proteína WAPL (*wings apart-like protein homolog*), proteína encargada de la disociación del complejo de las cohesinas de los brazos cromosómicos en prometafase (Figura 6) ⁶⁷. La unión de sororina a PDS5 genera un cambio conformacional en el complejo PDS5/WAPL, de forma que se pierde la interacción entre ambas proteínas y se impide la acción de disociación de la cohesión mediada por WAPL. De esta manera, el complejo de cohesión queda estabilizado en las cromátidas favoreciendo la unión entre las dos cromátidas hermanas ⁶⁷.

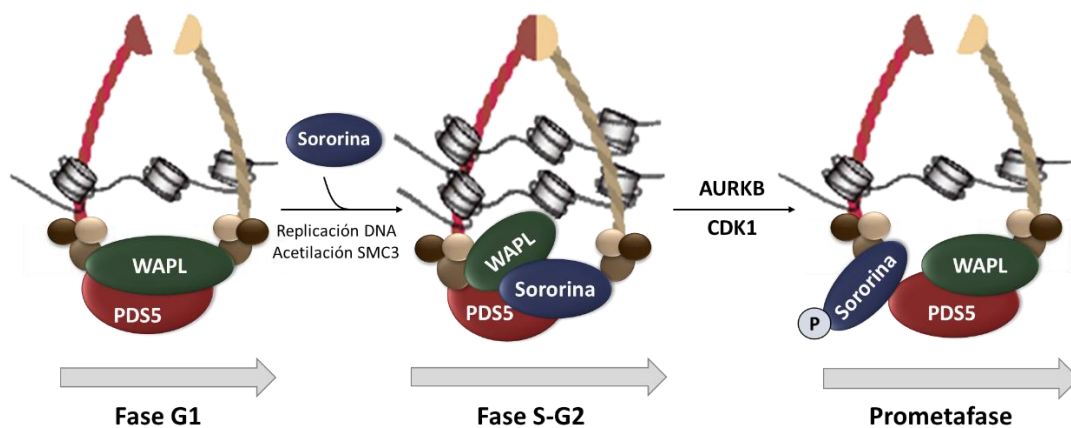


Figura 6. Sororina antagoniza la función de disociación de la proteína WAPL. En la fase G1, la interacción de WAPL con PDS5 evita la cohesión entre las cromátidas. La replicación del DNA y la acetilación de SMC3 (componente del complejo de cohesión) favorecen el reclutamiento de sororina a las cromátidas que interacciona con PDS5 reemplazando a WAPL del complejo. Sororina antagoniza la acción de disociación de WAPL facilitando la cohesión entre las cromátidas hermanas. En prometafase, la fosforilación de sororina por AURKB y CDK1 lleva a su disociación de PDS5 facilitando la interacción de esta proteína con WAPL. WAPL promueve la separación de la cohesión en los brazos cromosómicos. Adaptación de Nishiyama T et al. (referencia 67).

La separación de las cromátidas hermanas supone la disociación secuencial y regulada del complejo de cohesión a lo largo del cromosoma. Ocurre en dos etapas (Figura 5): primero, se libera la unión en la región de los brazos cromosómicos adquiriendo los cromosomas la morfología típica en X y, posteriormente, se elimina la unión en la región del cinetocoro conduciendo a la segregación final de las cromátidas ⁶⁸. Así, durante la profase, se produce la separación a lo largo de los brazos cromosómicos mientras que la cohesión centromérica persiste hasta la transición de metafase a anafase. Esta primera disociación de las cohesinas está mediada por la fosforilación de SA2 por la quinasa PLK1 (*polo-like kinase 1*) ⁶⁹ y, a su vez, por la fosforilación de la proteína sororina mediada por las quinasas Aurora quinasa B (*Aurora kinase B*, AURKB) y CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*). Esta

modificación en sororina genera un cambio conformacional en ella, que resulta en la liberación de la proteína PDS5^{69,70} y en el reclutamiento de la proteína WAPL a la zona de los brazos cromosómicos, de tal forma que promueve la apertura del anillo de cohesinas exclusivamente en esta región del DNA (Figura 6)⁶⁷.

En esta fase, la región centromérica queda protegida por la localización en esta zona de una proteína denominada shugoshina (SGO1) (Figura 5), que junto con la fosfatasa PP2A contrarrestan la acción de PLK1 impidiendo la fosforilación de SA2 y de sororina^{71,72}.

Como se ha señalado más arriba, durante la metafase la proteína MAD2 inhibe la actividad ubiquitina-ligasa del complejo APC/C evitando así la degradación de securina (Figura 4A). Esta proteína mantiene inactiva la proteasa separasa, una proteína responsable de la degradación del complejo de la cohesina y, por tanto, de la separación de las cromátidas. Además de esta unión con la chaperona inhibitoria securina, la fosforilación por CDK1 mantiene a separasa inactiva hasta que la correcta alineación y unión del huso mitótico a los cromosomas haya sido comprobada (Figura 4A)⁷³.

Una vez que los cromosomas están correctamente alineados en la placa metafásica y siempre que todos ellos presenten una cohesión bipolar del huso mitótico, el complejo APC/C activo promueve la separación de las cromátidas y la transición de metafase a anafase (Figura 4B). La liberación de la cohesión en la región del cinetocoro está mediada por la degradación de ciclina B (subunidad de CDK1) y de securina (chaperona inhibitoria de separasa) por el complejo APC/C. Esto supone la liberación de la proteína separasa, la subsiguiente eliminación del complejo de cohesión, la disociación de las cromátidas hermanas y, finalmente, la salida de la mitosis⁷⁴.

Dada la complejidad de estos mecanismos, el control de la expresión de los componentes que cooperan en la asociación de las cromátidas hermanas es imprescindible para asegurar la correcta transmisión del material genético y el mantenimiento de la euploidía celular⁷⁵.

1.3. *Splicing* alternativo e inestabilidad genómica

Las modificaciones epigenéticas, los cambios en la expresión de factores de transcripción y la regulación del procesamiento del mRNA son fundamentales para la programación del genoma atendiendo a las necesidades de cada tipo celular en cada momento⁷⁶. Así pues, las alteraciones en el proceso de *splicing* ya sea por mutaciones en las secuencias reguladoras del pre-mRNA (*precursor mRNA*),

mutaciones en los componentes del espliceosoma o modificaciones en la proporción de los factores reguladores pueden contribuir al desarrollo de distintas patologías incluyendo el cáncer ⁷⁷⁻⁷⁹. Esto es debido a la generación de nuevas variantes de transcritos de mRNA sin sentido o que pueden codificar para variantes proteicas con funciones distintas o incluso opuestas y/o diferente localización con respecto a las proteínas biológicas. Estos cambios en el patrón de expresión proteica pueden conferir a la célula tumoral algunas de las características apropiadas y necesarias para el mantenimiento de la proliferación, la invasión y la resistencia a la muerte ⁸⁰.

Es importante resaltar que trabajos recientes han demostrado que la maquinaria de *splicing* puede, además, participar en el mantenimiento de la estabilidad genómica por mecanismos independientes de la regulación de eventos de *splicing*, lo cual incluye la prevención de la formación de R-loops, tal y como se tratará más adelante ⁸⁰⁻⁸².

1.3.1. Proceso de *splicing* constitutivo y alternativo

En las células eucariotas el proceso de *splicing* ocurre de forma coordinada con la transcripción y permite la identificación y eliminación de los intrones del pre-mRNA, y la consiguiente ligación de los exones para la formación del mRNA maduro ⁸³. Este proceso depende de la asociación coordinada en el pre-mRNA de distintas ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (*small nuclear ribonucleoproteins*, snRNPs U1, U2 y tri-snRNP U4-U5-U6) y distintos factores auxiliares para la formación de un complejo macromolecular activo denominado espliceosoma (Figura 7) ⁸⁴. El ensamblaje o disociación de las proteínas participantes en este complejo está altamente regulado para la formación del complejo del espliceosoma específico en cada paso del *splicing* ⁸⁵.

La escisión de los intrones, y posterior ligación de los exones está orquestada por secuencias consenso en el DNA presentes en las uniones exón/intrón denominadas sitios de *splicing* (Figura 7). El espliceosoma reconoce en los límites de los intrones las secuencias 5' donadoras, que comienzan con un dinucleótido GU, y las secuencias 3' aceptoras, que acaban en el dinucleótido AG. Tras el reconocimiento, el proceso enzimático consiste en dos reacciones consecutivas de transesterificación. La primera reacción está regulada por la proteína U1 snRNP y la segunda por la proteína U2 snRNP y el factor auxiliar U2AF. La posterior interacción de las proteínas U4, U6 y U5 snRNP promueve la formación del sitio catalítico resultando en la ligación de los exones y la escisión del intrón ⁸⁶. La proteína SLU7 (*synergistic lethal with U5 snRNA*), de la cual trataremos más en detalle en el

apartado 3, es uno de los componentes del complejo del espliceosoma que participa en la correcta selección del sitio 3' de *splicing*^{84,87-89}.

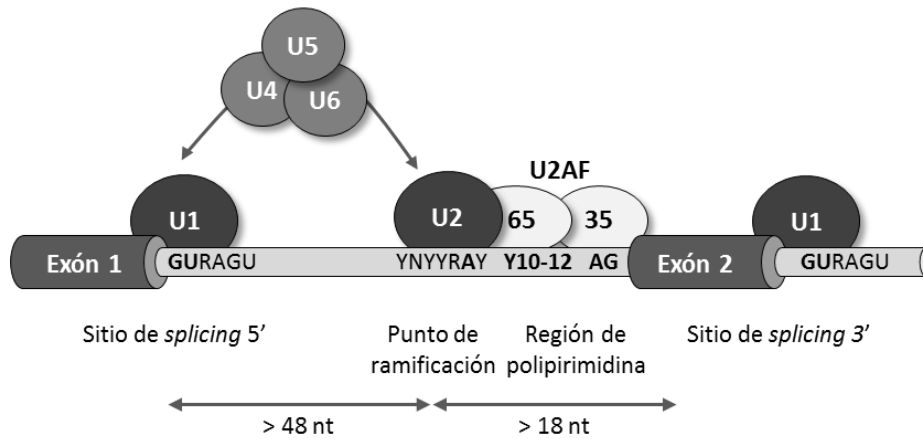


Figura 7. Esquema de los sitios donadores y aceptores, y la interacción de los snRNPs durante el *splicing*. Adaptación de Berasain C et al. (referencia 90).

La selección alternativa del sitio de *splicing* genera cambios en la secuencia codificante del mensajero dando lugar a una gran diversidad de isoformas proteicas⁹¹. El *splicing* alternativo afecta al 95% de los genes de mamífero, permitiendo la generación de múltiples variantes de mRNA a partir de un mismo gen. Esta diversidad de transcritos se genera mediante mecanismos que incluyen la incorporación de exones alternativos, la selección de sitios 5' y 3' de *splicing* débiles o la incorporación de intrones^{83,90}. Las diferencias en la secuencia peptídica de las proteínas generadas les confiere especificidad funcional mediante la interacción con distintas proteínas y ácidos nucleicos, la diferencia en la localización celular o los cambios en sus propiedades biológicas. Por todo ello, el correcto funcionamiento de la maquinaria de *splicing* es fundamental para determinar la identidad y funcionalidad de cada célula⁹², de hecho, las alteraciones en esta maquinaria están en el origen de diferentes enfermedades incluida el cáncer^{77,90}.

La especificidad del *splicing* depende de la presencia de secuencias reguladoras del pre-mRNA activadoras o represoras y de su reconocimiento por las correspondientes proteínas de unión al RNA (*RNA-binding protein*, RBP) (Figura 8). Existen dos familias de RBP importantes, las proteínas SR (proteínas ricas en serina y arginina), que por lo general se unen a las secuencias potenciadoras, y las proteínas hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*), que reconocen principalmente los elementos represores. La colaboración entre ellas guía la

asociación o disociación del complejo del espliceosoma a sitios concretos de *splicing*^{83,92}. Dentro de las secuencias reguladoras, se han definido cuatro tipos de elementos: los exónicos activadores (*exonic splicing enhancer*, ESE) o silenciadores (*exonic splicing silencer*, ESS) del *splicing* y los intrónicos activadores (*intronic splicing enhancer*, ISE) o silenciadores (*intronic splicing silencer*, ISS) del *splicing* (Figura 8)⁹².

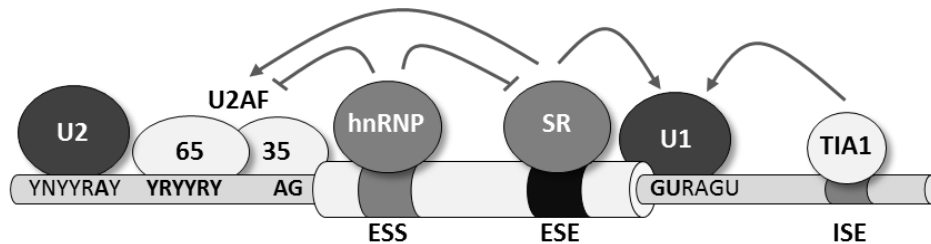


Figura 8. Esquema de las interacciones de las proteínas reguladoras del *splicing* con secuencias activadoras o inhibidoras. Adaptación de Berasain C et al. (referencia 90).

Las proteínas ricas en serina y arginina (SR) constituyen una familia de proteínas de unión al RNA de gran relevancia en el metabolismo del mRNA⁹³. Estas proteínas participan tanto en el proceso de *splicing* constitutivo como en el alternativo, además de en el transporte del mRNA al citoplasma y en la regulación de la traducción de estos mensajeros a proteína^{94,95}. En humanos, se ha creado una nomenclatura consenso basándose en la raíz “SRSF” (*SR splicing factor*) seguido de un número que refleja el orden cronológico de su descubrimiento. En concreto, esta familia está compuesta por doce miembros (SRSF1-12) que se caracterizan por compartir una estructura común: uno o dos motivos de reconocimiento de RNA (*RNA recognition motif*, RRM) en la región amino-terminal y otro dominio rico en serinas y argininas denominado dominio SR en la región carboxi-terminal, este último permite la interacción con otras proteínas^{95,96}. La fosforilación en residuos concretos del dominio SR modula la funcionalidad de estas proteínas en las distintas etapas del procesamiento del RNA. En concreto, regula la especificidad de unión al RNA, las interacciones proteína-proteína, el proceso de *splicing*, su localización (nuclear o citoplasmática), además de regular su propia expresión⁹³.

Las proteínas SR son importantes reguladores del *splicing* alternativo, ya que pueden inducir la inclusión de exones alternativos acercando la maquinaria del espliceosoma a sitios débiles de *splicing*⁹⁵. Sus niveles de expresión y la cantidad relativa de cada una de ellas están finamente regulados, así, se han descrito tanto

mecanismos de auto-regulación como de regulación mutua. Estos mecanismos incluyen la incorporación de exones veneno que contienen codones de terminación prematuro (*premature termination codon*, PTC) y activan la maquinaria de degradación de los mRNA sin sentido (*non-sense mediated mRNA decay*, NMD). Todas ellas presentan *splicing* alternativo de sus transcritos y hacen uso de este mecanismo para el control de la producción de sus proteínas⁹⁷⁻¹⁰⁰. Por ejemplo, los niveles elevados de SRSF3 (SRp20) influyen sobre la expresión de SRSF1, SRSF2, SRSF5, SRSF7 o, incluso, sobre su propia expresión promoviendo la incorporación de un PTC en sus transcritos^{97,98}. SRSF2 (SC35) también regula el *splicing* de su transcrito mediante la incorporación de un exón y la eliminación de un intrón en el extremo 3'UTR (*3' untranslated region*)¹⁰⁰.

No obstante, la regulación del *splicing* alternativo es un proceso de mayor complejidad y no sólo está determinado por la acción combinada de factores de *splicing* y la presencia de las secuencias reguladoras. Así, la concentración de estos factores reguladores de *splicing* o su estado de fosforilación, que a su vez condiciona su localización intracelular, su actividad o las interacciones con otras proteínas, son mecanismos adicionales que regulan el *splicing*¹⁰¹. Además, la maquinaria de transcripción¹⁰², la estructura de la cromatina y las modificaciones en las histonas¹⁰³ pueden colaborar promoviendo el reclutamiento de distintos componentes del espliceosoma¹⁰⁴.

1.3.2. *Splicing* alternativo y daño en el DNA

Teniendo en cuenta que el 95% de los genes humanos sufren *splicing*, es fácil extrapolar que la mayoría de los genes que intervienen en la respuesta de reparación del DNA sufren *splicing*, por lo que ante un *splicing* aberrante de dichos genes el proceso de reparación del DNA puede verse impedido¹⁰⁵.

Paulsen y colaboradores, en un estudio con siRNAs (*small interfering RNAs*) que cubren todo el genoma, identificaron componentes de la maquinaria del procesamiento del RNA como la red de interacción molecular más significativamente enriquecida en el mantenimiento de la estabilidad genómica¹⁰⁶. Estos autores muestran que el silenciamiento de genes que codifican proteínas integrantes del espliceosoma, o que participan en la supervisión o transporte del mRNA, induce niveles elevados de γ -H2AX, un marcador del daño en el DNA¹⁰⁶. Además, las proteínas procesadoras del RNA son fundamentales para la reprogramación del transcriptoma en respuesta a estrés genotóxico garantizando la eficacia en la detección, señalización y reparación del daño en el DNA^{107,108}.

Además, tal y como se ha mencionado, la maquinaria del procesamiento del RNA puede controlar estos procesos de forma independiente a la regulación de eventos de *splicing*. Como se verá a continuación, estos factores impiden la formación de estructuras aberrantes RNA:DNA y la inducción de TAGIN. Recientemente, también se ha demostrado que los factores de *splicing* desempeñan un papel directo en la detección, señalización y reparación del daño en el DNA ¹⁰⁹. Este es el caso de varias hnRNPs y SRSFs o, más concretamente, del factor de *splicing* PRP19 ¹⁰⁹. PRP19 actúa como un sensor del daño en el DNA durante la transcripción interaccionando directamente con la proteína RPA y con la hebra monocatenaria de DNA para la activación de la respuesta reparadora por la vía de ATR quinasa ¹¹⁰.

Por tanto, queda patente el importante papel de la maquinaria del procesamiento del RNA en el mantenimiento de la integridad genómica, no sólo asegurando la correcta expresión de genes esenciales en la respuesta al daño, sino también actuando de forma directa en la prevención, detección y mediación de la reparación de la lesión.

1.3.2.1. Proteínas SR y TAGIN asociado a la formación de R-loops

Li y Manley demostraron que SRSF1 (ASF/SF2) tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genética evitando la acumulación de alteraciones durante la transcripción y previniendo la formación de los R-loops que puedan derivar en TAGIN (Figura 3) ¹¹¹. Estas mismas funciones también son atribuibles a otros dos miembros de la familia de proteínas SR como SRSF3 y SRSF2 ¹¹¹.

SRSF1 fue el primer miembro de la familia de proteínas SR identificado. Esta proteína participa en la selección del sitio de *splicing* y media en la regulación de otros procesos como en el mecanismo de degradación del mRNA sin sentido (NMD) ¹¹², el transporte del mRNA al citoplasma ¹¹³ y la síntesis de proteínas ¹¹⁴.

SRSF1 también presenta una regulación negativa sobre su expresión, de manera que en presencia de niveles altos se induce el *splicing* alternativo de sus propios transcritos dianas del mecanismo NMD, disminuyendo la expresión de la isoforma codificante de la proteína funcional ⁹⁸. Se han identificado seis isoformas de SRSF1 (1-6) (Figura 9) siendo la primera de ellas la que codifica para la proteína funcional ⁹⁹. En cuanto a la estructura de las distintas isoformas, la isoforma 1 (Var 1) dispone de una región 3'UTR larga, la isoforma 2 (Var 2) incorpora el intrón 3 y la isoforma 3 (Var 3) presenta un sitio de *splicing* alternativo en este mismo intrón. La retención del intrón 3 genera un transcrito con un PTC que puede codificar para una proteína deficiente en el dominio SR. Sin embargo, la gran mayoría de estos transcritos quedan retenidos en el núcleo sin poder ser traducidos

a proteína. Las isoformas 4, 5 y 6 (Var 4-6) se generan a partir del *splicing* de uno (Var 4) o dos (Var 5 y 6) intrones en la región 3'UTR. Estas dos últimas isoformas se exportan al citoplasma siendo dianas de NMD ⁹⁹.

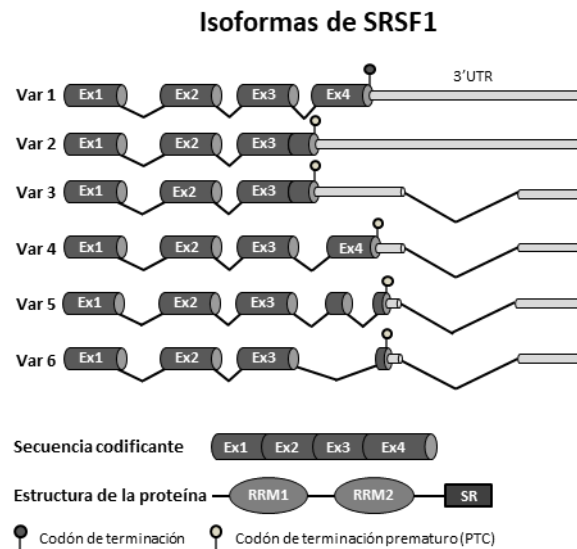


Figura 9. Isoformas de SRSF1 sintetizadas a partir de su gen y la estructura de la proteína funcional. Las isoformas de *splicing* de SRSF1 (Var 1-6) varían en la región del exón 4 y 3'UTR procesada llevando a la generación de mensajeros sin sentido que son eliminados por la maquinaria NMD. Secuencia codificante de la Var 1 y estructura de la proteína sintetizada a partir de este mensajero. Motivos de reconocimiento de RNA (RRM) y motivo rico en serina/arginina (SR).

En la actualidad, además de SRSF1, SRSF2 y SRSF3, se han identificado otras proteínas que participan en el procesamiento del RNA y al asociarse a la hebra de RNA contribuyen en la prevención de la formación de los R-loops y la acumulación de daño en el DNA (Figura 3) ¹⁰⁶. Por ejemplo, es el caso de la proteína NRL1 ¹¹⁵ o del complejo proteico THO/TREX (*transcription-export complex*) ¹¹⁶.

1.3.3. *Splicing* alternativo e inestabilidad cromosómica

En los últimos años, varios estudios han demostrado la implicación de distintos factores de *splicing* en el mantenimiento de la estabilidad genómica, previniendo la inestabilidad cromosómica (CIN) asociada al asentamiento de errores mitóticos. Como se ha explicado anteriormente, muchas proteínas son necesarias para una correcta progresión del ciclo celular, incluyendo la mitosis. Todo ello implica que un amplio repertorio de eventos de *splicing* se produce de manera periódica durante todo este proceso ¹¹⁷. Así, el silenciamiento de estos factores de *splicing* puede repercutir de manera significativa en la polaridad de los microtúbulos, en la

capacidad de los cromosomas para alinearse en la placa metafásica o en la cohesión entre las cromátidas hermanas ^{118–127}.

En este sentido, el gen *CDCA5* que codifica para sororina, una proteína que como se ha indicado juega un papel fundamental en la cohesión de las cromátidas hermanas, parece especialmente sensible a las alteraciones en la expresión de distintos componentes de la maquinaria de *splicing* ¹²⁸. Es el caso del complejo de PRP19 ^{123,124}, UBL5 (*ubiquitin-like protein 5*) ¹²⁵ o SNW1 (*SNW domain-containing protein 1*) ¹²⁶ cuyo silenciamiento se ha demostrado que compromete el *splicing* de *CDCA5*. Estas inhibiciones resultan en la retención del intrón 1 o de los intrones 1 y 2 en su mRNA dando lugar a un cambio en el marco de lectura, que genera un PTC en el exón 3 o en el intrón 2 en el caso en el que el intrón 2 no se haya eliminado (Figura 10). Como consecuencia, se observa una reducción significativa en los niveles de la proteína sororina ¹²³. De acuerdo con el papel de sororina, el silenciamiento de estos factores de *splicing* resulta en alteraciones en la cohesión de las cromátidas hermanas.

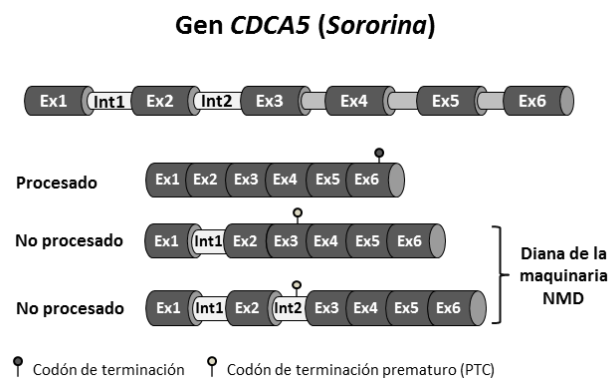


Figura 10. Gen de sororina y sus transcritos. Se presenta, por un lado, la isoforma procesada de sororina que codifica para la proteína funcional. Por otro lado, se muestra los transcritos resultantes de la retención del intrón 1 que incorpora un PTC exón3 o de la retención del intrón 1 y 2 que incorpora un PTC en el propio intrón 2. Estas isoformas aberrantes serán reconocidas por la maquinaria NMD para su degradación.

Aunque los factores de *splicing* implicados no han sido identificados, alteraciones en el *splicing* de otras proteínas que participan en la cohesión entre las cromátidas hermanas, como SGO1, MAD1 y AURKB podrían estar también relacionadas con el proceso de hepatocarcinogénesis y el desarrollo de hepatocarcinoma (HCC), tal y como se tratará en el apartado 2.2.

2. EL PROCESO DE HEPATOCARCINOGENÉISIS

El hepatocarcinoma (HCC) es uno de los cánceres con mayor tasa de incidencia en la población mundial y representa la segunda causa de muerte por cáncer (9.1%)¹²⁹ con alrededor de 800.000 nuevos casos al año en el mundo¹³⁰. El HCC representa el tumor hepático primario de mayor prevalencia (75-90%) seguido del colangiocarcinoma (10%), originado en las células epiteliales del conducto biliar^{129,131}.

La complejidad molecular que caracteriza al HCC además de su detección en estadios avanzados limita las opciones terapéuticas. Los pacientes en etapas tempranas y/o intermedias pueden beneficiarse de la resección quirúrgica, el trasplante, la ablación o la radio- o quimio-embolización. Sin embargo, todavía hay un grave problema debido a la elevada tasa de recurrencia¹³². Hasta el año 2016, el único tratamiento sistémico aprobado para pacientes con tumores avanzados era el inhibidor de quinasas sorafenib, cuya eficacia es muy limitada, ya que solamente aumenta 3 meses la vida media de los pacientes¹³³. En la actualidad, han sido aprobadas nuevas moléculas como el inhibidor de quinasas regorafenib y el anticuerpo inmunomodulador nivolumab como estrategias en segunda línea, pero sus resultados nuevamente son poco satisfactorios¹³³.

Por todo ello, es urgente ampliar el conocimiento de las bases moleculares del HCC y de las alteraciones que contribuyen a su desarrollo para poder así desarrollar nuevos tratamientos más eficaces, e identificar marcadores tanto de diagnóstico como de respuesta a tratamiento.

La mayor parte de los HCC se desarrollan en hígados cirróticos, en un contexto de daño hepático e inflamación crónicos causados por varios factores etiológicos incluyendo las infecciones crónicas del virus de la hepatitis B o el virus de la hepatitis C, la ingesta de alimentos con contaminantes hepatotóxicos (Aflatoxina B1), el consumo crónico de alcohol, el hígado graso no alcohólico asociado a la obesidad y la diabetes, y enfermedades genéticas menos frecuentes como la deficiencia en α 1-antitripsina o la hemocromatosis¹³⁴⁻¹³⁸. Cabe destacar, que recientemente la integración del virus adenoasociado 2 (AAV2) y el hígado graso no alcohólico también han sido considerados factores de riesgo para el desarrollo de HCC en ausencia de cirrosis^{139,140}.

Como ya se ha mencionado, independientemente del agente causal, el HCC es un tipo de cáncer que presenta una enorme heterogeneidad a nivel molecular. Modificaciones genéticas que incluyen mutaciones puntuales, aneuploidías y reordenamientos cromosómicos, junto con cambios epigenéticos son responsables

de la inducción de alteraciones en los patrones de expresión génica y del *splicing*, dando lugar a la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes ¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

En cuanto a la fisiopatología, el proceso de hepatocarcinogénesis en los hígados crónicamente dañados se asocia a la muerte de los hepatocitos inducida por los agentes etiológicos, y a la consiguiente respuesta inflamatoria y reparadora. Esta respuesta incluye tanto la deposición de matriz extracelular por el componente celular no parenquimal, como la regeneración de los hepatocitos con el objeto de restaurar el parénquima perdido y de preservar la viabilidad y funcionalidad del órgano, lo cual conlleva el desarrollo de la cirrosis ^{137,145-148}. En este ambiente de inflamación crónica, de estrés oxidativo y de ciclos recurrentes de muerte y regeneración de los hepatocitos, se promueve la des-diferenciación celular, la inestabilidad genómica y el asentamiento de alteraciones genéticas, contribuyendo todo ello a la pérdida de la función del órgano y a la transformación maligna de los hepatocitos. Así, la cirrosis es considerada un estadio pre-neoplásico en el que la inestabilidad genómica se ve favorecida por la acumulación de daño en el DNA ^{10,134,149-151}.

En los últimos años, se han realizado numerosos esfuerzos utilizando técnicas de análisis masivo de cromosomas y de secuenciación para delinear el mapa de alteraciones genéticas y epigenéticas del HCC ^{138,142,143,152}. Los resultados muestran que existen pocas alteraciones con alta prevalencia en este tipo de tumor. Dentro de ellas, cabe destacar las mutaciones activadoras de la telomerasa y de la vía WNT- β -catenina o las mutaciones inactivadoras de p53 ¹⁴³. Entorno al 60% de los HCC presentan una inducción de la telomerasa asociada a mutaciones o inserciones del virus de la hepatitis B en su promotor o a amplificaciones del gen ^{153,154}. Entre el 12 y el 48% de los pacientes con HCC presentan mutaciones con pérdida de función en el gen de *p53* ¹⁵⁵, y alrededor del 28% presentan una mutación en el gen *CTNNB1* que da lugar a una β -catenina de mayor estabilidad ^{156,157}. Además, han sido descritas mutaciones en otros componentes de la vía de señalización WNT- β -catenina conduciendo todas ellas a la activación constitutiva de la cascada de señalización ¹⁵⁶. También se han establecido diferentes clasificaciones moleculares intentando relacionar las alteraciones en la expresión génica, las modificaciones epigenéticas y/o las alteraciones cromosómicas con el fenotipo, las características clínicas, el pronóstico y la respuesta al tratamiento de los pacientes con HCC ^{138,143,152,158}.

2.1. Regulación de factores de *splicing* y hepatocarcinogénesis

En los últimos años, la identificación de mutaciones o de cambios en el patrón de expresión o de localización de varios factores reguladores del *splicing* evidencian su contribución a la alteración del transcriptoma del hígado adulto y a la evolución de la hepatocarcinogénesis ^{159–161}, pudiendo considerarse la alteración en el *splicing* como un nuevo evento implicado en el desarrollo del HCC ^{120,162}.

Entre las alteraciones en los factores reguladores del *splicing* detectadas hasta la fecha, destaca la desregulación de las proteínas hnRNPs. En concreto, las proteínas hnRNPH, hnRNPA2/B1 y hnPNPA1 se han encontrado sobreexpresadas correlacionándose la inducción de esta última con un fenotipo invasivo y de mal pronóstico ^{163,164}. Cabe resaltar que en la hepatitis viral mayormente causada por el virus de la hepatitis B también se observa una inducción de las proteínas hnRNPA2/B1, pero con distinta localización celular ¹⁶⁵. En la hepatitis viral ambas proteínas se localizan exclusivamente en el núcleo, mientras que en el HCC predomina su localización citoplasmática, pudiendo contribuir esta translocación de hnRNPA2/B1 al estado de dediferenciación característico de estas etapas ¹⁶⁵. Finalmente, se ha demostrado que el patrón de expresión de hnRNPA2/B1 correlaciona con la supervivencia de los pacientes con HCC, observándose una reducción en la supervivencia al aumentar su expresión ¹⁶⁰.

La información disponible sobre la expresión de las proteínas SR en la patología hepática es más limitada. Se ha observado que los niveles de expresión de SRSF1 se encuentran inducidos, mientras que los niveles proteicos de SRSF3 son prácticamente indetectables en pacientes con HCC ^{162,163}. De hecho, esta pérdida de la expresión de SRSF3 en los hepatocitos de ratón compromete su fenotipo maduro y diferenciado, favoreciendo el desarrollo de HCC ^{166,167}. En relación con su localización, se ha observado que SRSF3 puede quedar retenido en el citoplasma por su interacción con la proteína del virus de la hepatitis B (*hepatitis B viral protein*, HBx). Esta deslocalización de SRSF3 se ha correlacionado con un mal pronóstico de los pacientes con HCC ¹⁶⁸. SRSF2 es otro miembro de la familia de las proteínas SR que se encuentra frecuentemente mutado en el HCC y que contribuye a la generación de proteínas pro-tumorigénicas por eventos de *splicing* asociados al cáncer ¹⁶⁹.

Recientemente, se ha observado que la expresión del factor de *splicing* ESRP2 (*epithelial splicing regulatory protein 2*), necesario para mantener el programa de *splicing* del hepatocito adulto ¹⁷⁰, se encuentra significativamente disminuida en el HCC, pudiendo contribuir también al proceso de hepatocarcinogénesis ^{159,171}.

Finalmente y como se tratará en el apartado 3.1, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la expresión del factor de *splicing* SLU7 se encuentra significativamente disminuida en el hígado cirrótico y el HCC ¹⁷², y que SLU7 puede jugar un papel relevante en el proceso de hepatocarcinogénesis.

2.2. Alteraciones de eventos de *splicing* y hepatocarcinogénesis

Se han descrito múltiples variantes de *splicing* asociadas al HCC ^{90,159–161}, como hemos adelantado en el apartado 1.3.3. entre ellas se encuentra la de genes implicados en el control de la mitosis y en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica como son SGO1 ^{173,174}, AURKB ¹⁷⁵ y MAD1 ¹⁷⁶.

En cuanto a SGO1, se han descrito 13 variantes de *splicing* de *SGO1* siendo *SGO A1*, *B1* y *C2* las más estudiadas. Entre ellas difieren principalmente en el procesamiento del exón 6 o 9, que determina la localización centromérica o centrosómica de la proteína ^{177,178}. *SGO1A1* y *B1* con localización en la región centromérica son deficientes en el exón 9, *SGO1B1* carece además de una parte del exón 6 ¹⁷⁷. *SGO1C2*, también denominada *sSGO1*, es deficiente en el exón 6 y se localiza en el centrosoma ^{177,178}. Se ha demostrado que *SGO1C* induce mitosis aberrantes e inestabilidad cromosómica similar a la depleción de *SGO1A*, sugiriendo un papel como dominante negativo ¹⁷³. De acuerdo con ello y demostrando el papel que la inestabilidad cromosómica juega en el proceso de hepatocarcinogénesis, la haploinsuficiencia de *Sgo1* en ratones predispone al desarrollo de HCC en respuesta al carcinógeno azoximetano ¹⁷⁴. Más relevante, estos ratones desarrollan HCC espontáneamente a los 12 meses de edad como consecuencia del acúmulo de daño en el DNA y de la alteración en la expresión de oncogenes ¹⁷⁴.

Por otro lado, se ha observado que el *splicing* aberrante de *MAD1* genera la isoforma *MAD1β* deficiente en el exón 4, que secuestra a *MAD2* en el citoplasma. Esta retención de *MAD2* impide que ejerza su función en el punto de control mitótico induciendo la aneuploidía celular ¹⁷⁶. Cabe destacar, que en este estudio *MAD1β* se encuentra inducida en el 24% de los pacientes con HCC analizados ¹⁷⁶.

En cuanto a *AURKB*, en las etapas más avanzadas de la hepatocarcinogénesis se ha detectado una variante de *splicing* deficiente en el exón 6 (*AURKB-Sv2*) que no presenta actividad quinasa, por lo que podría actuar como dominante negativo de la actividad de *AURKB* y, así, contribuir a la inestabilidad cromosómica ¹⁷⁵. De hecho, la expresión de *AURKB-Sv2* en HCC se ha asociado a una rápida recurrencia tras la intervención quirúrgica y a un mal pronóstico ¹⁷⁵.

Sin embargo, en muy pocos casos se han descrito los mecanismos moleculares completos y las vías de señalización implicadas en la desregulación de estos eventos de *splicing* asociados al HCC.

En este sentido cabe destacar la importancia de la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) en las alteraciones del *splicing* alternativo asociadas al HCC ¹⁶². EGFR es un receptor transmembrana sobre el que convergen múltiples estímulos que forman parte del microambiente del tumor hepático ^{179,180}. Recientemente, se ha caracterizado la participación de EGFR en tres vías de señalización que afectan al *splicing* de dos genes supresores de tumor y de un receptor de membrana que regula señales mitogénicas y de supervivencia ¹⁶².

El factor de transcripción de la familia Krüppel KLF6 es un supresor de tumores inactivado en HCC por un mecanismo de *splicing* alternativo mediado por la estimulación del EGFR ^{181,182}. La activación de EGFR y de la vía de señalización RAS/PI3K/AKT a través de la fosforilación e inhibición de SRSF1 genera la variante de *splicing* KLF6 SV1, que codifica para una proteína truncada la cual actúa como dominante negativo de KLF6 ¹⁸¹. Cabe resaltar, que el factor de crecimiento del hepatocito (*hepatocyte growth factor*, HGF) y su receptor (cMET) también se han visto implicados en la desregulación del *splicing* de KLF6 y la inducción de KLF6 SV1 en el HCC, a través de PI3K/AKT y de la disminución de las proteínas SRSF3 y SRSF1 ¹⁸³. Estos datos ponen de manifiesto tanto la relevancia de los eventos de *splicing* en la regulación de la expresión génica como el papel de las vías de señalización celular.

El cambio en el patrón de expresión de las isoformas del receptor de la insulina (*insulin receptor*, IR) debido al *splicing* alternativo de su exón 11 es un evento característico del HCC ¹⁶³. La transformación neoplásica de los hepatocitos durante el proceso de carcinogénesis se ha relacionado con la acumulación de la isoforma IR-A característica del hígado fetal, en detrimento de la isoforma IR-B característica del hígado adulto ¹⁶³. La expresión de la variante de *splicing* IR-A ha sido asociada a la inducción de los factores de *splicing* hnRNPH, hnRNPA1 y CUGBP1 en respuesta a la activación de las quinasas MEK/ERK tras la estimulación de EGFR por sus ligandos, incluida la anfirregulina (*amphiregulin*, AREG) ¹⁶³.

La AREG es un factor de crecimiento con una expresión indetectable en el hígado sano, y con niveles elevados no sólo en el HCC sino también en estadios pre-neoplásicos como la cirrosis, contribuyendo a la proliferación, supervivencia y transformación de los hepatocitos ^{184,185}. Nuestro grupo ha demostrado que la activación del EGFR por la AREG promueve la alteración del *splicing* alternativo del factor de transcripción y supresor de tumores p73 en el HCC (Figura 11) ¹⁷². p73 es un homólogo de p53 que a nivel transcripcional presenta funciones similares regulando la expresión de genes implicados en la senescencia celular, proliferación o apoptosis ¹⁸⁶.

La unión de la AREG a su receptor EGFR promueve la activación de la quinasa JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*) y la activación del factor de transcripción ELK-1 (*ETS domain-containing protein*), resultando en la inhibición de la expresión del factor de *splicing* SLU7¹⁷². Esta inhibición de SLU7 impide la incorporación del exón 2 en el mRNA de *p73* generándose la isoforma defectiva ΔEx2p73 , que actúa como dominante negativo tanto de *p73* como de *p53*¹⁷². Es importante destacar, que los niveles de expresión de la AREG y la isoforma ΔEx2p73 correlacionan de forma directa en el hígado sano, cirrótico y el HCC viéndose aumentados con la progresión de la enfermedad. Además, y de acuerdo con ello, la expresión de SLU7 disminuye en el hígado cirrótico y el HCC, sugiriendo un importante papel de la vía AREG-SLU7-*p73* en el proceso de hepatocarcinogénesis¹⁷².

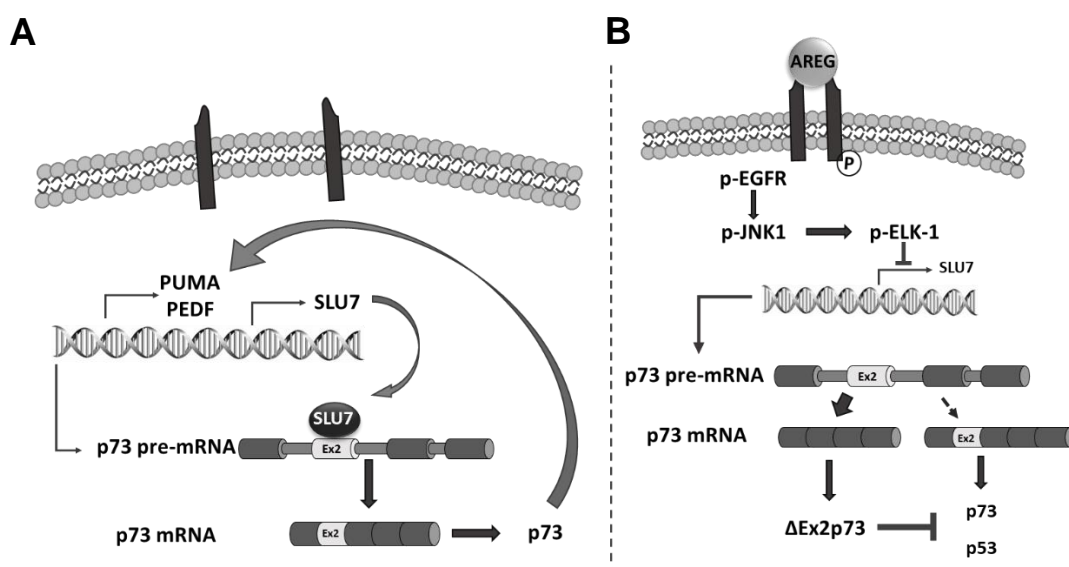


Figura 11. Regulación del *splicing* alternativo de *p73* en respuesta a la anfirregulina (AREG) en el HCC. (A) En ausencia de AREG, SLU7 regula la incorporación del exón 2 en el mRNA de *p73* dando lugar a la proteína funcional supresor de tumor *p73*. (B) En el HCC, la expresión de AREG lleva a la activación de EGFR desencadenando una cascada de señalización que conduce a la fosforilación y activación de la quinasa JNK1 y del factor de transcripción ELK-1. La inhibición de la transcripción del factor de *splicing* SLU7 por P-ELK-1 promueve el *splicing* aberrante de *p73*, favoreciendo la no incorporación del exón 2 y generando la isoforma ΔEx2p73 , que actúa como dominante negativo no sólo de *p73* sino también de *p53*. Adaptación de Castillo J et al. (referencia 172).

Todos estos trabajos ponen de manifiesto la importancia del microambiente tumoral y de las vías de señalización en la regulación de eventos de *splicing* fundamentales para el mantenimiento del transcriptoma funcional del hígado sano.

3. SLU7 Y HEPATOCARCINOGENÉNESIS

SLU7, y su homólogo en humanos hSLU7, es un factor de *splicing* originalmente descrito en levaduras esencial para la segunda reacción catalítica del proceso de *splicing*, asegurando la fidelidad en la selección del sitio 3' de *splicing* ⁸⁷⁻⁸⁹.

En cuanto a su estructura proteica, hSLU7 de aproximadamente 75 KDa, se compone de tres dominios: una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS), un motivo *zinc-knuckle* y una región rica en lisinas (Figura 12). El dominio zinc presenta un átomo de zinc que interacciona con residuos de cisteína (C) e histidina (H). Este motivo interacciona con el dominio NLS para formar una única estructura necesaria para la entrada y el mantenimiento de hSLU7 en el compartimento nuclear impidiendo el regreso al citoplasma por la vía CRM1 (*chromosomal region maintenance 1*). En el extremo C-terminal, se encuentra el dominio rico en lisinas responsable de la asociación con los ácidos nucleicos y otras proteínas. Finalmente, la posible translocación al citoplasma de hSLU7 por la vía CRM1 está mediada por los cuatro dominios ricos en leucinas ¹⁸⁷.

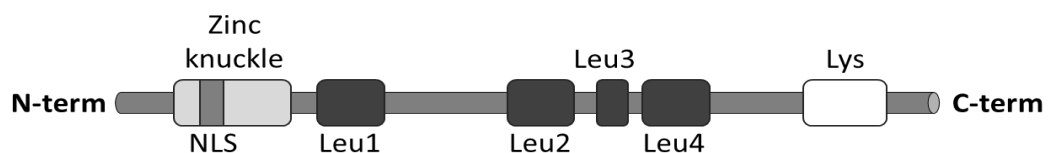


Figura 12. Estructura de la proteína de hSLU7 en humanos. La proteína de hSLU7 está compuesta por los siguientes dominios: señal de localización nuclear (NLS), *zinc-knuckle*, cuatro repeticiones de leucinas (Leu 1-4) y un dominio rico en lisinas (Lys). Adaptado de Shomron N et al. (referencia 188).

Como ya se ha mencionado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la expresión de SLU7 se encuentra significativamente reducida en el hígado de los pacientes con cirrosis y en el HCC posiblemente a través de la vía AREG-EGFR ¹⁷². Por ello, durante los últimos años nuestra investigación se ha centrado en la caracterización del papel de SLU7 en la fisiopatología hepática.

Nuestros datos previos mostraron una inducción de la expresión de *Slu7* en el hígado de ratón tras el nacimiento ¹⁸⁹, sugiriendo la importancia de la regulación de este factor de *splicing* para garantizar la expresión de las variantes de *splicing* específicas y necesarias de cada momento ^{189,190}. En cuanto a los mecanismos reguladores, se ha descrito que los factores de transcripción SP1 y ELK-1 se unen al promotor de SLU7 para asegurar este control espacio-temporal imprescindible de su expresión. Más concretamente, la unión de SP1 media en la activación de la transcripción, mientras que la de ELK-1 promueve su inhibición ¹⁹⁰. La localización de SLU7 puede variar entre el núcleo y el citoplasma en respuesta a señales de estrés como la radiación ultravioleta o la exposición al calor, estando regulado este transporte de SLU7 del núcleo al citoplasma por la vía de señalización de las quinasas JNK y en menor medida p38 ¹⁸⁸.

3.1. Papel de SLU7 en la diferenciación hepática y la hepatocarcinogénesis

El procesamiento del RNA, junto con los cambios de expresión de factores de transcripción y las modificaciones epigenéticas juegan un papel fundamental en el establecimiento del programa de expresión génica característico del hígado adulto ⁷⁶. La importancia del *splicing* alternativo en el mantenimiento del fenotipo diferenciado del hígado se evidencia por la diversidad de transcritos que se presentan en este tejido ¹⁹¹.

La evolución del daño hepático viene acompañada por una pérdida progresiva de las funciones hepáticas y de la expresión de genes hepatoespecíficos, que en muchas ocasiones son reemplazados por la inducción de marcadores fetales y de desdiferenciación ^{192–195}. Muchos de estos eventos están asociados a una alteración en la actividad de factores de transcripción hepáticos, además de a variaciones en factores de *splicing*, tal y como se ha explicado en el apartado 2.1. y 2.2. ^{120,149}. Como consecuencia del cambio en el patrón de expresión génica y de la desdiferenciación, los hepatocitos adquieren una capacidad de crecimiento autónomo, de evasión de la muerte, invasión y metástasis, todas ellas características del HCC ^{150,151}.

De acuerdo con ello, nuestro grupo ha demostrado que la expresión adecuada de SLU7 es esencial para mantener el correcto patrón de expresión génica responsable de la identidad e integridad hepática. De hecho, hemos observado que la disminución hepatoespecífica de SLU7 en el ratón (shSLU7) resulta en la pérdida de la expresión de genes hepatoespecíficos y en la reactivación de genes propios del hígado fetal y, en consecuencia, en la alteración del metabolismo glucídico y lipídico y en la pérdida de la quiescencia ¹⁸⁹. En ausencia de daño hepático, la disminución de SLU7 promueve la activación de genes mitogénicos de inducción temprana como *c-Myc*, *Egr1* o *Ccnd1*, indicando que este factor de *splicing* podría

actuar como un “guardián” de la quiescencia hepatocelular ¹⁸⁹. De hecho, nuestros datos muestran que la expresión de SLU7 se inhibe de forma transitoria a tiempos muy cortos tras la hepatectomía parcial ¹⁸⁹, sugiriendo que esta inhibición es necesaria para permitir la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular e inducir la regeneración.

La reducción de la expresión de SLU7 repercute también de forma muy clara en la actividad gluconeogénica del hígado, y promueve un cambio en el metabolismo hepático hacia un fenotipo glicolítico ¹⁸⁹. Cabe destacar que la expresión diferencial en las enzimas metabólicas no sólo se establece por una desregulación del *splicing*, sino también por alteraciones a nivel transcripcional, lo que supone el reemplazo de las isoenzimas adultas por las fetales. Así, SLU7 es esencial para asegurar la transcripción de genes que participan en la gluconeogénesis en respuesta al AMP-cíclico ¹⁸⁹. En particular, tras la inhibición hepatoespecífica de SLU7 en el ratón (shSLU7) se observa la pérdida de expresión de la enzima piruvato quinasa (*L-pyruvate kinase, Lpk*) específica del hígado adulto, y la inducción de la isoenzima oncofetal característica del músculo (*pyruvate kinase m2, Pkm2*). Este evento es de gran trascendencia dado el papel relevante de PKM2 en el “efecto Warburg” o glicolisis aeróbica característica del proceso de carcinogénesis ^{6,196}.

El conjunto de estos datos pone de manifiesto el papel relevante de SLU7 en el mantenimiento del transcriptoma hepático que puede estar ocurriendo a varios niveles y a través de diferentes mecanismos. De hecho, SLU7 regula la correcta expresión en el hígado de reguladores fundamentales de la identidad hepática, como el factor de *splicing* SRSF3 y el factor de transcripción HNF4 α (*hepatocytes nuclear factor 4 α*).

Tal y como hemos adelantado en el apartado 2.1., SRSF3 ha sido identificado como un factor fundamental para mantener la diferenciación hepática y para la prevención del desarrollo de HCC ^{166,167}. De acuerdo con ello, nuestros datos muestran que el silenciamiento hepatoespecífico de SLU7 en ratón (shSLU7) resulta en la incorporación aberrante del exón 4 en el mRNA de *SRSF3*, generándose la isoforma SRSF3-ISO2. La incorporación de un codón de terminación prematuro (PTC) en este transcrito activa la maquinaria NMD para mediar en su degradación (Figura 13) ¹⁸⁹. Sin embargo, cabe destacar que algunos estudios han demostrado que, en condiciones de estrés este transcrito aberrante puede dar lugar a una proteína truncada (SRSF3-TR) con funciones biológicas distintas o incluso con una actividad de dominante negativo de la proteína completa codificada por la isoforma SRSF3-ISO1 ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

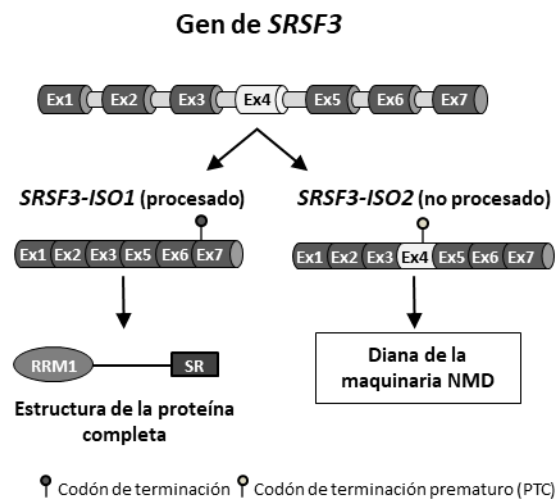


Figura 13. Transcritos e isoformas de *SRSF3*. La isoforma SRSF3-ISO1, generada tras el procesamiento del exón 4, codifica para la proteína completa SRSF3 que contiene un dominio de reconocimiento de RNA (RRM) y otro dominio rico en serina/arginina (S/R). Cuando se produce la incorporación del exón 4, se genera la isoforma SRSF3-ISO2 que incorpora un PTC que será reconocido por la maquinaria NMD para su degradación.

En cuanto a HNF4 α , en los ratones shSLU7 se observa cambio en el uso de su promotor reemplazándose la activación del promotor P1 característico del hígado adulto por la expresión a partir del promotor P2 ¹⁸⁹. Este promotor P2 es característico de las etapas fetales del hepatocito y se reactiva en el HCC, habiéndose correlacionado con un mal pronóstico de los pacientes ^{200,201}.

Todos estos resultados demuestran que SLU7 es fundamental para definir y mantener el fenotipo maduro y quiescente del hígado. Por ello, la pérdida de su expresión observada en los estadios pre-neoplásicos ¹⁷² contribuiría a la des-diferenciación y pérdida de función del hígado así como a la inducción de la proliferación, todo ello favoreciendo el proceso de transformación maligna ¹⁸⁹.

3.2. SLU7 y supervivencia de células transformadas

Como hemos mencionado en el apartado anterior, el proceso de hepatocarcinogénesis está acompañado por una marcada disminución de la expresión de SLU7 ¹⁷² sin llegar a la pérdida completa de sus niveles en las células de HCC. Es más, nuestros datos demuestran que esta expresión remanente de SLU7 es imprescindible para la supervivencia de las células de HCC ²⁰². Además, hemos demostrado que SLU7 no es solo un factor de supervivencia para las células de HCC, sino también para otros tipos de células tumorales ²⁰². Así, el silenciamiento de la

expresión de SLU7 en estas células transformadas induce su muerte por apoptosis, precedida por la inducción de estrés oxidativo, daño en el DNA y autofagia ²⁰².

Es importante señalar, que el silenciamiento de SLU7 no repercute en la viabilidad de los hepatocitos primarios no transformados o de la línea celular bien diferenciada y no tumorigénica HepaRG ²⁰².

En cuanto a los mecanismos moleculares implicados, hemos demostrado que este efecto del silenciamiento de SLU7 en la viabilidad de las células transformadas está estrechamente relacionado con la expresión del clúster oncogénico miR17-92 ²⁰². Este clúster pertenece a una de las familias de microRNAs (*small non-coding RNA*) mejor caracterizadas por su reconocida participación en la tumorigénesis de múltiples tumores hematológicos y tumores sólidos, incluyendo el hepático ²⁰³⁻²⁰⁷.

En concreto, el clúster miR17-92 se encuentra localizado en el intrón 3 del transcrito *C13orf25* (*human chromosome 13 open reading frame 25*) y codifica para seis microRNAs maduros: miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20a y miR-92a ²⁰⁸. En nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que SLU7 se une directamente al mRNA *C13orf25* para favorecer la expresión del transcrito B el cual, al incluir el intrón 3, codifica para los microRNAs del clúster miR17-92 (Figura 14) ²⁰². De esta forma, el silenciamiento de la expresión de SLU7 en las células transformadas se acompaña de la disminución de la expresión del clúster y, como consecuencia, de la inducción de la expresión de genes diana, como el inhibidor del ciclo celular P21 y el gen pro-apoptótico BIM ²⁰². Así, la expresión de P21 y BIM podría contribuir a la muerte por apoptosis inducida al silenciar SLU7, que de hecho es revertida por miR-17 ²⁰².

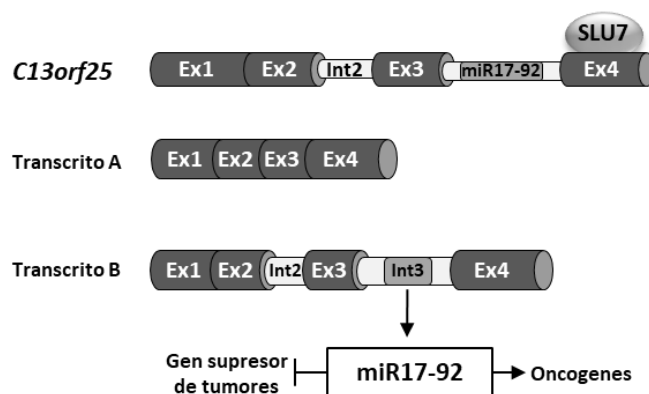


Figura 14. SLU7 regula la expresión del clúster de microRNAs miR17-92. El clúster miR17-92 se encuentra incluido en el intrón 3 del locus *C13orf25*. La unión directa de SLU7 promueve la retención de los intrones 2 y 3 y la generación del transcrito B. A partir de este transcrito se generan los microRNAs del clúster miR17-92 que inhiben la expresión de genes supresores de tumores y promueven la de oncogenes.

En resumen, queda patente la dualidad del papel de SLU7 en la fisiopatología hepática. Por un lado, la relevancia de su expresión en el hígado sano para garantizar el fenotipo diferenciado y quiescente de los hepatocitos y asegurar, a su vez, su función metabólica. Todas estas características son necesarias para prevenir la transformación celular y el inicio de la hepatocarcinogénesis ¹⁸⁹. Por otro lado, la expresión de SLU7 en las células de HCC y las células tumorales de otros orígenes es fundamental para mantener su viabilidad, sugiriendo que SLU7 podría representar una nueva diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo y largo en el tiempo que se desarrolla en un ambiente de inflamación y daño crónicos. El estrés oxidativo, las citoquinas, los factores de crecimiento y ciertos metabolitos favorecen la des-diferenciación de los hepatocitos y la activación de una respuesta reparadora y proliferativa, que mantenidas en el tiempo promueven la inestabilidad genómica y la transformación neoplásica de los hepatocitos.

Nuestro grupo ha demostrado que la disminución de la expresión del factor de *splicing* SLU7 durante la progresión de la patología hepática puede participar en la inducción del fenotipo des-diferenciado de los hepatocitos y, como consecuencia, en la pérdida de función del órgano y en el aumento de su capacidad de proliferación, ambos fenómenos asociados con el proceso de hepatocarcinogénesis.

Sin embargo, SLU7 es fundamental para la supervivencia de las células de hepatocarcinoma (HCC). De acuerdo con ello, su inhibición en las células de HCC y otras líneas tumorales de distintos orígenes desencadena su muerte por apoptosis, asociada a un aumento del estrés oxidativo y daño en el DNA.

La preservación de la integridad del genoma es esencial para la homeostasis celular, su funcionalidad y, en última instancia, para la supervivencia del individuo. Recientemente, se ha demostrado que alteraciones en la expresión de proteínas de unión al RNA son origen de inestabilidad genómica asociada a la transcripción (TAGIN), lo cual supone una fuente importante de errores en el metabolismo del DNA que comprometen la integridad genómica y pueden conducir al desarrollo de cáncer.

Por ello, nuestra hipótesis de trabajo es que la inhibición de la expresión de SLU7 durante el daño hepático crónico puede contribuir, a través de eventos de *splicing* o por la inducción de TAGIN al proceso de hepatocarcinogénesis. En el contexto de las células de HCC que presentan una alta tasa de proliferación, la TAGIN inducida podría explicar la inducción de apoptosis como consecuencia del estrés replicativo.

OBJETIVOS

1. Caracterizar el papel diferencial de SLU7 en la supervivencia de las células transformadas frente a las no transformadas.
 - 1.1. Estudiar el papel de SLU7 en la progresión del ciclo celular.
 - 1.2. Estudiar el papel de SLU7 en la inducción de daño en el DNA asociado a las alteraciones en la transcripción (TAGIN).
2. Estudiar el papel de SLU7 en el mantenimiento de la estabilidad genómica y los mecanismos moleculares implicados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS DE HÍGADOS HUMANOS

Las muestras de los hígados humanos fueron obtenidas a través del Biobanco de la Universidad de Navarra (Pamplona, España) y fueron procesadas de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Comité de Ética de la Investigación (CEI 47/2015). Las muestras de hígado cirrótico y de hepatocarcinoma (HCC) se obtuvieron de pacientes sometidos a hepatectomía parcial o trasplante hepático. Mientras que las muestras de hígado sano se obtuvieron de pacientes con tumores digestivos o sometidos a biopsias percutáneas de hígados sanos o con cambios mínimos.

Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C tras su obtención para el posterior procesamiento.

2. LÍNEAS CELULARES

La línea de hepatoma humano bien diferenciado HepaRG se obtuvo de Biopredic (Rennes, Francia) y se mantuvo en cultivo en medio *Williams' Medium E* con glutamina y suplementado con 7,5% de suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS), 1% de glutamina/penicilina/estreptomocina (*glutamine/penicillin/streptomycin*, GPS), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina y 50 μM de hidrocortisona.

Los hepatocitos humanos (*human hepatocytes*, HumHep) se obtuvieron de biopsias de hígado de pacientes con tumores no hepáticos y se cultivaron de acuerdo con el protocolo ya descrito²⁰⁹.

Las líneas celulares de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 y HepG2, así como la línea celular de carcinoma cervical humano, HeLa, fueron obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC) y mantenidas en cultivo en medio *Dubelcco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con 10% FBS y 1% GPS.

La línea celular de cáncer de pulmón H358 obtenida de la ATCC se mantuvo en cultivo en medio *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado con 10% FBS y 1% GPS.

Por otro lado, para la producción de los virus adenoasociados (*adeno-associated virus*, AAV) se utilizaron las células procedentes de riñón embrionario humano HEK-293, que se cultivaron en DMEM con 10% FBS y 1% GPS.

Los medios de cultivo, la tripsina, el FBS, los antibióticos y la insulina utilizados en el cultivo celular proceden de Gibco (Waltham, MA, EEUU). El tampón fosfato

salino de Dulbecco (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, DPBS) es de Gibco. El material de cultivo utilizado (placas, pipetas, rascadores y Falcons) se adquirieron de Costar/Corning (Corning, NY, EEUU) y Sarstedt (Newton, NC, EEUU).

3. MATERIAL Y REACTIVOS GENERALES

Los reactivos químicos mencionados a lo largo de la presente tesis (sales, ácidos, tampones, etc.) son de grado analítico y fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania), Calbiochem (Darmstadt, Alemania), GE Healthcare (Pittsburgh, PA, EEUU), Meck (Darmstadt, Alemania) y Scharlau (Barcelona, España).

En cuanto a los reactivos para la electroforesis de proteínas, así como los marcadores moleculares de proteínas preteñidos son de BioRad (Hercules, CA, EEUU).

4. ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 1 del anexo 1.

Se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Cell Signaling (Leiden, Países Bajos), Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, EEUU), Sigma-Aldrich, Novus (Centennial, CO, EEUU), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU), MBL (Woburn, MA, EEUU), Santa Cruz (Dallas, TX, EEUU), Milipore (Darmstadt, Alemania), Invitrogene (Waltham, MA, EEUU) y BD Biosciences (San José, CA, EEUU).

5. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS

5.1. siRNAs

Para el silenciamiento de las líneas celulares humanas, se utilizó como reactivo de transfección Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen) y siRNAs sintetizados por Sigma-Aldrich. El siRNA control se denomina siGL (CGTACGCGGAATACTTCGA), mientras que los siRNAs para SLU7 se denominan siSLU7-1 (GGATGAAGATAAATATGCA) y siSLU7-2 (GAATCCAGATGAAGTGAGT). Los experimentos presentes en este trabajo se realizaron utilizando el siSLU7-2 denominado siSLU7. El siSLU7-1 se utilizó para corroborar la especificidad de los resultados obtenidos en las células silenciadas con el siSLU7-2. Los siRNAs para SRSF3 se denominan siSRSF3 (GAGUGGAACUGUCGAAUGG), que silencia la expresión de las dos isoformas estudiadas (SRSF3-ISO1 y SRSF3-ISO2), y siISO2 (UCAACUAGCCCUUUCAGCGUCAUGU)¹⁹⁸, que silencia específicamente la expresión de la isoforma que incluye el

exón 4 (SRSF3-ISO2). El siRNA para WAPL se denomina siWAPL (CGGACUACCCUUA GCACAA)²¹⁰.

Se sembraron 150.000 células PLC/PRF/5 y HeLa, 275.000 células HepG2 y H358 y 175.000 células HepaRG por pocillo en placas de 6 pocillos en los correspondientes medios de cultivo mencionados en el apartado de líneas celulares.

Al día siguiente, se transfectaron con los oligonucleótidos siRNA específicos para cada ensayo y con el siRNA control (siGL) a una concentración de 75 nM en las transfecciones individuales, 50 nM en las co-transfecciones de siRNAs y 75 nM de siRNA y 100 nM de microRNA en las dobles transfecciones con microRNA. El medio de transfección utilizado fue Opti-MEM (Gibco) al 10% FBS y sin antibióticos.

Las células se utilizaron en diferentes ensayos y se recogieron a las 48 o 72 horas de la transfección.

5.2. Plásmidos

Todos los vectores de expresión utilizados se produjeron transformando bacterias competentes *E.coli* y creciéndolas en LB Broth (Sigma-Aldrich) en condiciones estériles y a 37°C en agitación durante toda la noche. Los plásmidos se purificaron mediante *Endofree Plasmid Maxi Kit* de Qiagen (Hilden, Alemania). La concentración de los plásmidos se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Las transfecciones de los distintos plásmidos utilizados se realizaron con 1,8 µg/pocillo del plásmido en estudio o el correspondiente plásmido control utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). A las 48 horas de la transfección, se recogieron las células para continuar con el análisis correspondiente especificado en el apartado de resultados.

Para el estudio del papel de SRSF3-ISO2 se generaron tres construcciones de sobreexpresión en el vector comercial pcDNA3 (Invitrogen). El inserto clonado en los tres plásmidos incluye la secuencia del gen de *SRSF3* desde el exón 1 hasta el exón 4, diferenciándose entre ellas en el tamaño del fragmento del exón 4 clonado. Los plásmidos se denominaron de la siguiente manera: pcDNA-SRSF3-ISO2 Exon4 (incluye la secuencia completa del exón 4), pcDNA-SRSF3-ISO2 Stop (incluye hasta el condón de terminación prematuro (PTC) del exón 4) y, finalmente, pcDNA-SRSF3-ISO2 V5 (incluye la secuencia V5 fusionada al PTC). Como control se utilizó el plásmido vacío pcDNA3.

En los ensayos de detección de R-Loops por inmunofluorescencia, se transfectaron las células con el plásmido de sobreexpresión de la enzima RNasa H1 (RNH1) cedido por el Dr. A. Aguilera (Sevilla, España).

Para estudiar la presencia de secuencias de reconocimiento del miR-17 en el exón 4 de SRSF3-ISO2 y medir su actividad, se diseñaron dos construcciones de plásmidos reporteros de luciferasa clonando en el vector pMIR-REPORTER luciferase plasmid (Ambion) la secuencia del exón 4 de SRSF3 (pEXON4), que contiene el posible sitio de unión de miR-17 (5'-AUUAGCCAGUCAACUAGCCCUUUC-3') y la misma secuencia con tres nucleótidos mutados (pEXON4Mut) (5'-AUUAGCCAGUCAACUAGACAGUUC-3') como control negativo. La mutagénesis dirigida se realizó mediante el kit *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene (San Diego, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 48 horas de la transfección, se recogieron las células para analizar la actividad luciferasa mediante el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* de Promega en el luminómetro Orion microplate luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Alemania).

6. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN

6.1. Extracción de RNA

El RNA total de las células como el de tejido se aisló siguiendo el protocolo de *LEV Simply RNA Cells and Tissue kit* en el equipo Maxwell 16 de Promega (Madison, WI, EEUU) el cual incluye el tratamiento con DNasa (desoxirribonucleasa) para eliminar los posibles restos de DNA genómico (*genomic DNA*, gDNA). Brevemente, el pellet celular o las muestras de tejido congelado se homogenizaron con 200 µl de tampón de homogeneización (Promega) y se añadieron 200 µl de tampón de lisis (Promega). Cada muestra se cargó en el cartucho correspondiente para la extracción automatizada del RNA.

La concentración y calidad del RNA se evaluó mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectofotómetro NanoDrop ND-1000.

6.2. Retrotranscripción

Partiendo de 1 µg de RNA, se realizó un tratamiento de DNasa I (Invitrogen) adicional al realizado en el sistema de extracción de Promega para eliminar el posible gDNA presente en la muestra. A continuación, se procedió a la retrotranscripción (*reverse transcription*, RT) del RNA a DNA complementario (*complementary DNA*, cDNA) durante 1 hora a 37°C con una mezcla que contiene tampón 5X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl y 3 mM MgCl₂), 10 ng/µl cebadores

aleatorios (*random primers*), 0,5 mM de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (*deoxynucleoside triphosphates*, dNTPs), 5 mM ditioneitol (DTT), 1,2 U/ μ l inhibidor de RNasa (RNase OUT) y 6 U/ μ l de la enzima transcriptasa inversa M-MLV. Todos los reactivos son de Invitrogen excepto los cebadores aleatorios y los nucleótidos que son de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

7. PCR CONVENCIONAL Y PCR A TIEMPO REAL

7.1. PCR convencional

Para analizar el efecto del silenciamiento de la expresión de SLU7 en el *splicing* alternativo de los distintos genes analizados, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) con parejas de cebadores que hibridan en diferentes exones o intrones, permitiéndonos analizar la expresión de cada isoforma de *splicing* por las diferencias en el tamaño entre los fragmentos amplificados.

Las condiciones generales de las reacciones fueron las siguientes, variando para cada gen la temperatura de hibridación y número de ciclos realizados. Los cebadores utilizados se detallan en la tabla 2 del anexo 2.

Desnaturalización inicial	95°C	15 min	} 30-40 ciclos
Desnaturalización en cada ciclo	95°C	30 seg	
Hibridación	X°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	

Los fragmentos amplificados se separaron según su tamaño en un gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 2% teñido con el intercalante de DNA SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) y se utilizó el marcador de peso molecular TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Todos los productos de PCR fueron secuenciados en la Unidad de Genómica de CIMA LAB Diagnostic (Pamplona, España) para comprobar que el patrón de bandas obtenido correspondía a las variantes de *splicing* descritas en cada gen.

7.2. PCR a tiempo real

Las diferencias de expresión génica se analizaron mediante PCR a tiempo real en el termociclador CFX-96 Real-Time System de BioRad. Para las reacciones, se utilizó el reactivo iQ SYBR Green Supermix de la misma casa comercial. La especificidad de los productos amplificados se verificó mediante el análisis de la curva de disociación o *melting*. Así pues, para asegurar en cada PCR la especificidad de la cuantificación, en cada ciclo se midió la emisión de fluorescencia a la temperatura más alta posible antes del inicio de la curva de disociación del producto específico.

La cuantificación de la expresión de los mRNA de estudio se calculó utilizando como gen de control de la expresión constitutiva el de la proteína ribosomal RPLP0 (36B4), empleando la siguiente fórmula:

$$2^{\Delta CT} = 2^{(CT_{RPLP0} - CT_{\text{gen de estudio}})}$$

Las condiciones generales de reacción fueron las siguientes, variando para cada gen de estudio la temperatura de hibridación y de lectura de la fluorescencia. Los cebadores utilizados se detallan en la tabla 2 del anexo 2:

Desnaturalización inicial	95°C	3 min	} 45 ciclos
Desnaturalización en cada ciclo	95°C	30 seg	
Hibridación	X°C	15 seg	
Extensión	72°C	25 seg	
Lectura	Y°C	10 seg	
Curva de <i>melting</i>	De 70°C a 99.5°C en intervalos de 0,5°C (60x)		

8. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (*WESTERN BLOT*)

8.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas de células, se resuspendió el pellet celular previamente lavado en un volumen de RIPA acorde a la concentración de células en cada muestra (45-80 μ l) (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 0,5% deoxicolato sódico) conteniendo una mezcla de inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico, 10 mM fluoruro sódico y β -glucerofosfato, de Sigma-Aldrich) y un cóctel de inhibidores de proteasas de Roche. Las muestras se sonicaron durante 30 segundos a alta intensidad en el sonicador o biorruptor de Diagenode (Liège, Bélgica) y se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm a 4°C. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes para la posterior cuantificación de la concentración de proteínas mediante el método de Biuret (kit de ácido bicinónico (*bicinchoninic acid*, BCA) de Sigma-Aldrich) respecto de una curva estándar de seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*, BSA).

Para la detección de las proteínas truncadas de SRSF3, se resuspendió el pellet celular en un tampón menos restringente (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA) y, tras la incubación en rotación de 30 minutos a 4°C, se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 13000 rpm a 4°C. La concentración proteica se determinó mediante el método de Biuret.

La extracción de proteínas de tejido hepático se realizó a partir de aproximadamente 50 mg de hígado homogeneizado en tampón de urea (7 M urea, 1,97 M tiourea, 65 nM CHAPS, 6 mg/ml DTT). El homogeneizado se ultracentrifugó (ultracentrifuga Optima TLX Ultracentrifuge de Beckman) durante 45 minutos a 75000 rpm y a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se cuantificó mediante el método de Bradford (BioRad) respecto a una curva de BSA.

En todos los casos los lisados proteicos se guardaron a -80°C.

8.2. Electroforesis y *Western blot*

Las muestras se prepararon con 15-30 μ g de proteína (dependiendo de la proteína a detectar), tampón de carga (50 mM Tris pH 6,8, 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) y RIPA o urea para igualar los volúmenes de carga.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (gel de apilamiento al 7,5% y geles de separación del 7,5% al 12% de

poliacrilamida según el tamaño de las proteínas) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un buffer compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS. La electroforesis se realizó a 100 V en el gel de apilamiento y a 120 V una vez que el frente alcanzó el gel de separación.

A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de Amersham Protran (GE Healthcare) en un buffer compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol a un voltaje constante de 120 V durante 30-45 minutos dependiendo del tamaño de la proteína. En la detección de las proteínas truncadas de SRSF3 se utilizó una membrana de PVDF de Immobilon-P Transfer (Milipore) previamente activada con metanol.

8.3. Inmunodetección

Tras la transferencia, se procedió a 1 hora de bloqueo de la membrana a temperatura ambiente en TBST (25 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl (TBS), 0,1% Tween) al 5% de leche, para la detección de proteínas no fosforiladas, o BSA, para la detección de proteínas fosforiladas. A continuación, se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario diluido en TBST al 5% de leche o BSA a la concentración indicada por el proveedor. A la mañana siguiente, se incubó con el anticuerpo secundario a una dilución 1/6000 en TBST al 5% de leche o BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.

El revelado de las membranas se realizó con el kit de quimioluminiscencia Western Lightning-ECL de Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando las películas de Amersham Hyperfilm ECL.

9. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se analizó el efecto del silenciamiento de la expresión de SLU7 en la progresión del ciclo celular en las líneas celulares transformadas PLC/PRF/5, HepG2, HeLa y H358 y en las células hepáticas HepaRG y HumHep. Además, en la línea celular PLC/PRF/5 se analizó el efecto de la co-transfección de siSLU7 con siISO2 o miR-17 y en las líneas celulares HeLa y H358 se estudió el efecto de la co-transfección de siSLU7 con miR-17.

En todas las condiciones de estudio, a las 48 horas del silenciamiento se recogieron las células en un tubo especial para citometría de flujo (BD Biosciences) para posteriormente fijarlas con 50 µl de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Pasado el tiempo de fijación, se lavaron las células con 750 µl de DPBS al 1% de BSA y se permeabilizaron

con 100 µl de saponina durante 15 minutos a temperatura ambiente Finalmente, el DNA de las células se tiñó con el colorante FxCycle Violet Stain (Invitrogen) diluido en saponina al 1% de BSA.

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo usando el citómetro de flujo FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) Calibur (BD Bioscience).

En los ensayos indicados, se sincronizaron las células PLC/PRF/5 en la fase de mitosis del ciclo celular tras el tratamiento durante toda la noche con 100 ng/ml de nocodazol (Sigma-Aldrich), agente inhibidor de la progresión de la mitosis. A la mañana siguiente, se eliminó el agente del medio y se incubaron con DMEM al 5% FBS favoreciendo la progresión de las células en mitosis. Para analizar la progresión en el ciclo celular a lo largo del cultivo, se fueron recogiendo las células a distintos tiempos (0, 2, 6 y 10 h) siguiendo el protocolo para citometría de flujo descrito anteriormente.

10. EXTENSIÓN DE CROMOSOMAS

El análisis de la cohesión entre las cromátidas hermanas durante la mitosis se realizó mediante preparaciones de extensiones de cromosomas. Para ello, se transfectaron las células PLC/PRF/5 o HeLa con siGL (control), siSLU7, siSLU7 y siISO2, o siSLU7 y miR-17. A las 48 horas del silenciamiento, se trataron las células durante 3 horas con 100 ng/ml de nocodazol. Tras el tratamiento, se colocaron las placas de cultivo celular en agitación leve, de esta manera se favorece que las células en su mayoría paradas en mitosis se despeguen. Se recogió el medio de cultivo con las células y se pasó a un tubo Falcon limpio.

Para la preparación de las extensiones de cromosoma es necesario inducir un choque hipotónico a las células para romper las membranas y extraer los cromosomas. Para ello, se añadieron 5 ml 0,075 M KCl previamente atemperado a 37°C. Se incubaron las células con esta solución durante 20 minutos a 37°C y, pasado el tiempo, se fijaron las células durante 15 minutos con tampón de Carnoy (metanol:ácido acético glacial (3:1)). Tras la fijación y lavado, se diluyó la muestra en el tampón Carnoy.

Finalmente, se depositaron 10 µl de muestra sobre cada porta objetos lanzándola a una distancia de 30-40 cm de altura para facilitar la separación de los cromosomas. Se dejaron secando las preparaciones para posteriormente teñir los cromosomas con solución Giemsa (Merck-Millipore). Se deshidrataron las muestras incubándolas primero en acetona, seguido de xilol:acetona (1:1) y, finalmente, en xilol. Para la visualización de las preparaciones, se utilizó el medio de montaje DPX

(VWR BDH Prolabo) y se analizaron mediante el microscopio automatizado Zeis Axio Imager. Para la correcta visualización de las extensiones de cromosomas se requirió la utilización del objetivo de 60X o 100X, con la ayuda de aceite de inmersión (Nikon, Tokio, Japón).

11. INMUNOFLUORESCENCIA

El análisis de las mitosis por inmunofluorescencia se realizó mediante el marcaje del huso acromático (α -tubulina), DNA (*4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI) y SLU7. En los experimentos especificados, a las 36 horas del silenciamiento se sincronizaron las células en la fase de mitosis mediante el tratamiento durante toda la noche con 100 ng/ml de nocodazol. A la mañana siguiente, se eliminó el tratamiento de nocodazol y se incubaron las células durante 2 horas para revertir la parada en el ciclo celular y favorecer la progresión en la mitosis.

Tras las 2 horas de incubación, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y tras varios lavados, se añadieron 500 μ l de 50 mM NH_4Cl para bloquear la autofluorescencia. El bloqueo se realizó con 500 μ l de tampón Superblocking Blocking Buffer en DPBS (Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.

La inmunofluorescencia se realizó marcando con el anticuerpo primario anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich, dilución 1/2000 en DPBS al 1% BSA) para analizar las figuras metafásicas en las células silenciadas sin sincronizar o en combinación con el anticuerpo anti-SLU7 (Novus Biological, dilución 1/100 en DPBS al 1% BSA) en las células sincronizadas. En ambas inmunofluorescencias, el marcaje del DNA se realizó con DAPI incorporado en el medio de montaje final. Se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

A la mañana siguiente, se eliminó el exceso de anticuerpo primario y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo a una dilución 1/1000 en DPBS al 1% de BSA durante una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: DK α Mo594 (Thermo Fisher Scientific) para el marcaje de α -tubulina, DK α Rb488 (Thermo Fisher Scientific) para el marcaje de SLU7.

Para el montaje de la preparación se utilizó el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). Finalmente, las imágenes se tomaron mediante el microscopio automatizado Zeis Axio Imager.M1.

12. DETECCIÓN DE R-LOOPS

12.1. Inmunofluorescencia de S9.6 y RPA32-pS33

La detección de R-loops mediante inmunofluorescencia se realizó en las células PLC/PRF/5, HeLa o HepaRG transfectadas en las distintas condiciones especificadas en el apartado de resultados. La transfección con el plásmido de sobreexpresión de la enzima RNasa H1 se utilizó como control en la detección de R-loops inducidos tras el silenciamiento de SLU7 (siSLU7). A las 48 horas de las transfecciones, se fijaron y permeabilizaron las células con metanol frío (previamente enfriado a -20°C) durante 15 minutos. Los pasos siguientes se realizaron de acuerdo con lo descrito en el apartado 11.

La inmunofluorescencia se realizó marcando con el anticuerpo primario S9.6 (Milipore, dilución 1/250 en DPBS al 1% BSA), con el anticuerpo primario anti-P-Ser33-RPA32 (Bethyl Laboratories, dilución 1/3000 en DPBS al 1% BSA) o con una combinación de ambos. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: DKαMo594 (Thermo Fisher Scientific) para el marcaje sólo del anticuerpo S9.6 y DKαMo488 con DKαRb594 (Thermo Fisher Scientific) para el marcaje combinado de S9.6 y RPA32-pS33 respectivamente.

Finalmente, se montó la preparación en el medio de montaje Vectashield. Las imágenes se tomaron mediante el microscopio automatizado Zeis Axio Imager.M1 y, posteriormente, fueron analizadas mediante el programa ImageJ, utilizando el marcaje de DAPI para generar una máscara para los núcleos y cuantificar la señal del anticuerpo S9.6 o RPA-pS33.

12.2. Slot blot

Se silenció la expresión de SLU7 en las PLC/PRF/5 y HeLa con el siRNA específico en las condiciones de transfección detalladas en el apartado 5.1. A las 48 horas del silenciamiento, se recogieron las células para la extracción del gDNA.

12.2.1. Extracción de DNA genómico

La extracción del gDNA se realizó siguiendo el protocolo de *LEV Blood DNA kit* en el equipo Maxwell 16 de Promega. Brevemente, el pellet celular se diluyó en 300 µl de DPBS y se añadieron 30 µl de proteinasa K (Promega) y 300 µl de tampón de lisis

(Promega). Se incubaron las muestras durante 20 minutos a 56°C y cada una se cargó en el cartucho correspondiente para la extracción automatizada del gDNA.

La concentración y calidad del DNA se evaluó mediante en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

12.2.2. Tratamiento con RNasa A y RNasa H1

Para eliminar el posible RNA presente en la muestra tras la extracción del gDNA, se trataron 5 µg de gDNA de cada condición con 1 mg/ml de RNasa A (Roche) en un volumen final de 18 µl durante 30 minutos a 37°C, seguido de la inactivación enzimática a 65°C durante 15 minutos. Para la resolución de los híbridos RNA:DNA, como control se trató la mitad de la muestra (2,5 µg de gDNA) con 1 U/µg de RNasa H1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) durante 30 minutos a 37°C, seguido de la inactivación enzimática a 65°C durante 15 minutos.

12.2.3. Slot blot

El gDNA se hibridó en una membrana de nylon (Nytran Super Charge, Schleicher & Schuelle, EEUU), previamente equilibrada con el tampón citrato al 6X (Solución stock al 20X: 3 M NaCl y 300 nM Na₃C₆H₆O₇ pH 7.0). El gDNA se transfirió a la membrana por absorbancia utilizando el aparato 96-well Bio-Dot (BioRad) conectado a una bomba de vacío. Tras la transferencia, se fijó el gDNA en la membrana mediante luz ultravioleta durante 30 segundos a 1200 J y, posteriormente, se secó durante 2 horas a 80°C utilizando el aparato Gel Dryer Model 583 (BioRad) conectado a una bomba de vacío. La membrana se bloqueó a temperatura ambiente en TBST al 5% de leche y se incubó con el anticuerpo primario S9.6 (1/1000) durante toda la noche a 4°C.

12.2.4. Inmunodetección

La inmunodetección se realizó siguiendo el protocolo de inmunodetección descrito en el apartado 8.3.

12.3. Detección de huellas tras tratamiento con bisulfito

Se estudió la presencia de R-Loops en la región 3'-UTR del gen de la *β-actina*²¹¹ en gDNA no desnaturizado y tratado con bisulfito mediante una modificación de la técnica de detección de huellas²¹² y PCR anidada.

Para la detección de los R-loops mediante esta técnica, se transfectaron células PLC/PRF/5 con siGL (control) o siSLU7 por duplicado. A las 48 horas del silenciamiento, se recogieron y se extrajo el gDNA siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.2.1. La pureza del DNA y su concentración se determinó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Como control en la especificidad de detección de R-loops, se trataron triplicados de 1,7 µg de DNA por condición (en total 5,1 µg de DNA por condición) con 5 U/µl de RNasa H1 (New England Biolabs) durante 30 minutos a 37°C, seguido de la inactivación enzimática a 65°C durante 15 minutos. Mientras tanto, se prepararon triplicados de 1,7 µg de DNA por cada condición de estudio en un volumen final de 20 µl de agua libre de RNasas.

Tanto el DNA tratado con RNasa H1 como el no tratado se sometió en condiciones no desnaturizantes a un tratamiento con bisulfito utilizando *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo Research Company, CA, EEUU) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras la conversión con bisulfito, se unieron los triplicados de DNA resultantes de cada condición para el posterior análisis de R-loops mediante PCR convencional. Se amplificó 1 µl de este DNA utilizando una pareja de cebadores (β -actina Exón6 PCR1, anexo 2 tabla 2) que se encuentran flanqueando la región del R-loop en estudio ²¹¹. Las condiciones de la PCR1 con la DNA polimerasa *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	95°C	15 min	} 40 ciclos
Desnaturalización en cada ciclo	95°C	30 seg	
Hibridación	66°C	15 seg	
Extensión	72°C	60seg	
Extensión final	72°C	10 min	

Tras la electroforesis, se purificó el producto de la PCR1 utilizando *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen). Para analizar la formación de R-loop en esta región, se realizaron dos PCRs anidadas (PCR2 y PCR3) con dos parejas de cebadores localizados dentro del R-loop ²¹¹. La PCR3 se realizó con la pareja de cebadores con la secuencia sin convertir (anexo 2 tabla 2), por lo que amplifica tanto el DNA de doble cadena como el DNA que forma el híbrido RNA:DNA. La PCR2 se realizó mediante la misma pareja de cebadores (anexo 2 tabla 2) pero con la secuencia convertida (citosinas cambiadas por timinas) por lo que, solamente amplifica la

hebra de DNA que queda expuesta en la estructura del R-loop y que ha sido convertida tras el tratamiento con bisulfito.

El producto de DNA purificado de la PCR1 (3 ng) se amplificó mediante la PCR2 y PCR3 utilizando la *Immolase DNA Polymerase* (Bioline, Londres, Reino Unido). Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

a) Para los cebadores de secuencia convertida (PCR2):

Desnaturalización inicial	95°C	15 min	} 35 ciclos
Desnaturalización en cada ciclo	95°C	30 seg	
Hibridación	56°C	15 seg	
Extensión	72°C	20 seg	
Extensión final	72°C	10 min	

b) Para los cebadores de secuencia no convertida (PCR3):

Desnaturalización inicial	95°C	15 min	} 25 ciclos
Desnaturalización en cada ciclo	95°C	30 seg	
Hibridación	64°C	15 seg	
Extensión	72°C	20 seg	
Extensión final	72°C	10 min	

En todos los casos, los fragmentos amplificados se separaron según su tamaño en un gel de agarosa teñido con el intercalante de DNA SYBR Safe.

Finalmente, se secuenció el producto de DNA purificado en la PCR2 para confirmar el cambio de base tras el tratamiento con bisulfito y la presencia de R-loops.

13. RNA-PULL DOWN

13.1. Extracción de proteínas nucleares

El análisis de la interacción RNA-proteína se realizó en la línea celular de hepatocarcinoma PLC/PRF/5 y en muestras de tejido hepático humano sano o patológico (cirrótico o hepatocarcinoma).

Se silenció la expresión de SLU7 en las células PLC/PRF/5 con el correspondiente siRNA. Como control positivo de expresión de las proteínas truncadas de SRSF3, se utilizaron las células transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de *SRSF3-ISO2*. A las 48 horas de la transfección, se recogieron las células y se pasaron 1×10^7 células por condición a un tubo limpio y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras lavar el pellet celular, se resuspendió en 4 ml de DPBS frío, 4 ml de tampón de aislamiento nuclear (1,28 M sacarosa, 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 4% Triton X-100) y 12 ml de agua estéril. Se incubaron las células durante 20 minutos en hielo.

Para la extracción de proteínas nucleares derivadas de muestras de tejido hepático sano (control), cirrótico y HCC, se pulverizó una mezcla de muestras de tejido hepático procedente de 3 pacientes diferentes por condición en nieve carbónica. La extracción proteica se realizó siguiendo los pasos citados anteriormente.

Tras los 20 minutos de incubación en hielo, se centrifugaron las muestras para sedimentar los núcleos y se resuspendió el pellet nuclear en 2 ml de tampón A (150 mM KCl, 25 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5% NP40) complementado con inhibidores de proteasas y 100 U/ml RNase OUT. Para favorecer el lisado, se transfirió el extracto nuclear de cada muestra a un homogeneizador y se realizaron 15 golpes. Finalmente, se centrifugó la muestra para separar los desechos nucleares (pellet) del extracto proteico (sobrenadante). La concentración de proteínas de cada muestra se cuantificó mediante el método de Biuret respecto de una curva estándar de BSA. La concentración aproximada de cada muestra fue de 2-3 µg/µL.

En este punto se puede conservar la muestra de proteínas nucleares a -80°C con 10% de glicerol.

13.2. Incubación con los oligos

Previo a la incubación final del extracto proteico con los oligos RNA biotinilados, se preparó el complejo de las bolas de neutroavidina (Invitrogen) con cada oligo biotinilado correspondiente a la secuencia de unión de SRSF3 presente en el intrón 1 de *sororina*. Los oligos utilizados fueron los siguientes: O1 (GCCUCU UCCCUCCCGCUGCCG), O2(UCUAGAGUCCUCCUCUACCAC) y O1 mutado (GCCUCU CACGCACGCUGCCG).

Para ello se lavaron 50 µl/condición de bolas de neutroavidina con TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) y se diluyeron en 300 µl de TBS suplementado con inhibidores de proteasas y RNasas. Se incubaron 0,8 nmoles de cada oligo (O1, O2 y O1 mutado) con las bolas de neutroavidina durante 2 horas a 4°C en rotación. En ese tiempo de incubación se forma el complejo oligo/bola. Tras las 2 horas de incubación, se lavaron las bolas con TBS para eliminar el exceso de oligo no unido a la bola.

Se repartió la muestra de extracto proteico para incubar con cada oligo biotinilado unido a la bola de neutroavidina. Se incubó durante toda la noche a 4°C y en rotación para favorecer la unión de las proteínas a la secuencia consenso presente en los oligos.

13.3. Elución del complejo oligo/proteína

Se procedió a la separación del complejo oligo/proteína/bolas con 3 lavados de 150 µl de TBS y se eluyó con 40 µl de tampón Laemmli para su posterior análisis mediante *Western blot*.

14. RNA CROSS-LINKING IMMUNOPRECIPITATION (RNA-CLIP)

Para analizar la función de SLU7 en el mecanismo de regulación del *splicing* de *SRSF3*, se realizó un ensayo de RNA-CLIP que combina la fijación con ultravioleta (UV) y posterior inmunoprecipitación de la proteína en estudio con un RNA concreto.

14.1. Lisado celular

Se silenció la expresión de SLU7 en aproximadamente 1×10^6 de células PLC/PRF/5 y a las 48 h tras la transfección, se fijó la unión de las proteínas al mRNA con UV a $0,15 \text{ J/cm}^2$. Las células se recogieron en 1 ml de tampón de lisis (500 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris pH 7,5, 1% NP40, 1 mM DTT, 0,3% SDS, 0,5% deoxicolato

de sodio y H₂O miliQ) y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Para favorecer el lisado celular, se pasó la muestra 6 veces por una jeringuilla de 0,4 x 13 mm (BD Microlance) y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante de la centrifugación se ajustó a un volumen final de 1200-1500 µL en tampón de dilución (500 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5 suplementado con RNase OUT y Proteases OUT). Se separaron en torno a 100-150 µL de muestra como muestra de extracto total y se conservaron a -80°C hasta su uso. En este punto, también se pueden guardar a -80°C las muestras que se utilizarán para la inmunoprecipitación.

14.2. Formación del complejo anticuerpo-RNA

Se descongelaron las muestras en hielo y se incubaron con 20 µL de Dynabeads G (Invitrogen) durante 30 minutos a 4°C y en rotación para eliminar las posibles uniones inespecífica de la muestra a las bolitas magnéticas. Tras los 30 minutos de incubación, se descartaron las bolitas magnéticas pasando el sobrenadante de cada muestra a un tubo limpio y se mantuvieron en hielo hasta la incubación final con el anticuerpo.

Mientras tanto, se preparó el complejo anticuerpo-bolitas incubando con 25 µL/condición de bolitas Dynabeads G con 5 µg del anticuerpo anti-SLU7 (Santa Cruz) o IgG como control negativo en un volumen final de 100 µL de tampón de citrato sódico (0,1 M Na-citrate pH 5). Se incubó durante 1 hora en rotación y a temperatura ambiente para favorecer la unión del anticuerpo a las bolitas magnéticas. Pasado este tiempo, se lavaron con citrato sódico con 0,1% Tween-20 y, tras el último lavado, se resuspendieron las bolitas magnéticas unidas al anticuerpo con 20 µL de tampón de lisis.

Las muestras reservadas anteriormente se dividieron en dos y se incubó cada una de ellas con 20 µL de la muestra correspondiente de anticuerpo-bolitas magnética preparada en el apartado anterior. El conjunto de la muestra se incubó durante 2 h a 4°C en rotación favoreciendo así la formación del complejo bolita magnética-anticuerpo-RNA.

Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se realizaron varios lavados con tampones de concentraciones decrecientes de sales. Primeramente, se realizaron 2 lavados de 500 µL con el tampón de alta concentración (500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 0,05% NP40, 0,1% SDS suplementado con RNase OUT y Proteases OUT), seguido de 2 lavados de 500 µL con el tampón de una concentración intermedia (250 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 0,05% NP40, 0,1% SDS suplementado con RNase OUT y Proteases OUT) y, finalmente, de

2 lavados con 500 μ L con el tampón de baja concentración (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 0,05% NP40, 0,1% SDS suplementado con RNase OUT y Proteases OUT).

14.3. Digestión con proteinasa K y aislamiento del RNA

Para el aislamiento del RNA unido al anticuerpo, las muestras de las bolitas se eluyeron con 200 μ L de tampón proteinasa K (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 7 M urea) y 7 μ L de proteinasa K (1 μ g/ μ L) (Roche) y se incubaron durante 20 minutos a 37°C en agitación. Este mismo procedimiento se realizó en las muestras de extracto total guardadas a -80°C. Se repitió esta incubación añadiendo 200 μ L más de tampón PK. Tras esta última incubación, se recogió el sobrenadante en un tubo limpio descartando las bolitas y se añadieron 400 μ L de fenol/cloroformo para la extracción del RNA. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y 4°C para favorecer la separación de las fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio procurando no arrastrar muestra de la fase orgánica. A esta fase acuosa se le añadieron 1 μ L de Glycogen RNA grade (Thermo Fisher Scientific) y 40 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5,3. Finalmente, se añadió 1 mL de etanol 100% y se incubó durante toda la noche a -20°C para la precipitación del RNA.

Al día siguiente, se centrifugó la muestra para precipitar el RNA y se lavó el pellet con etanol 75% seguido de una centrifugación corta a 13.000 rpm y 4°C. Una vez eliminado del todo el etanol, se resuspendió el pellet de RNA con 8 μ L de agua libre de RNasa.

Finalmente, se realizó un tratamiento con DNasa seguido de la RT. Se analizó la unión de SLU7 al mRNA de SRSF3 mediante PCR a tiempo real.

15. PRODUCCIÓN DE LOS VIRUS ADENOASOCIADOS

Para el silenciamiento de *Slu7 in vivo*, se clonaron los shRNAs (*short hairpin RNA*) específicos en el contexto del miR-30 según la tecnología ideada por el laboratorio del Dr. Scott W Lowe en Cold Spring Harbour ²¹³ y se expresaron bajo el control de un promotor hepatoespecífico en vectores adenoasociados (AAV) según lo descrito por nuestro grupo ¹⁸⁹.

Los AAV8, AAV-shSLU7 y AAV-Renila (control) se produjeron mediante una doble transfección de células HEK-293 con 20 μ g del correspondiente plásmido pAAV8 y 55 μ g del plásmido empaquetador pDP8.ape (Plasmid Gactory GmbH & Co. KG, Bielefeld Germany) utilizando como vehículo de transfección, PEI (polietilenamina de alto peso molecular y libre de agua de Sigma-Aldrich), que debe ser testado

previamente para optimizar el rendimiento de la transfección, según el protocolo descrito por Gil-Farina y cols. ²¹⁴.

Por cada producción se transfectaron 30 placas de 150 mm en 10 ml de DMEM al 2% FBS. Para ello, se prepararon dos mezclas en suero fisiológico: una de ellas conteniendo el plásmido AAV8 y el plásmido empaquetador (pDP8.ape) y otra con PEI. Se mezclaron lentamente 1 ml de cada mezcla y se fue añadiendo los 2 ml gota a gota a cada placa de células. Se incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas.

A las 72 horas se recogieron las células en el medio y se centrifugaron para peletearlas. El pellet se resuspendió en 7 ml del tampón de lisis TMS y se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación con hielo seco-etanol 70%/baño a 37°C.

Se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante con un filtro de 0,45 µm. Éste fue tratado con DNasa/RNasa (Roche) (0,1 mg de cada una por placa) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Los dos AAV se purificaron mediante un gradiente de Iodixanol (*Optiprep Density Gradient Medium*, Sigma-Aldrich) en tubos Beckman de centrifugación (*Ultra clear centrifuge tubes* de 25 x 89 mm), y se centrifugaron en un rotor 70TI a 69000 rpm durante 75-90 minutos a 16°C con aceleración y deceleración máxima. Se recogió la 1ª fracción (5-6 ml) con una jeringa (BD Microlance agujas de 27G) y se concentró el virus con DPBS + 5% sacarosa (Sigma-Aldrich) en un centrífugo de 100.000 MWCO de 15 ml (Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultra-100K de Milipore), hasta un volumen de 0,5-1 ml mediante 3-4 lavados de 15 ml y centrifugando a 3000 rpm a 16°C.

Se guardó una alícuota de 20 µl de virus a -80°C para la extracción del DNA viral mediante *High pure nucleic acid kit* (Roche). Se cuantificó la concentración de AAV por PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos para el promotor hepatoespecífico α 1-antitripsina de los AAV8 por interpolación en una curva patrón para un AAV8 similar de concentración conocida.

16. ENSAYOS *IN VIVO*

Los experimentos en ratón se realizaron modulando la expresión de SLU7 específicamente en el hepatocito mediante la estrategia de los AAV desarrollados en nuestro laboratorio.

Los ensayos fueron aprobados (CEEA 082-14) por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (Pamplona, España). Se realizaron en ratones machos C57BL/6J de 16 semanas de edad adquiridos en los laboratorios Harlan (Barcelona, España). Se utilizaron al menos cinco ratones por grupo y los experimentos se repitieron al menos dos veces.

La dosis del correspondiente AAV8 (Renila y sh767) inyectada a cada ratón fue de 1×10^{11} cpg en un volumen de 100 μ l. La inyección se realizó en el plexo retro-orbital con una jeringa BD Micro-Fine de 0,5 ml en ratones anestesiados tras una inyección intraperitoneal de una disolución 1/9 xilacina (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Alemania) y ketamina (Imalgen 50, Boehringer Ingelheim Kommanditgesellschaft, Alemania). Todos los experimentos se realizaron a las 2-3 semanas de la inyección.

16.1. Hepatectomía parcial

Se realizó un modelo de regeneración hepática mediante hepatectomía parcial (HP) de dos tercios del hígado con sus correspondientes controles (*sham* o SH) utilizando el protocolo previamente descrito¹⁸⁵ en ratones control (AAV-Renila) y en ratones a los que se les había silenciado la expresión de SLU7 en los hepatocitos (AAV-shSLU7). Brevemente, se realizó una incisión transversal subxifoidea que permite la extrusión y ligación extra abdominal de los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y medio que fueron posteriormente resecados. El grupo control SH fue sometido al mismo proceso sin resección de la masa hepática.

Los animales fueron sacrificados a las 24, 34, 48, 72 y 96 horas después de la operación registrando tanto el peso del animal como el del hígado para evaluar la recuperación de la masa hepática tras la HP.

Se recogió una muestra de hígado de cada ratón para fijarla en paraformaldehído e incluirla en parafina. El resto de tejido hepático se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA y proteínas.

17. INMUNOHISTOQUÍMICA DE γ -H2AX Y Ki-67

17.1. γ -H2AX

Se analizó la expresión de γ -H2AX por inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de 5 μ m de tejido hepático fijado en parafina de ratones AAV-Renila y AAV-shSLU7 sometidos o no a HP.

Se desparafinaron los cortes en una estufa a 60°C durante 30 minutos y, a continuación, se hidrataron por sucesivos pases por Histo-clear II (15 minutos dos veces) (National Diagnostic, Atlanta, GA, EEUU), etanol a concentraciones decrecientes (100%, 96% y 70%) (5 minutos cada uno) y, finalmente, por agua desionizada. Se desenmascaró el antígeno γ -H2AX (*antigen retrieval*) en el aparato PT LINK (Dako, Santa Clara, CA) durante 30 minutos en tampón Tris-EDTA Tween 0,5% pH 9 (solución stock al 20X: 200 mM Tris, 20 mM EDTA) a 96°C. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena, se incubó con agua oxigenada al 3% en metanol durante 10 minutos.

Las uniones inespecíficas se bloquearon con una disolución de DPBS con BSA al 3% y leche al 1,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se añadió el anticuerpo primario frente a γ -H2AX (Cell Signalling) a una dilución 1/200 en DPBS-BSA 1% y se incubó durante toda la noche a 4°C.

A la mañana siguiente, se lavó el exceso de anticuerpo primario con DPBS durante 15 minutos. Se procedió a la hibridación con el anticuerpo secundario 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado, se procedió al revelado con DAB (1/100) (Dako) y se contrastó con hematoxilina (Merck)

Para la visualización de la preparación se utilizó el medio de montaje para microscopía DPX (VWR, Radnor, PA, EEUU).

17.2. Ki-67

El servicio de morfología del centro realizó IHQ en cortes de 5 μ m de tejido hepático fijado en parafina con un anticuerpo monoclonal frente a Ki-67 de Thermo Fisher Scientific generado en conejo.

18. ANÁLISIS DE LA PLOIDÍA

Los cortes de hígado de ratones control (AAV-Renila) y ratones a los que se les había silenciado la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7) se desparafinaron y, posteriormente, se incubaron a 95°C durante 20 minutos para el desenmascaramiento del antígeno. Se incubó con el anticuerpo primario anti- β -catenina (BD Biosciences) a una dilución 1/400 durante toda la noche a 4°C.

A la mañana siguiente, se eliminó el exceso de anticuerpo primario mediante varios lavados y se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse-Alexa Flour 488 (Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1/500. Se realizaron varios lavados para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, en el último de ellos se añadió

0,2 µg/ml del colorante Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) para dar contraste a los núcleos.

Finalmente, las imágenes se tomaron utilizando el microscopio LEICA DMI 6000 con el objetivo PL APO, la cámara MicroMAX-1300Y/HS Princeton Instruments y el software Metamorph 7 (Molecular Devices, San José, CA, EEUU). Para el estudio de la plodía del núcleo, se seleccionaron de forma aleatoria 250 imágenes que corresponden a un total de 100.000 células y se analizaron mediante el software Image J.

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa *GraphPad Prism*. Los datos se representan como la media \pm SEM o la mediana. Los datos distribuidos normalmente se compararon con un test t Student, mientras que los no paramétricos se analizaron con el test U de Mann-Whitney. Se utilizó el test de Spearman para el análisis de la correlación y el test de Chi cuadrado para comparar frecuencias. Se consideró un valor $P < 0.05$ como significativo. Las diferentes condiciones experimentales se estudiaron al menos por duplicado, todos los experimentos se realizaron al menos dos veces y la mayoría se repitió más de tres veces.

RESULTADOS

1. IMPLICACIÓN DE SLU7 EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el factor de *splicing* SLU7 tiene un papel esencial en la supervivencia de las células de HCC y de algunas células cancerosas de otros tejidos. Estas células transformadas muestran una gran dependencia de los niveles de SLU7, ya que la reducción de su expresión comprometió su viabilidad celular desencadenando la muerte por apoptosis como respuesta final. Sin embargo, la supervivencia de los hepatocitos primarios humanos y de la línea de hepatoma no tumorigénica HepaRG no se vio comprometida con la modulación de la expresión de SLU7 ²⁰². Por ello, nos propusimos caracterizar los eventos que preceden la muerte de las células transformadas silenciadas de SLU7 y, así, poder describir su función.

Una de las mayores diferencias entre las células sanas y las células cancerosas es su capacidad proliferativa. Estas últimas han desarrollado estrategias que les permiten escapar de los mecanismos de control asegurando así su continua proliferación y supervivencia.

El ciclo celular es un proceso con una regulación minuciosa en la cual se sabe que los componentes del espliceosoma participan de una forma activa ⁷⁷⁻⁷⁹. Por ejemplo, la delección *in vitro* de alguno de los factores de *splicing* tiene como consecuencia la muerte por apoptosis causada por una parada mitótica prolongada en el tiempo ^{121,122}. En este contexto, Karamysheva y colaboradores realizaron un estudio basándose en la estrategia de siRNAs para determinar si distintos componentes del espliceosoma tenían un papel como reguladores del ciclo celular, y observaron que la delección de determinados factores de *splicing* provocaba la parada en alguna de las fases del ciclo celular ¹²².

1.1. SLU7 es necesario para la correcta progresión del ciclo celular

Con el fin de determinar el efecto del silenciamiento de SLU7 en la progresión del ciclo celular, realizamos estudios de citometría de flujo en células transformadas de distintos orígenes a las 48 horas de su silenciamiento. Para ello utilizamos dos líneas de hepatocarcinoma (PLC/PRF/5 y HepG2), una línea de cáncer cervical (HeLa) y una línea de cáncer de pulmón (H358).

La citometría de flujo como herramienta para el análisis de la proliferación permite determinar la fase del ciclo celular en la cual se encuentran las células teniendo en cuenta la cantidad de DNA que disponen. La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se presenta en histogramas permitiéndonos

diferenciar entre células diploides (2n) en fase pre-replicativa (G0 o G1), células en fase de replicación (S) con un contenido intermedio de DNA (2n-4n) y células tetraploides (4n) en fase post-replicativa (G2/M).

El silenciamiento de SLU7 en las líneas transformadas (Figura 15A) resultó en un aumento de la población celular en la fase G2/M (Figura 15B) comparado con las células control (siGL), que presentaron una progresión normal del ciclo celular encontrándose la mayoría de ellas en la fase G1/S (Figura 15B). Estos resultados sugieren que el silenciamiento de SLU7 interrumpe la progresión normal del ciclo celular de las células transformadas favoreciendo su retención en la fase G2/M.

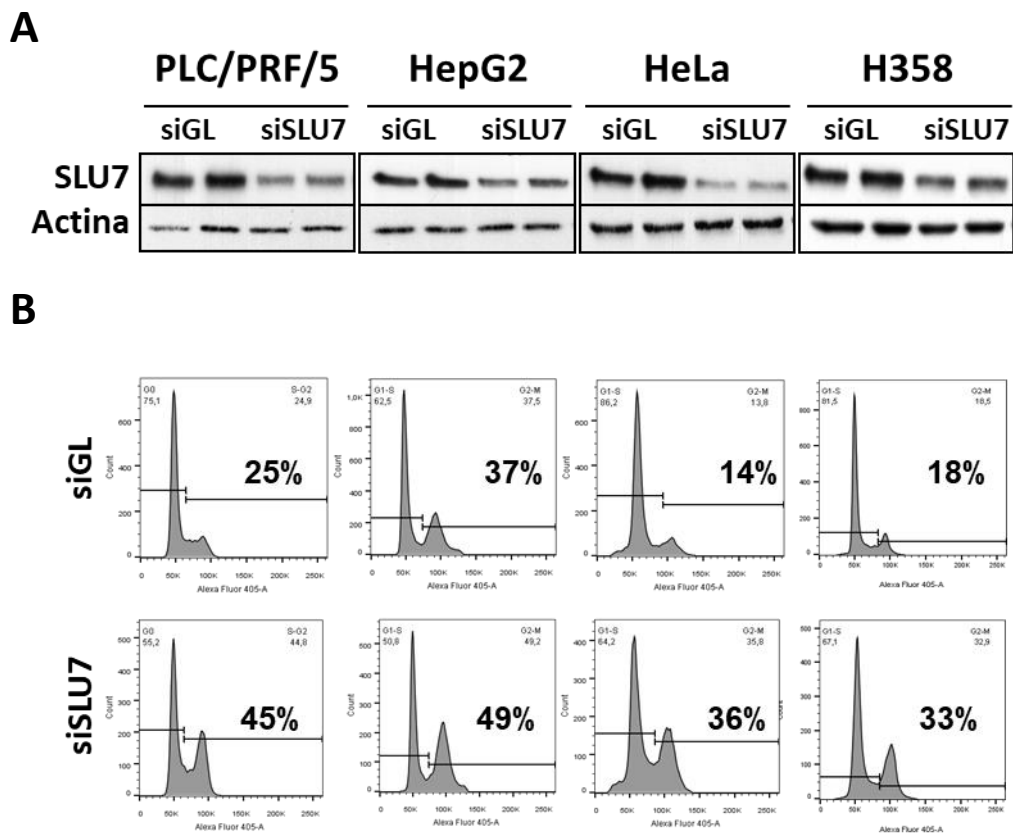


Figura 15. SLU7 es esencial para la progresión del ciclo celular de las células transformadas. (A) *Western blot* de SLU7 y de actina, como control de carga, tras 48 h del silenciamiento de SLU7 en las células de hepatocarcinoma humano (PLC/PRF/5 y HepG2) y en otras líneas transformadas como HeLa (cáncer cervical) y H358 (cáncer de pulmón). (B) La progresión del ciclo celular de las células transformadas se analizó mediante FACS a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M.

Analizamos también la progresión del ciclo celular de los hepatocitos humanos (HumHep) y de la línea de hepatoma no tumorigénica (HepaRG). A diferencia de las células transformadas, el silenciamiento de SLU7 en ambas líneas celulares (Figura 16A) no alteró la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (Figura 16B).

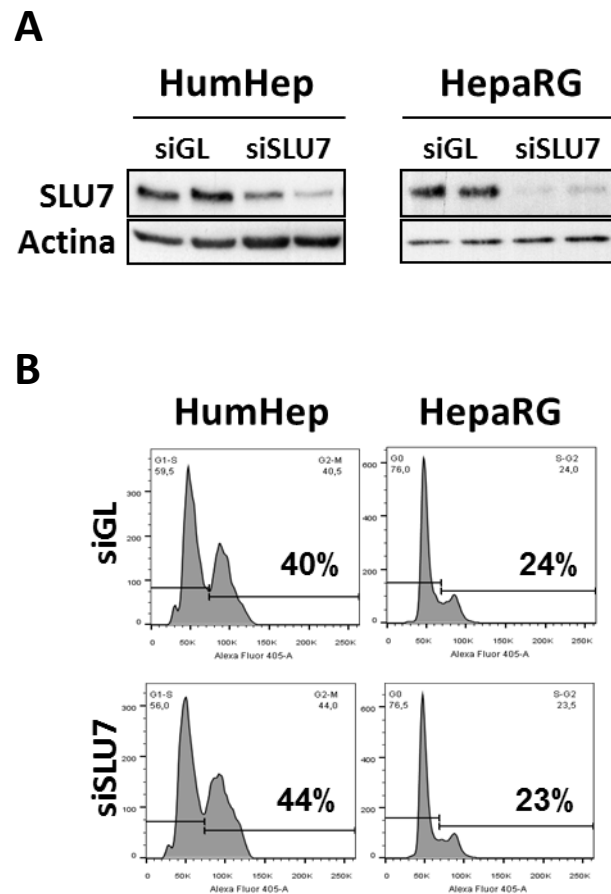


Figura 16. La disminución de la expresión de SLU7 no altera la progresión del ciclo celular de los hepatocitos humanos ni de la línea de hepatoma no tumorigénica HepaRG. (A) *Western blot* de SLU7 y de actina, como control de carga, tras 48 h del silenciamiento de SLU7 en los hepatocitos humanos sanos (HumHep) y en la línea de hepatoma bien diferenciada HepaRG. (B) La progresión del ciclo celular de dichas células se analizó mediante FACS a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M.

Para confirmar que la parada en la fase G2/M del ciclo celular de las células transformadas estaba asociada a la inhibición específica de SLU7, analizamos la progresión en el ciclo celular de las células PLC/PRF/5 y HeLa tras la transfección con otro siRNA para SLU7 (siSLU7-1) dirigido a un exón distinto al siRNA utilizado en los ensayos anteriores (siSLU7-2) (Figura 17A). Los resultados del ciclo celular mostraron que tras la transfección con cada uno de los siSLU7 alrededor del 40% de

las células eran células 4n frente al 20% de las células control (siGL) (Figura 17B), por lo que se confirmaron los resultados iniciales que evidenciaban la dependencia de las células transformadas de la expresión de SLU7 para la correcta progresión del ciclo celular.

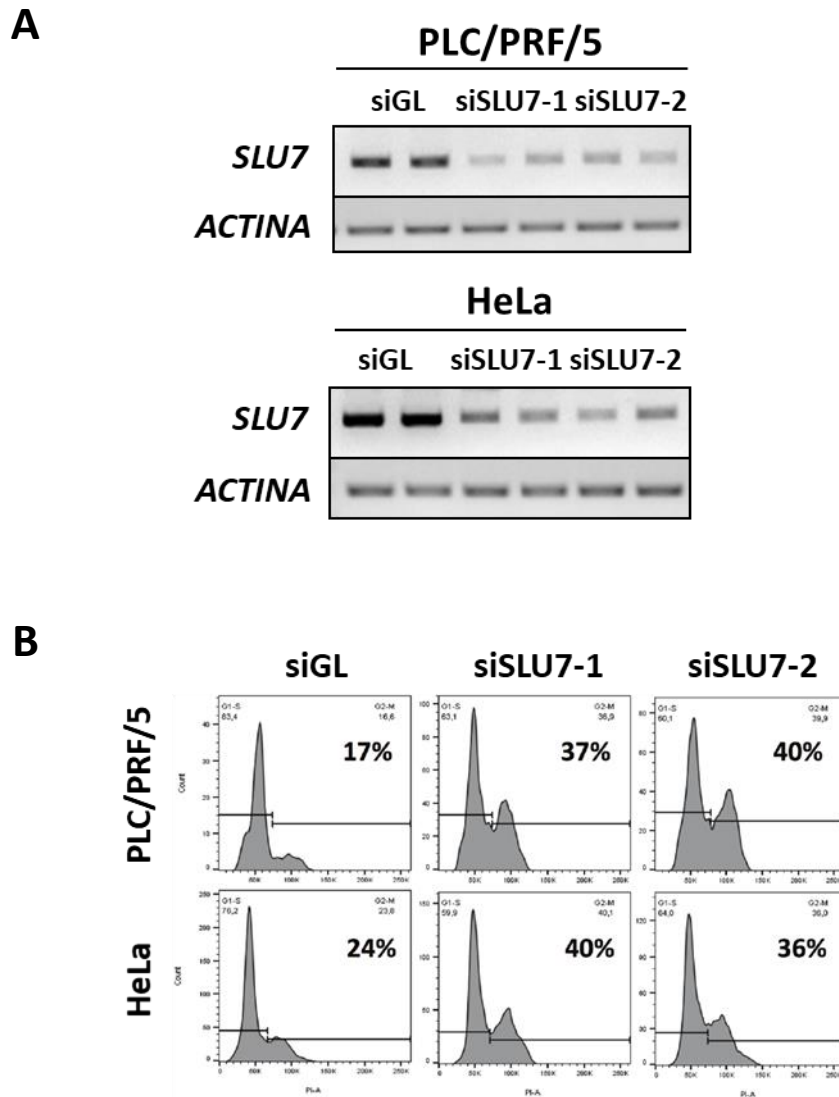


Figura 17. Efecto específico de la disminución de la expresión de SLU7 en la progresión del ciclo celular de las células transformadas. (A) Análisis por PCR del silenciamiento de *SLU7* con dos siRNAs dirigidos a exones diferentes de *SLU7* (siSLU7-1 y siSLU7-2) en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HeLa. Se muestra una PCR de *ACTINA* como control de carga. (B) Análisis del ciclo celular por FACS de las células PLC/PRF/5 y HeLa a las 48 h del silenciamiento de *SLU7* con los dos siRNAs. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M.

1.2. El silenciamiento de SLU7 induce la parada en mitosis de las células transformadas

Decidimos caracterizar si la parada observada en la fase G2/M del ciclo celular tras el silenciamiento de SLU7 (Figura 15B y Figura 17B) se producía concretamente en la fase G2 o en la fase de la mitosis (fase M).

El nocodazol es un agente que promueve la parada de las células proliferantes en mitosis, antes de la metafase, al interferir con el dinamismo de los microtúbulos induciendo su despolimerización. Como consecuencia del tratamiento, los microtúbulos no se unen correctamente al cinetocoro promoviendo la parada en el ciclo celular por la activación del punto de control del ensamblaje del huso acromático (SAC) ²¹⁵. Así pues, el tratamiento con nocodazol permite sincronizar o parar las células en la fase M de forma reversible, de manera que la eliminación de este agente del medio de cultivo revierte la parada permitiendo a las células recuperar la progresión normal del ciclo celular.

Por ello, se sincronizaron las células PLC/PRF/5 control (siGL) y siSLU7 tratándolas durante toda la noche con nocodazol y se recogieron tras la sincronización (tiempo 0 h) y a distintos tiempos de cultivo tras la eliminación del tratamiento.

Como se observa en la Figura 18, el tratamiento con nocodazol resultó en la sincronización en la fase M del 93% de las células control (siGL) y el 81% de las células silenciadas de SLU7 (siSLU7).

No obstante, tras la eliminación y lavado del agente tóxico del medio de cultivo, las células control (siGL) revirtieron rápidamente la parada y entraron en el ciclo celular, de manera que a las 2 horas de cultivo sólo el 27% permanecía en la fase G2/M. Sin embargo, las células siSLU7 fueron incapaces de revertir la parada y progresar en el ciclo celular observándose que, a las 10 horas de la fase de recuperación el 58% de las células siSLU7 continuaban paradas en la fase G2/M, mientras que a este tiempo sólo el 18% de las células control (siGL) se encontraban en esta fase.

Estos datos sugieren que el silenciamiento de SLU7 induce la parada en mitosis de las células transformadas.

Tiempo tras tratamiento con nocodazol

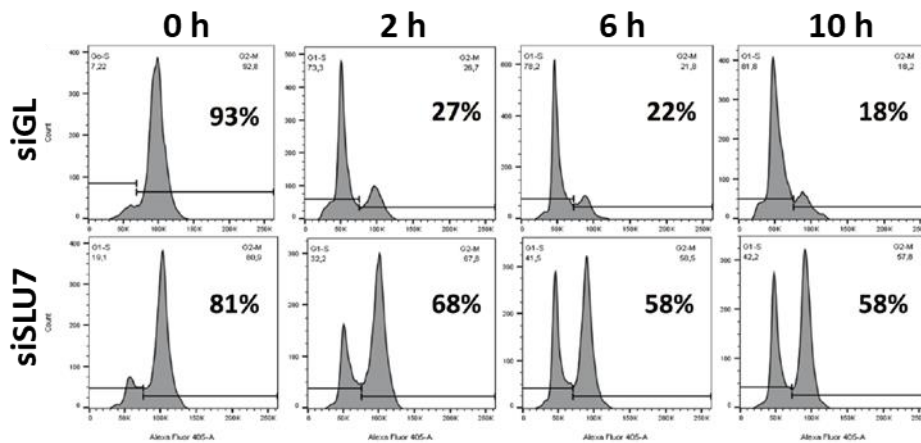


Figura 18. La disminución de la expresión de SLU7 impide la progresión en la mitosis. Análisis por FACS del ciclo celular a las 48 h del silenciamiento de SLU7 en las células PLC/PRF/5 tras el tratamiento con nocodazol durante toda la noche (0 h) y a distintos tiempos de cultivo (2 h, 6 h y 10 h) tras la eliminación del tratamiento y lavado de las células. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M.

Para confirmarlo, estudiamos el índice mitótico en las células PLC/PRF/5 y HeLa no sincronizadas a las 48 horas tras la transfección con siGL (control) o siSLU7. Para ello, se contabilizó la presencia de cromosomas condensados teñidos con DAPI en más de 250 células por condición. Como se observa en la Figura 19A, el índice mitótico fue significativamente superior en las células siSLU7 con respecto a las células control (siGL), confirmando que la parada en el ciclo celular se producía específicamente en la fase mitótica.

A su vez y de forma complementaria, analizamos la expresión proteica de marcadores de mitosis como la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 (H3S10P) y la expresión de la proteína MAD2. La fosforilación en la serina 10 de la histona H3 es una modificación específica que se produce en la mitosis y que está relacionada con el estado de condensación de los cromosomas ²¹⁶. La proteína MAD2 forma parte del complejo del control mitótico (MCC) actuando como sensor de la falta de cohesión de los microtúbulos a los cinetocoros durante la fase mitótica del ciclo celular. Su inducción se asocia con la activación del SAC y, por tanto, con la parada en la mitosis ²¹⁷.

El análisis de expresión de H3S10P y MAD2 (Figura 19B) mostró una inducción de ambos marcadores de mitosis en las células PLC/PRF/5 y HeLa no sincronizadas a las 48 horas tras el silenciamiento de la expresión de SLU7.

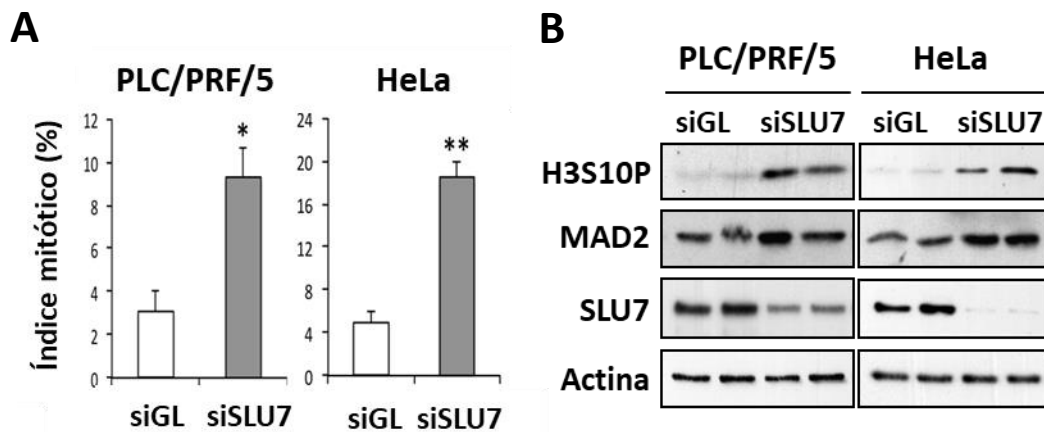


Figura 19. La disminución de la expresión de SLU7 promueve la parada en la fase M del ciclo celular. (A) El índice mitótico se calculó a las 48 h del silenciamiento de SLU7 en las células PLC/PRF/5 y HeLa sin sincronizar. Se midió la presencia de cromosomas condensados mediante la tinción con DAPI en más de 250 células por condición de cinco experimentos independientes realizados por duplicado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al control siGL). (B) *Western blot* representativo de los marcadores de mitosis Ser-10 fosforilada de la histona H3 (H3S10P) y MAD2 en dichas líneas celulares. Se muestra SLU7 como control del silenciamiento y actina como control de carga.

Con todo ello, estos resultados demuestran que las células transformadas dependen de la expresión de SLU7 para poder progresar en el ciclo celular, más concretamente para superar correctamente la fase mitótica.

2. EL SILENCIAMIENTO DE SLU7 EN LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS INDUCE ALTERACIONES MITÓTICAS

2.1. SLU7 es necesario para la correcta formación del huso acromático durante la mitosis

Continuamos describiendo los eventos que conducían a la parada en la mitosis de las células silenciadas de SLU7 (Figura 18 y 19). Analizamos por microscopía de fluorescencia el aspecto del DNA (tinción con DAPI) y del huso acromático (tinción con anti- α -tubulina) de las células PLC/PRF/5 control y a las 48 horas del silenciamiento de SLU7. Como se observa en la Figura 20, en las células siSLU7 además de un aumento del número de células en prometafase de acuerdo con la parada en mitosis, observamos numerosas figuras de metafases aberrantes que presentaban alteraciones evidentes en la organización de los cromosomas en la placa metafásica y en la polaridad del huso acromático.

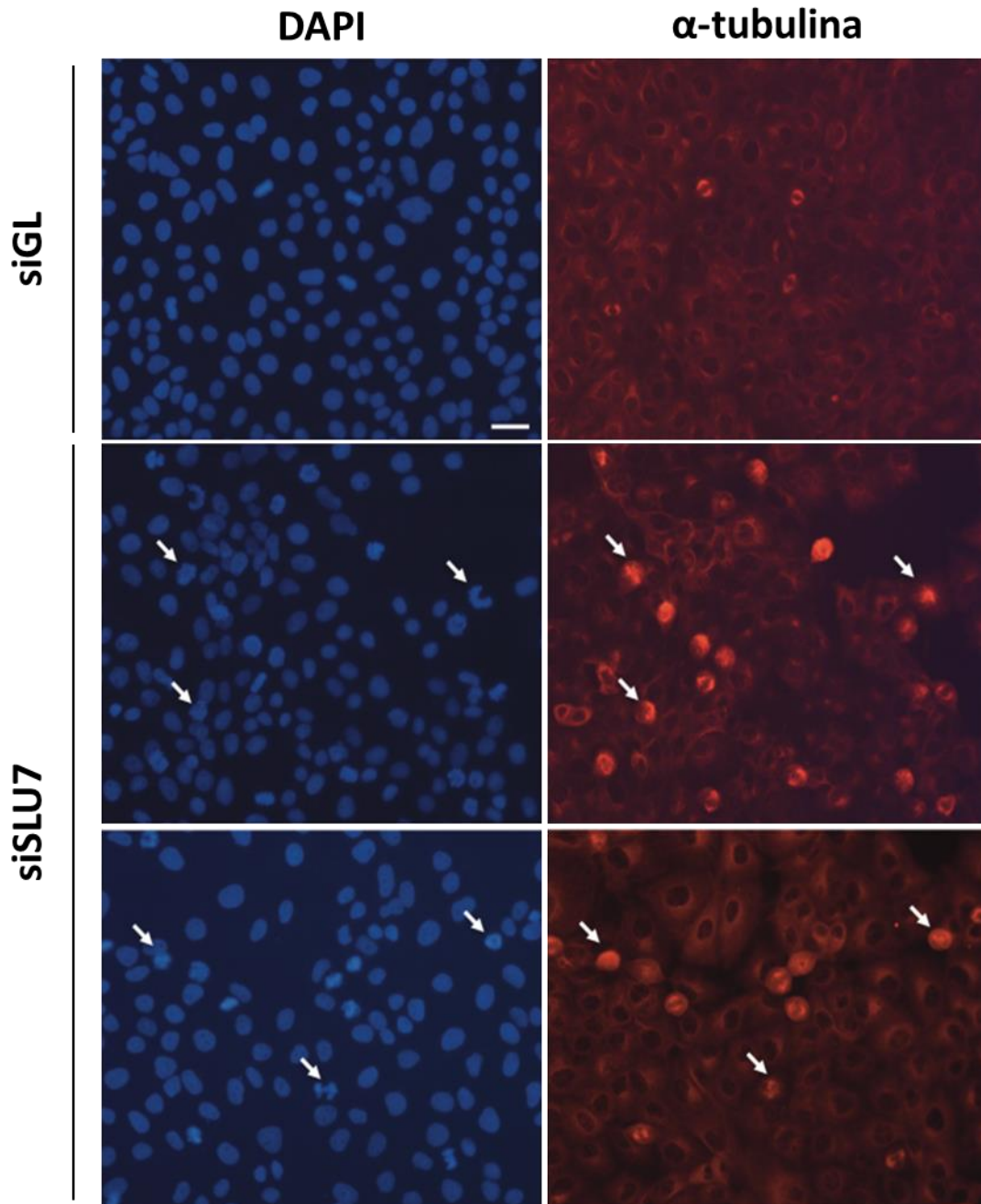


Figura 20. Las células silenciadas de SLU7 presentan anomalías durante la mitosis. Inmunofluorescencia de α -tubulina en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7. El DNA se tiñó con DAPI. Se observa una acumulación de células siSLU7 en prometafase o con metafases alteradas (indicadas con flechas). Barra de escala: 10 μ m.

Con el objetivo de caracterizar mejor las metafases de las células PLC/PRF/5 silenciadas de SLU7, se sincronizaron las células en mitosis tratándolas durante toda la noche con nocodazol y se fijaron a las dos horas tras la eliminación de la droga para aumentar de esta manera el número de células en metafase.

Las células control (siGL) mostraron metafases normales con los cromosomas alineados en la placa metafásica, una correcta polaridad de los microtúbulos y SLU7 localizado alrededor del DNA (Figura 21A). Al analizar las células transfectadas con el siRNA de SLU7, encontramos una población de células en la que la expresión de SLU7 no se vio modificada (Figura 21B) y que, al igual que las células control (siGL), presentaban metafases normales. Sin embargo, en aquellas células en las que la expresión de SLU7 estaba silenciada, los husos acromáticos perdieron su bipolaridad característica pasando a ser husos multipolares o monopolares y, en consecuencia, los cromosomas fueron incapaces de alinearse correctamente en la placa metafásica (Figura 21B).

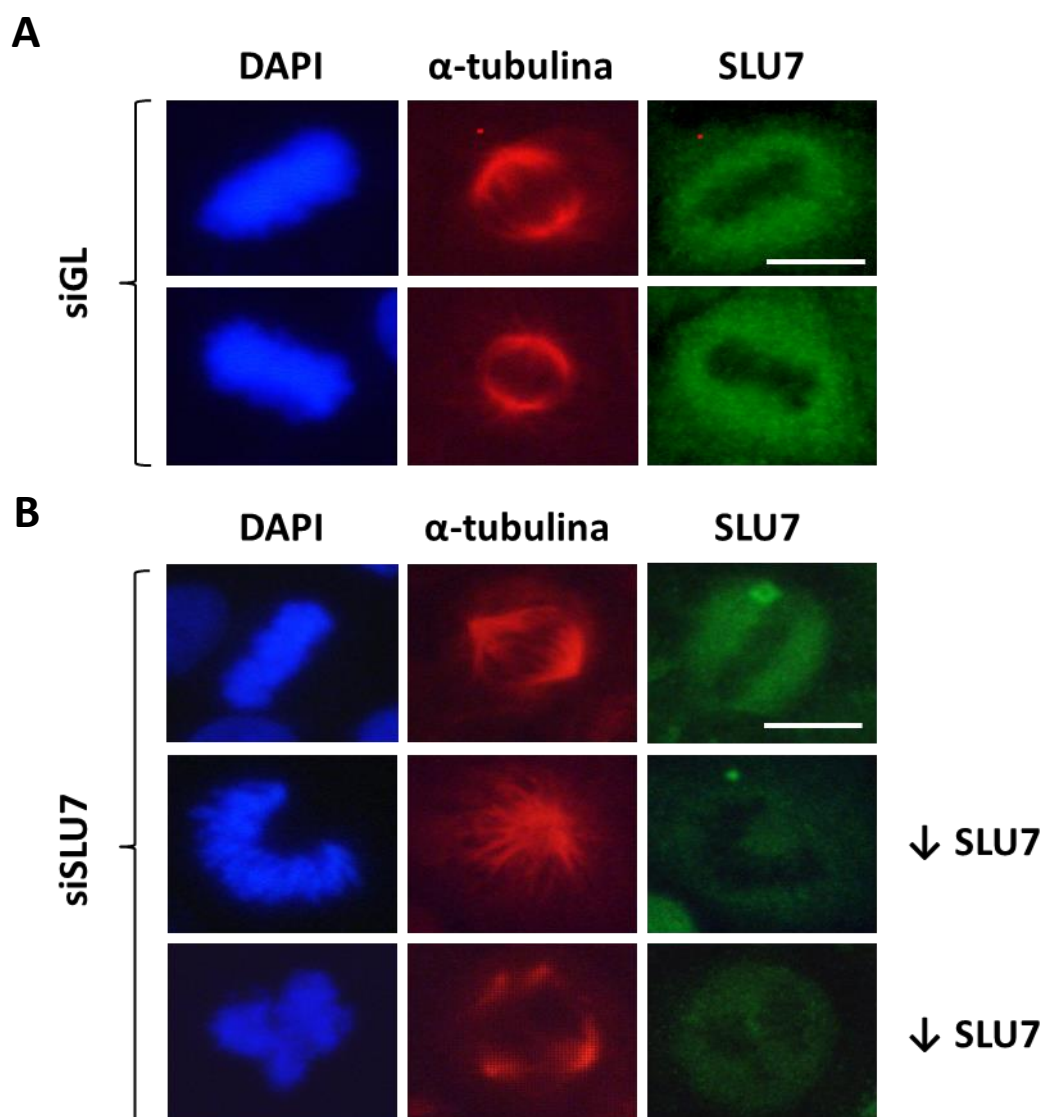


Figura 21. SLU7 es necesario para la correcta formación del huso acromático. Mediante inmunofluorescencia, se analizaron las metafases en las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la transfección con siGL (control) (A) o siSLU7 (B) y 2 h tras la eliminación del tratamiento con nocodazol durante toda la noche. La inmunodetección de SLU7 se muestra en verde, el huso acromático se visualizó en rojo con el anticuerpo anti- α -tubulina y el DNA en azul con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

Nuestros datos demuestran que durante la mitosis SLU7 es necesario para la adecuada alineación de los cromosomas en la placa metafásica y la formación del huso acromático, eventos fundamentales para la correcta distribución de los cromosomas entre las células hijas.

2.2. SLU7 asegura la correcta cohesión entre las cromátidas hermanas

La distribución equitativa de los cromosomas durante la mitosis depende de la organización de los microtúbulos en una disposición bipolar y de la unión estable de éstos al cinetocoro de ambas cromátidas hermanas²¹⁸. Tanto la unión bipolar como la tensión ejercida por los microtúbulos para la separación de las cromátidas a cada polo de la célula durante la anafase dependen, en gran medida, de la correcta cohesión entre las cromátidas hermanas (SCC)^{219,220}. En los últimos años, varios estudios han demostrado la importancia de mantener la integridad de los componentes del espliceosoma para asegurar la SCC¹²⁸. De acuerdo con ello, y en base a nuestros resultados, decidimos estudiar si SLU7 estaba también regulando la estabilidad de la SCC.

Para analizar esta hipótesis, realizamos ensayos de extensiones de cromosomas de células transformadas de distintos orígenes que fueron enriquecidas en mitosis tras el tratamiento durante 3 horas con nocodazol.

A las 48 horas de la transfección con el siRNA control (siGL), observamos que las mitosis de las células PLC/PRF/5, HeLa y H358 presentaban cromosomas con la morfología típica y característica en X (Figura 22). Sin embargo, en las tres líneas celulares, el silenciamiento de SLU7 indujo un aumento muy significativo en el número de mitosis con alteraciones en la unión entre las cromátidas hermanas, ya que éstas aparecían enfrentadas de forma paralela o aisladas la una de la otra (Figura 22).

Estos resultados muestran que SLU7 regula la cohesión entre las cromátidas hermanas, ya que la reducción de su expresión conduce a una separación prematura de ambas cromátidas, además de a defectos en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica y en la formación del huso acromático.

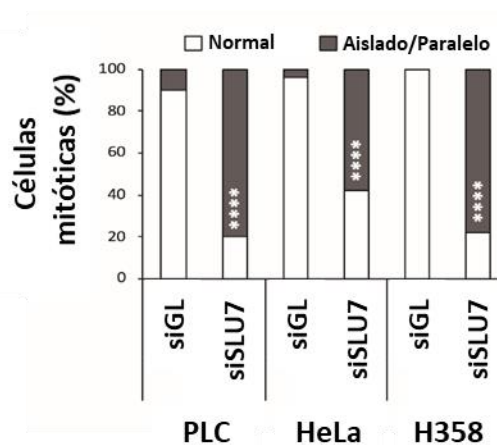
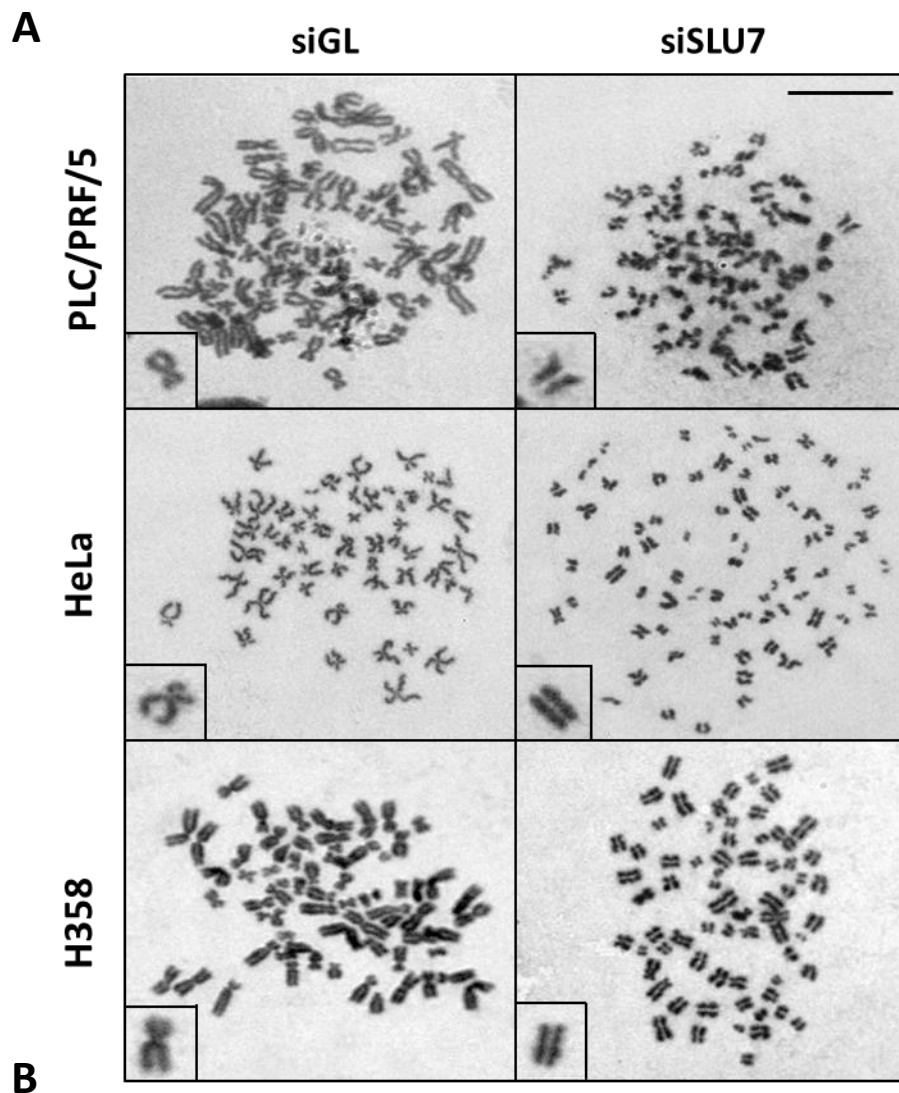


Figura 22. SLU7 es necesario para la correcta cohesión entre las cromátidas hermanas. (A) Imágenes representativas de extensiones de cromosomas en metafase de las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7 y 3 h del tratamiento con nocodazol. Se muestra aumentado un ejemplo de la morfología de los cromosomas en cada imagen. Barra de escala: 10 μ m. (B) Cuantificación del porcentaje de células mitóticas que presentan cromosomas normales o alterados (aislado/paralelo) en las extensiones de cromosomas del apartado A (**** p <0,0001 respecto al control).

2.3. Implicación de SLU7 en el *splicing* de *sororina*

La aberración en la SCC durante la mitosis podría ser una consecuencia de la alteración de la expresión de proteínas esenciales para esta unión. Cabe destacar que numerosos trabajos recientes han demostrado que una de estas proteínas, *sororina*, es especialmente sensible a las alteraciones en el *splicing*¹²⁸. *Sororina* es una proteína fundamental para estabilizar la asociación del complejo de cohesión al DNA duplicado manteniendo las cromátidas hermanas unidas hasta la división celular²²¹. Recientemente, distintos factores de *splicing* se han descrito implicados en la regulación del procesamiento del pre-mRNA de *sororina*. Es el caso del complejo PRP19^{123,124}, UBL5¹²⁵ o SNW1¹²⁶ los cuales garantizan el correcto *splicing* de *sororina*. La alteración del *splicing* de *sororina* ocurre por la retención del intrón 1 o del intrón 1 y 2 en su mRNA, incorporando en ambos casos un codón de terminación prematuro (PTC) en el exón 3 o en el propio intrón 2 (Figura 23)¹²³.

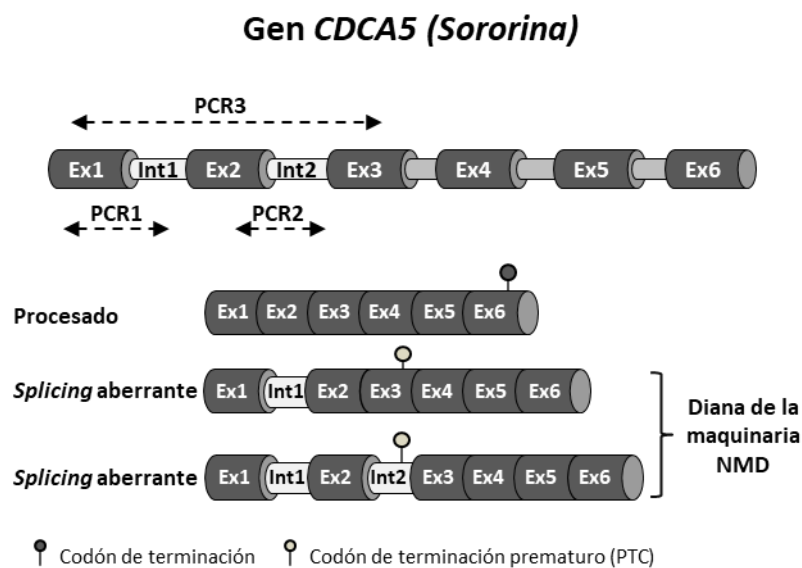


Figura 23. Representación esquemática del proceso de *splicing* de *sororina*. Se muestra el transcrito generado por el *splicing* correcto del gen de *sororina* (*CDCA5*) (procesado) y los generados a partir del *splicing* aberrante que resulta de la retención de los intrones 1 y 2 (no procesado). Se indican las PCRs realizadas para el análisis de la retención del intrón 1 (PCR1) o intrón 2 (PCR2), así como, para la detección simultánea del transcrito procesado y los no procesados (PCR3).

De acuerdo con ello, decidimos estudiar si el *splicing* de *sororina* estaba modulado por SLU7.

Para ello, utilizamos cebadores localizados en el exón 1 y 3 del pre-mRNA de *sororina* (PCR3 en la Figura 23), que por la diferencia de tamaño de los fragmentos amplificados permiten detectar y distinguir tanto la isoforma natural como las aberrantes. Como se observa en la Figura 24, en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358, el silenciamiento de la expresión de SLU7 indujo una alteración en el procesamiento del pre-mRNA de *sororina* al observarse un aumento de la expresión de las isoformas aberrantes como resultado de la retención de los intrones 1 y 2.

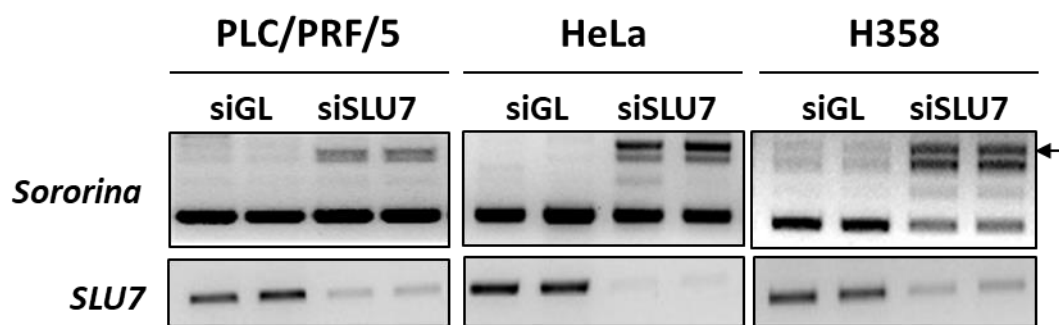


Figura 24. SLU7 es necesario para el correcto *splicing* de *sororina*. Análisis de los transcritos de *sororina* mediante la PCR3 (Figura 23) en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7. La flecha indica la incorporación aberrante del intrón 1 y 2. En el panel inferior se muestra una PCR representativa del silenciamiento de SLU7.

La especificidad de estos resultados fue validada utilizando los dos siRNAs independientes para SLU7 en las tres líneas celulares (Figura 25A). De acuerdo con estos resultados, el análisis de expresión mediante PCR a tiempo real, utilizando cebadores específicos para detectar la retención del intrón 1 (PCR1 en la Figura 23) o del intrón 2 (PCR2 en la Figura 23) confirmaron un aumento significativo de la incorporación de ambos intrones en el mRNA de *sororina* en las células PLC/PRF/5 tras el silenciamiento de SLU7 con ambos siRNAs (Figura 25B).

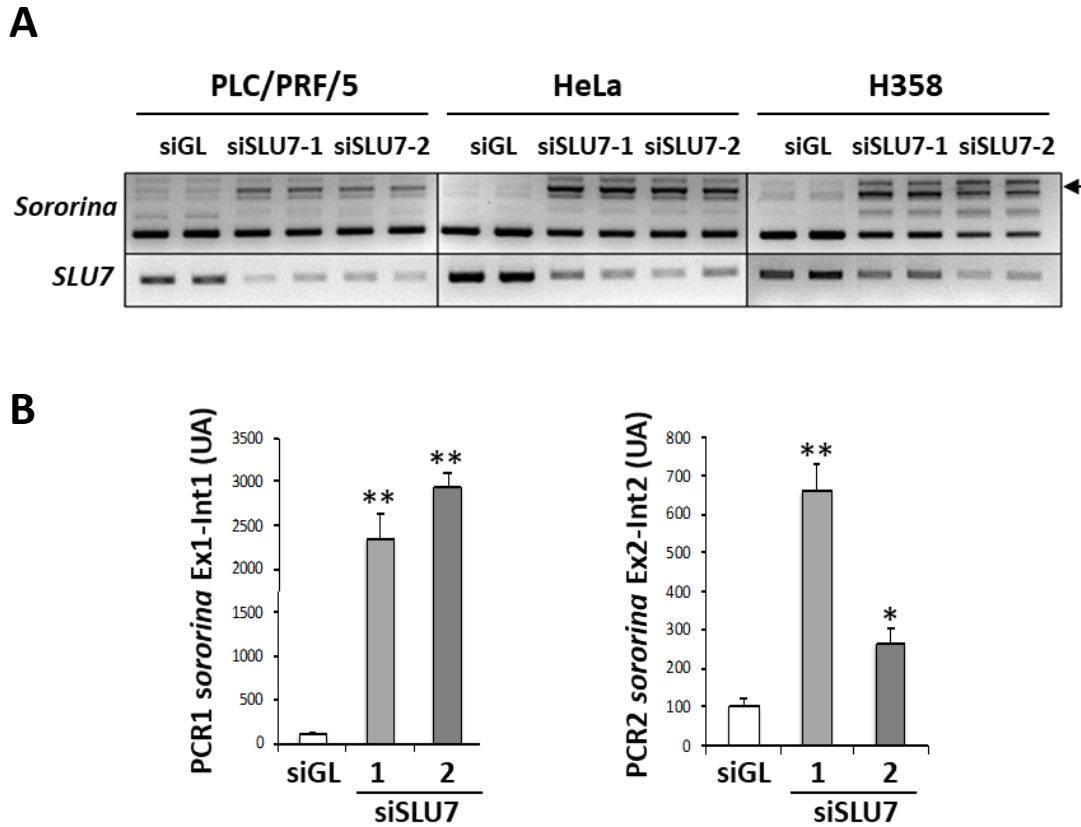


Figura 25. El silenciamiento de SLU7 induce el *splicing* aberrante de *sororina*. (A) Análisis de los transcritos de *sororina* mediante la PCR3 (Figura 23) en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con dos siRNAs independientes de SLU7 (siSLU7-1 y siSLU7-2). La flecha indica la incorporación aberrante de los intrones 1 y 2. En el panel inferior se muestra la PCR de *SLU7* de las muestras del panel superior. (B) Análisis mediante PCR a tiempo real de la incorporación del intrón 1 (PCR1, Figura 23) y 2 (PCR2, Figura 23) en el mRNA de *sororina* en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con los dos siRNAs específicos de SLU7 (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control siGL). UA: unidades arbitrarias.

De acuerdo con los resultados mostrados en relación con la alteración del *splicing* de *sororina* tras el silenciamiento de la expresión de SLU7, se observó una reducción significativa en sus niveles proteicos en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HeLa (Figura 26).

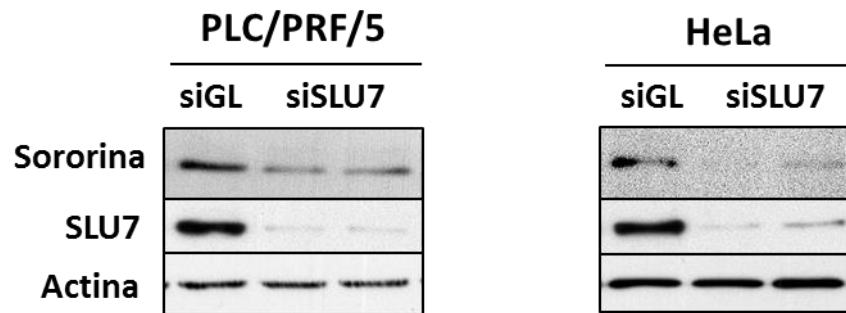


Figura 26. SLU7 es necesario para la correcta expresión de sororina. Análisis por *Western blot* de sororina en las células PLC/PRF/5 y HeLa a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7. Se muestra un *Western blot* de SLU7 como control del silenciamiento y de actina como control de carga.

A continuación, decidimos confirmar la relevancia de la falta de sororina en la pérdida de cohesión de las cromátidas hermanas observada tras el silenciamiento de la expresión de SLU7 (Figura 22). La función de sororina durante este proceso es inhibir a la proteína WAPL, que es la responsable de la disociación del complejo de cohesinas del DNA. En este sentido, la participación de sororina durante la cohesión de las cromátidas hermanas sólo es relevante en presencia de WAPL ⁶⁷.

De acuerdo con ello, analizamos el efecto del silenciamiento de la expresión de SLU7 sobre la cohesión de las cromátidas hermanas en ausencia de WAPL. Para ello, silenciamos simultáneamente mediante siRNAs la expresión de SLU7 y de WAPL (Figura 27A).

Como se muestra en la Figura 27B, en las células doblemente silenciadas (siSLU7+siWAPL) se observaron los mismos defectos en el *splicing* de *sororina* a los observados en las células siSLU7. Sin embargo, los errores en el *splicing* de *sororina* en estas células doblemente silenciadas (siSLU7+siWAPL) no promovieron la pérdida de la SCC (Figura 27C), como era de esperar en ausencia de WAPL. Estos datos confirman el papel de sororina en la alteración de la SCC observada al silenciar la expresión de SLU7.

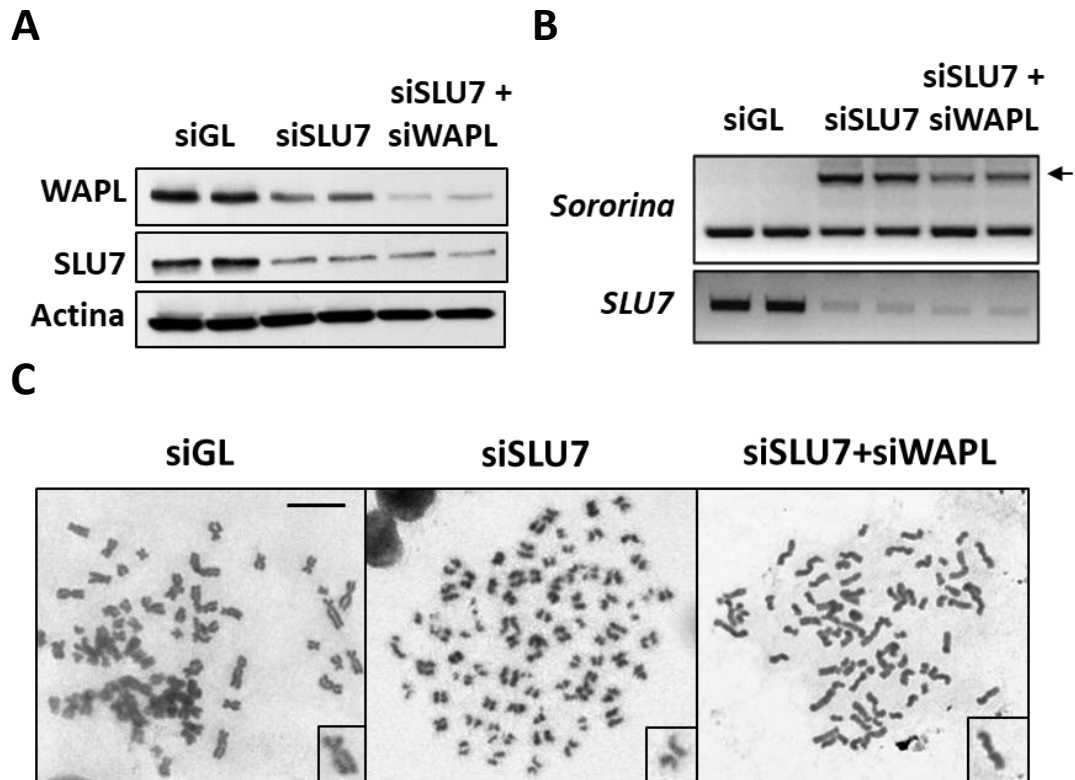


Figura 27. El silenciamiento de WAPL recupera la falta de cohesión de las cromátidas hermanas inducida al silenciar SLU7. (A) Análisis por *Western blot* de la expresión de WAPL, SLU7 y actina, como control de carga, en las células PLC/PREF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siWAPL. (B) Análisis de los transcritos de *sororina* mediante la PCR3 (Figura 23) en las mismas células citadas en el apartado A. La flecha indica la incorporación aberrante de los intrones 1 y 2. (C) Imágenes de extensión de cromosomas en metafase de las células PLC/PREF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siWAPL y 3 h de tratamiento con nocadazol. Se muestra aumentado un ejemplo de la morfología de los cromosomas en cada imagen. Barra de escala: 10 μ m.

En resumen, nuestros datos muestran que las células transformadas son estrictamente dependientes de la expresión de SLU7 para su supervivencia y que la muerte por apoptosis observada al inhibir la expresión de SLU7²⁰² viene precedida por la parada de las células en la mitosis. Hemos demostrado que SLU7 es necesario para asegurar el correcto *splicing* y expresión de *sororina* y la cohesión de las cromátidas hermanas, pasos fundamentales para asegurar la adecuada segregación de los cromosomas a las células hijas durante la mitosis. Desde un punto de vista más global, estos resultados demuestran que SLU7 contribuye a la estabilidad genómica.

3. SLU7 ES NECESARIO PARA EVITAR LA INESTABILIDAD GENÓMICA ASOCIADA A LA TRANSCRIPCIÓN

3.1. El silenciamiento de SLU7 induce la acumulación de híbridos RNA:DNA (R-loops) y daño en el DNA

La parada en la fase G2/M del ciclo celular se ha asociado también con la expresión alterada de otros factores de *splicing*, siendo provocada por mecanismos independientes de la regulación del *splicing*. Este es el caso del factor de *splicing* rico en serina y arginina 1, SRSF1²²². Los autores describen que la parada en G2/M observada al silenciar SRSF1²²² está asociada a la presencia de daño en el DNA y a la formación de híbridos RNA:DNA o bucles R (R-loops)¹¹¹. Estas estructuras se forman de manera natural durante la transcripción como consecuencia de la hibridación del RNA sintetizado con la hebra molde de DNA, dejando la hebra de DNA que no se transcribe más expuesta a la inducción de roturas. Así pues, el aumento o la acumulación de R-loops durante la transcripción representa un mecanismo de inducción de inestabilidad genómica mediante el incremento de la fijación de mutaciones o de eventos de recombinación, además de la inducción de estrés replicativo al impedir la progresión de la maquinaria de replicación^{17,23,26,38}.

Nuestros datos mostraron que el silenciamiento de SLU7 indujo daño en el DNA en las células transformadas evidenciado por el aumento de la fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX) (Figura 28) confirmando los datos ya publicados por nuestro grupo²⁰². Así mismo, como hemos comentado más arriba, estas células fueron incapaces de progresar en el ciclo celular permaneciendo paradas en mitosis (Figura 18 y 19). Por todo ello, decidimos estudiar si el silenciamiento de la expresión de SLU7 era responsable de la inducción de R-loops y, por tanto, provocaba también inestabilidad genómica asociada a la transcripción.

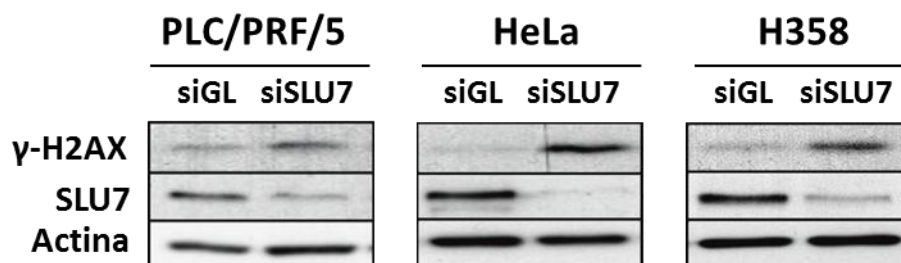


Figura 28. SLU7 protege del daño en el DNA en las células transformadas. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de H2AX fosforilada (γ -H2AX), de SLU7 como control del silenciamiento y de actina como control de carga en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7.

Para estudiar esta hipótesis, realizamos varios análisis con el objetivo de detectar por diferentes métodos la formación de R-loops ²¹². Varios de estos ensayos se basaron en el uso del anticuerpo S9.6 que reconoce la presencia de los híbridos de RNA:DNA.

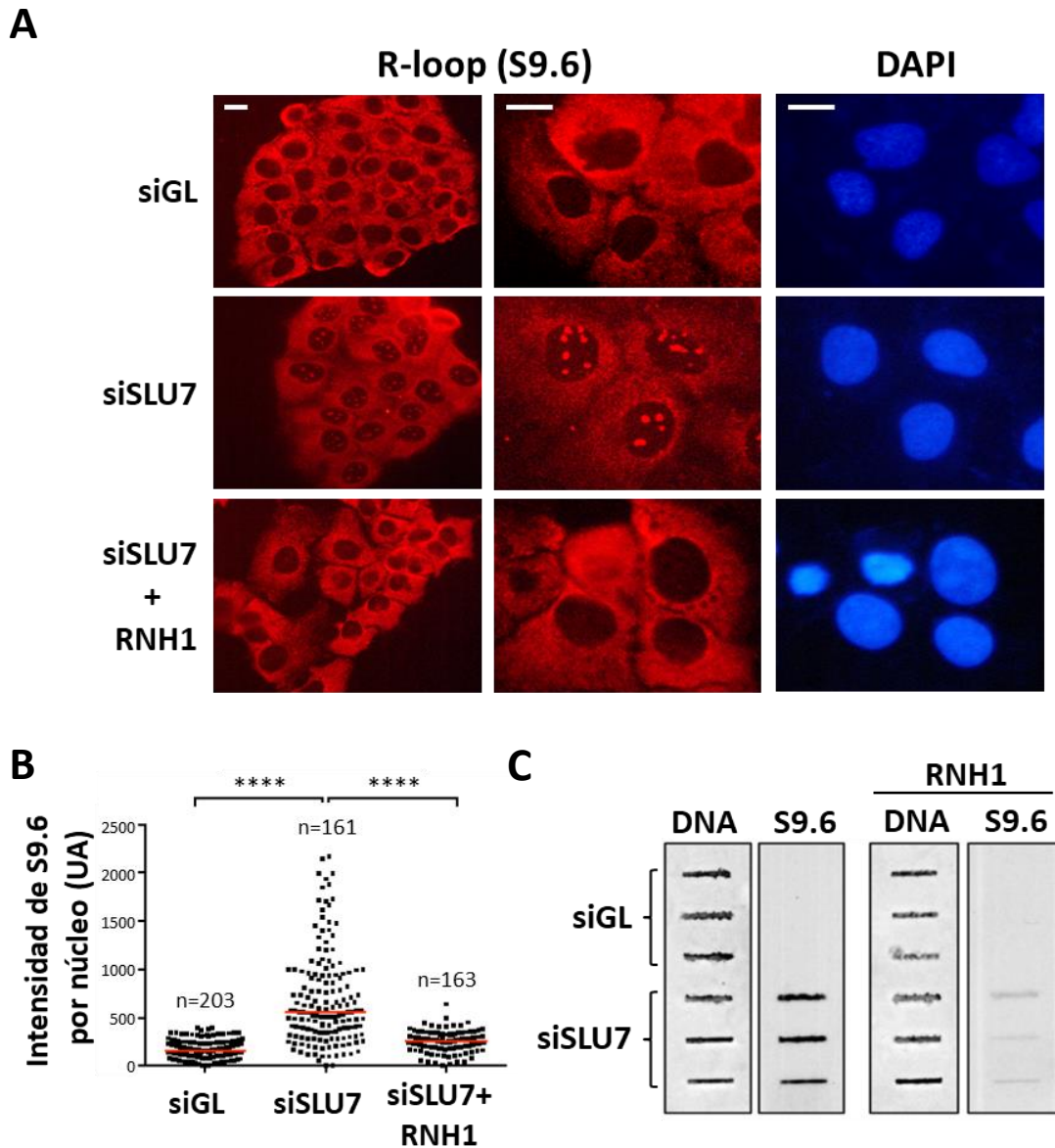


Figura 29. SLU7 protege de la formación de R-loops. (A) Inmunofluorescencia para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 (rojo) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+RNH1 (RNasa H1). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m. (B) Cuantificación de la intensidad de S9.6 en los núcleos de las células del apartado A mediante el programa ImageJ. La señal de DAPI se utilizó para crear una máscara del núcleo. Se indica el número de núcleos cuantificados por condición. Las barras rojas hacen referencia a la mediana de intensidad de S9.6 por condición (**** p <0,0001, Test U de Mann-Whitney). (C) *Slot blot* para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 en el DNA genómico de las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la transfección con siGL y siSLU7. El panel de la derecha muestra el análisis del mismo DNA genómico tras el tratamiento con la enzima RNasa H1 (RNH1) para la degradación de los R-loops. El DNA se tiñó con azul de metileno como control de carga.

Como se observa en la Figura 29A y B, el análisis por inmunofluorescencia reveló una acumulación significativa de R-loops en los núcleos de las células PLC/PRF/5 a las 48 horas tras el silenciamiento de SLU7. Esta acumulación se confirmó utilizando el mismo anticuerpo en un ensayo de *slot-blot* (Figura 29C).

Los R-loops se resuelven por la actividad de la enzima RNasa H1 (RNH1) que específicamente degrada el RNA unido al DNA ³⁸. Con el objetivo de demostrar la especificidad en la detección de los R-loops en nuestros ensayos, transfectamos las células PLC/PRF/5 con el siSLU7 y con un plásmido de sobreexpresión de la RNH1. Como se observa en la Figura 29, la sobreexpresión de RNH1 es suficiente para resolver la acumulación de los R-loops observada en las células siSLU7.

Estos mismos resultados se observaron cuando se silenció la expresión de SLU7 en la línea celular HeLa (Figura 30), demostrando el importante papel de SLU7 en la prevención de la formación de R-loops.

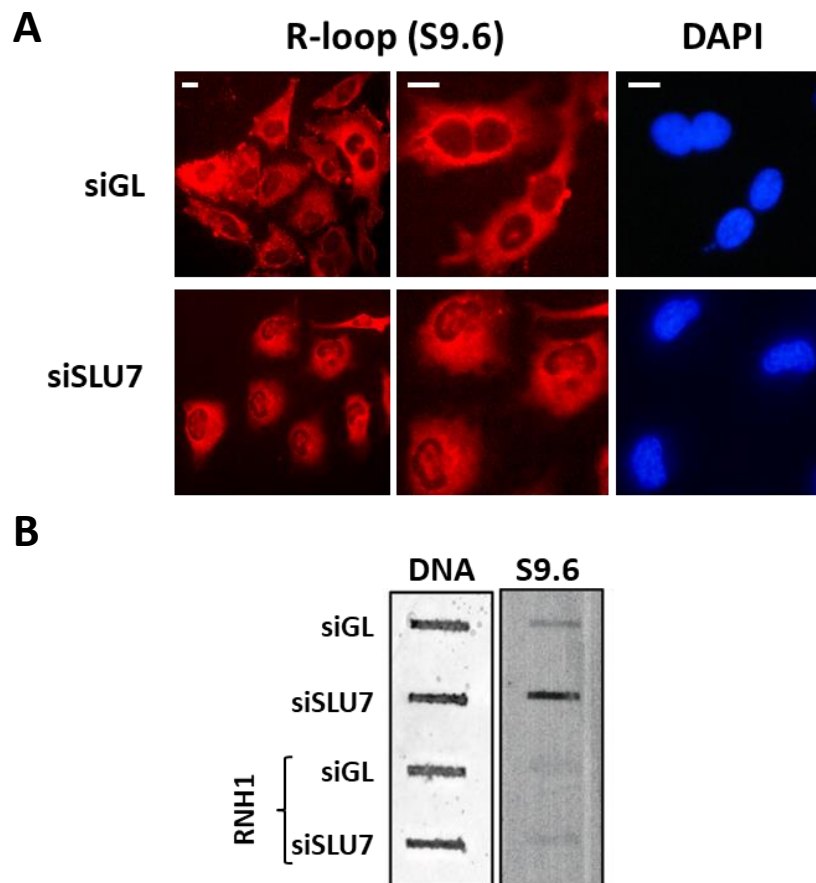


Figura 30. SLU7 protege de la formación de R-loops en la línea celular transformada HeLa. (A) Inmunofluorescencia para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 (rojo) en las células HeLa a las 48 h tras la transfección con siGL (control) o siSLU7. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m. (B) *Slot blot* para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 en el DNA genómico de las células HeLa a las 48 h tras la transfección con siGL (control) o siSLU7. Como control en la detección de los R-loops, se realizó un tratamiento con la enzima RNasa H1 (RNH1) en estas muestras. El panel de la izquierda muestra el DNA teñido con azul de metileno como control de carga.

La proteína de replicación A fosforilada (RPA32-pS33) actúa como sensor del daño en el DNA uniéndose a la hebra de cadena sencilla del DNA para mediar en la respuesta reparadora ^{41,223}. Recientemente, se ha demostrado que RPA también puede actuar como un sensor de los R-loops al unirse a la hebra de DNA que no se transcribe regulando además, la actividad de la RNH1 ⁴¹. Por todo ello, decidimos detectar mediante inmunofluorescencia la presencia de RPA32-pS33 en nuestras células.

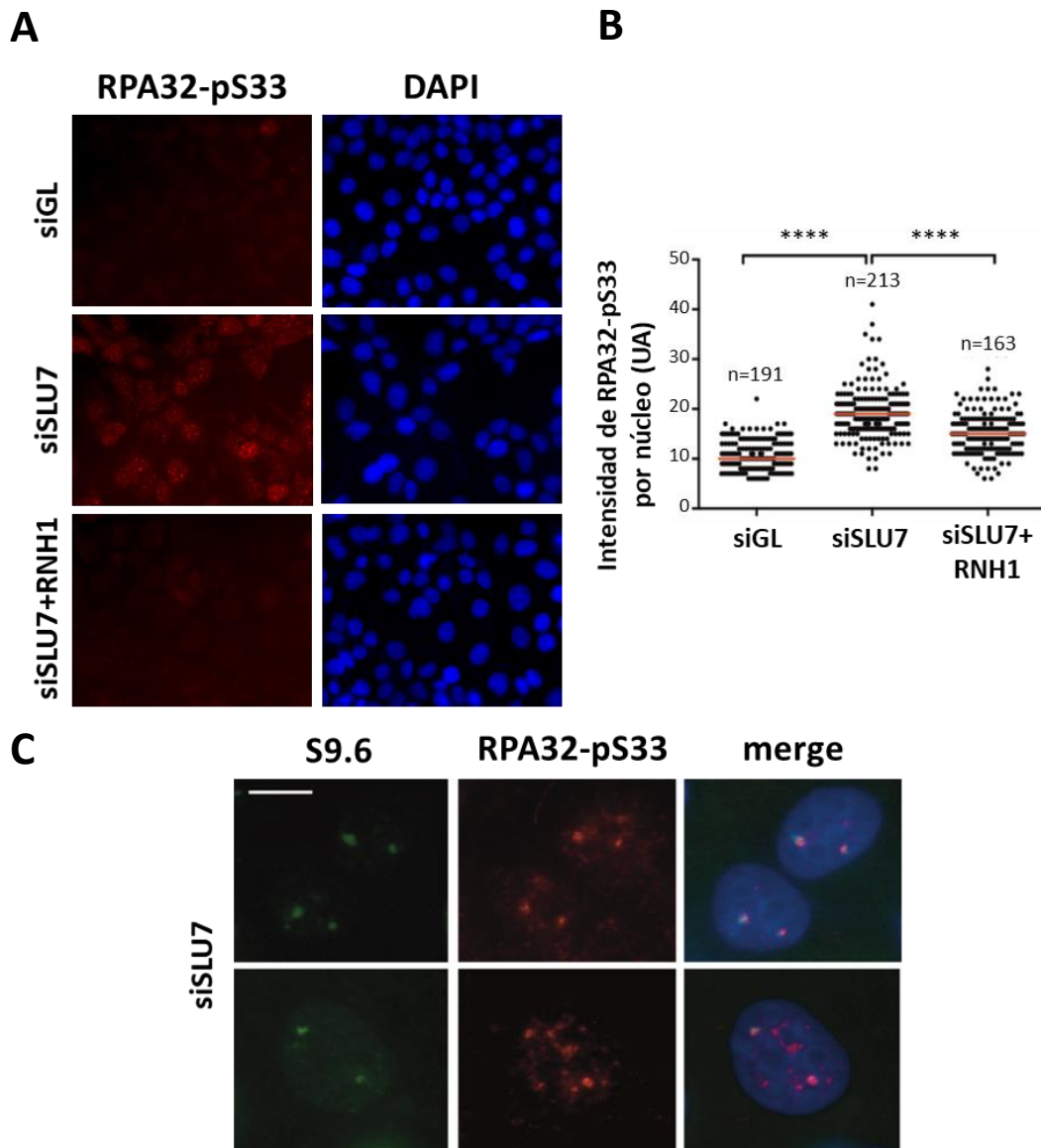


Figura 31. La proteína RPA se acumula en el núcleo de las células silenciadas de SLU7. (A) Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-RPA32-pS33 (rojo) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+RNH1, el plásmido de sobreexpresión de RNasa H1. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m. (B) Cuantificación de la intensidad de RPA32-pS33 en los núcleos de las células mediante el programa *ImageJ*. La señal de DAPI se utilizó para crear una máscara del núcleo. Se indica el número de núcleos cuantificados por condición. Las barras rojas hacen referencia a la mediana de la intensidad de RPA32-pS33 por condición (**** p <0,0001, Test U de Mann-Whitney). (C) Co-inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-RPA32-pS33 (rojo) y S9.6 (verde) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siSLU7. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m.

Como se observa en las Figura 31A y B, las células PLC/PRF/5 silenciadas de SLU7 presentaron un aumento de RPA32-pS33 en el núcleo de acuerdo con la presencia de R-loops y daño en el DNA, que disminuyó significativamente cuando las células fueron co-transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de la RNH1. Así mismo, y de acuerdo con los datos publicados ⁴¹, nuestros resultados mostraron una co-localización de RPA32-pS33 en los R-loops (Figura 31C).

Por último, decidimos estudiar la presencia de R-loops en la región 3'UTR del gen de β -actina ²¹¹ mediante una modificación de la técnica de detección de huellas tras el tratamiento con bisulfito del DNA no desnaturalizado (*non-denaturing bisulfite footprinting*) ²¹² y la posterior PCR anidada. Tras la desnaturalización del DNA, el tratamiento con bisulfito convierte las citosinas a uracilos en las cadenas sencillas del DNA. Por ello, si el DNA no es desnaturalizado esta conversión sólo se realizará en las citosinas presentes en las cadenas de DNA libre asociadas a los R-loops.

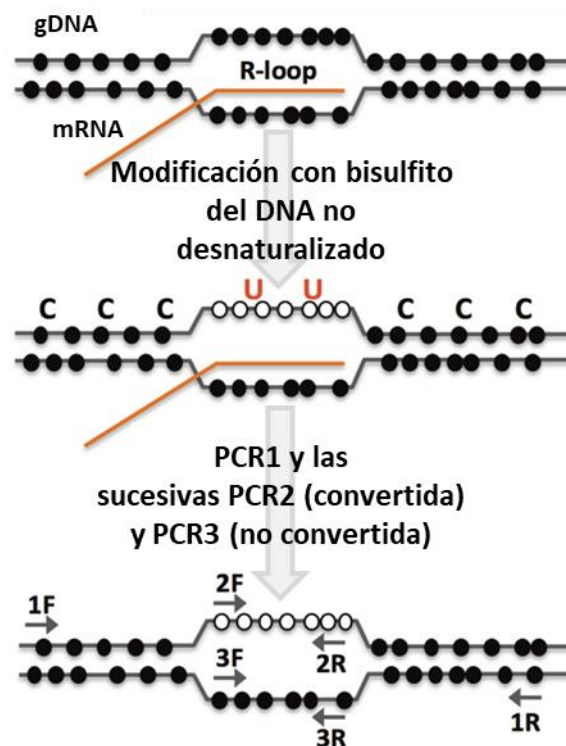


Figura 32. Representación esquemática de la técnica de detección de R-loops mediante PCR tras la conversión con bisulfito del DNA no desnaturalizado. El tratamiento con bisulfito del DNA no desnaturalizado convierte los residuos de citosinas (C) a uracilos (U) sólo en la hebra de DNA expuesta en el R-loop. Se muestra la posición de los cebadores diseñados para detectar la presencia de R-loops en la región 3'UTR del gen de la β -actina. La PCR1 se realizó utilizando los cebadores F1 y R1 externos al R-loop. La PCR2 anidada se realizó con los cebadores convertidos F2 y R2 para detectar de forma específica los R-loops y la PCR3 anidada se realizó con los cebadores F3 y R3.

El gDNA no desnaturalizado de las células PLC/PRF/5 siGL (control) y siSLU7 se sometió a un tratamiento con bisulfito. La primera PCR (PCR1) se realizó utilizando una pareja de cebadores (F1 y R1) que flanquean la región del R-loop descrito en el gen de β -actina²¹¹ (Figura 32). A continuación, se realizaron dos PCRs anidadas (PCR2 y PCR3) utilizando como molde el producto resultante de la PCR1 y cebadores localizados dentro del R-loop (Figura 32). En concreto, para la PCR3 (secuencia no convertida) se utilizaron los cebadores descritos para la detección de los R-loops tras técnicas de inmunoprecipitación con el anticuerpo S9.6²¹¹. Para la PCR2, en cambio, se diseñaron los mismos cebadores pero con la secuencia convertida, es decir, con las citosinas cambiadas a timinas. De esta forma, estos últimos cebadores permiten reconocer de forma específica la cadena de DNA convertida que queda libre en el híbrido de RNA:DNA, por lo que la PCR2 sólo será positiva en aquellas condiciones en las cuales haya R-loops. Sin embargo, la PCR1 y la PCR3 serán positivas en todas las condiciones.

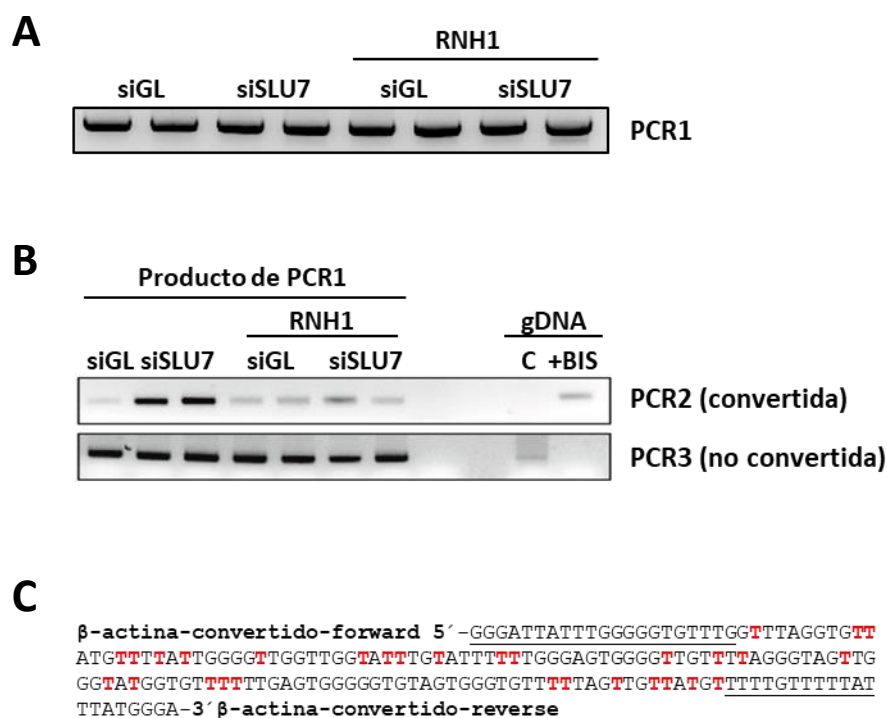


Figura 33. Detección de R-loops mediante la técnica de PCR sobre DNA no desnaturalizado convertido con bisulfito. El gDNA no desnaturalizado de las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7 se sometió en primer lugar a un tratamiento con bisulfito y después al tratamiento con la enzima RNH1 (siGL/siSLU7+RNH1). (A) Amplificación con la PCR1 (Figura 32) de la región 3'UTR del gen β -actina en las muestras de gDNA tras el tratamiento con bisulfito. (B) PCRs anidadas PCR2 y PCR3 (Figura 32). El DNA genómico desnaturalizado sin convertir se utilizó como control negativo (C) para la PCR2 y positivo para la PCR3. El DNA desnaturalizado y convertido (BIS) se utilizó como control positivo para la PCR2 y negativo para la PCR3. (C) Secuencia del producto de la PCR2 obtenido en las muestras siSLU7 mostrando la conversión de las C a T (rojo), indicando la presencia de R-loop. La localización de los cebadores utilizados en la PCR2 se muestra subrayada.

Como se observa en la Figura 33, la PCR1 (Figura 33A) y la PCR3 (Figura 33B) fueron positivas en todas las muestras, pero la PCR2 (Figura 33B) sólo fue positiva en las muestras siSLU7. Al igual que en los resultados anteriores, el tratamiento previo del DNA con la enzima RNH1 redujo claramente la señal de la PCR2 (Figura 33B). El producto obtenido de la PCR2 fue secuenciado para confirmar la conversión de las citosinas y, por tanto, la presencia de R-loops en esa región (Figura 33C). Estos resultados confirmaron la presencia de R-loops en la región 3'UTR del gen de β -actina tras el silenciamiento de SLU7.

A continuación, decidimos estudiar si la inducción de daño en el DNA observada al silenciar SLU7 (Figura 28) estaba asociada a la presencia de los R-loops. Para ello, analizamos la expresión de γ -H2AX en las células PLC/PRF/5 a las 48 horas tras la transfección con el siGL (control) o siSLU7 y en presencia del plásmido de sobreexpresión de la RNH1 o del plásmido control (pcDNA3) (Figura 34). Como se observa en la Figura 34, el daño en el DNA (γ -H2AX) disminuyó cuando se redujo la presencia de los R-loops por la actividad de la RNH1.

En su conjunto, estos datos indican que el daño en el DNA inducido al silenciar SLU7 depende en gran medida de la acumulación de los R-loops.

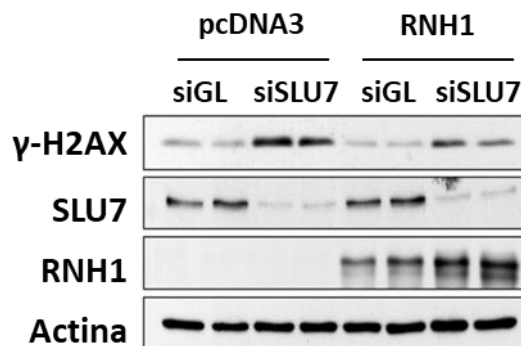


Figura 34. La inducción del daño en el DNA tras el silenciamiento de SLU7 está asociada a la formación de los R-loops. Análisis por *Western blot* de la expresión de H2AX fosforilada (γ -H2AX), SLU7, RNasa H1 (RNH1) y actina como control de carga, en las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la co-transfección de siGL (control) o siSLU7 con el plásmido control (pcDNA3) o el plásmido de sobreexpresión de RNasa H1 (RNH1).

Con todo ello, nuestros datos muestran que SLU7 juega un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica asociada a la transcripción, ya que evita la formación de R-loops y el consecuente daño en el DNA.

Por ello, llegados a este punto, nos planteamos si este papel protector de SLU7 era también relevante en líneas celulares no tumorigénicas como las HepaRG. Las imágenes de inmunofluorescencia revelaron una acumulación discreta de R-loops en los núcleos de las células HepaRG silenciadas de SLU7 (Figura 35A) que se acompañaba de la inducción de daño en el DNA (Figura 35B).

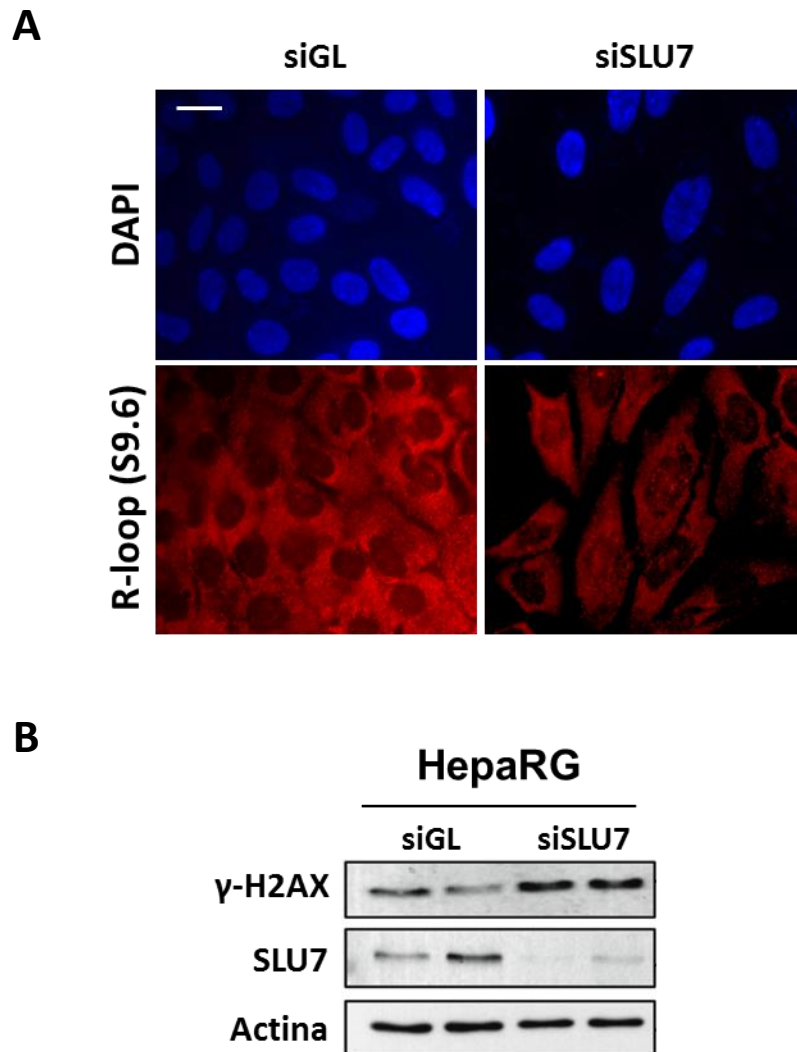


Figura 35. SLU7 previene la formación de R-loops y el daño en el DNA en la línea no tumorigénica HepaRG. (A) Inmunofluorescencia para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 (rojo) en las células HepaRG tras 48 h de transfección con siGL (control) o siSLU7. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala 10 μ m. (B) Análisis de *Western blot* de H2AX fosforilada (γ -H2AX) en las mismas células. Se muestra la detección de SLU7 como control del silenciamiento y la de actina como control de carga.

Estos datos indican que SLU7 desempeña un importante papel general en la inhibición de la formación de R-loops y, por lo tanto, en el mantenimiento de la integridad genómica.

3.2. Implicación de SLU7 en el *splicing* de *SRSF1* y *SRSF3*

Los datos mostrados hasta el momento indican que SLU7 impide la formación de R-loops durante la transcripción (Figura 29). Esta función preventiva la podría realizar de una manera directa o mediante la regulación de otros factores. En este sentido, se ha descrito que las proteínas SRSF1 y SRSF3 tienen un papel relevante en la prevención de la formación de los híbridos RNA:DNA ¹¹¹. Anteriormente, nuestro grupo demostró que SLU7 regula el *splicing* y la expresión de SRSF3 ¹⁸⁹ y, a su vez, se ha demostrado que SRSF3 regula la expresión de SRSF1 ²²⁴. Por todo ello, decidimos explorar el papel de SRSF1 y SRSF3 en el fenotipo asociado al silenciamiento de la expresión de SLU7.

En primer lugar, analizamos el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre el *splicing* de *SRSF3* y *SRSF1*. Para ello, diseñamos distintas combinaciones de cebadores para detectar las isoformas derivadas de cada gen (Figura 36).

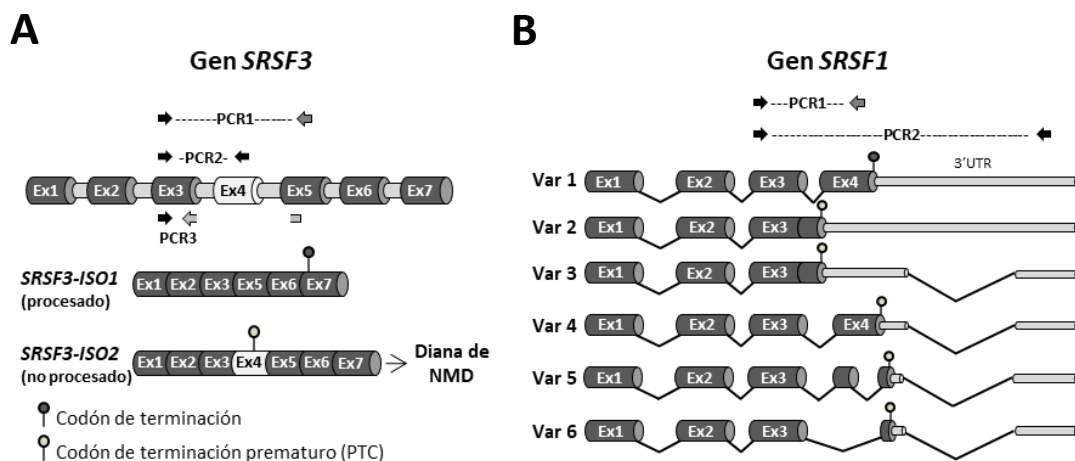


Figura 36. Representación esquemática del proceso de *splicing* de *SRSF3* y *SRSF1*. (A) Se muestra las variantes generadas a partir del gen de *SRSF3*. Se indica la localización de los cebadores para la detección por PCR de la isoforma 1 (*SRSF3-ISO1*) (PCR1 y PCR3) y la isoforma alternativa (*SRSF3-ISO2*) (PCR1 y PCR2). (B) Se muestra las variantes generadas a partir del gen de *SRSF1*. Se indican las PCRs realizadas para la detección de las distintas variantes (Var 1-6) de *SRSF1*.

Como se muestra en la Figura 37A y de acuerdo con nuestros datos publicados, el silenciamiento de SLU7 en la línea de hepatocarcinoma PLC/PRF/5 resultó en la alteración del procesamiento normal del pre-mRNA de *SRSF3* incorporando de forma aberrante el exón 4 y, como consecuencia, generando la isoforma alternativa de *SRSF3* (*SRSF3-ISO2*) (Figura 36A). Este mismo efecto se observó al silenciar la expresión de SLU7 en líneas celulares transformadas de otros orígenes como HeLa y H358 (Figura 37A). Estos resultados fueron corroborados en las tres líneas celulares mediante una PCR específica de *SRSF3-ISO2* (PCR2 en la Figura 36A) tras el silenciamiento de la expresión de SLU7 con dos siRNAs diferentes (siSLU7-1 y siSLU7-2) (Figura 37B).

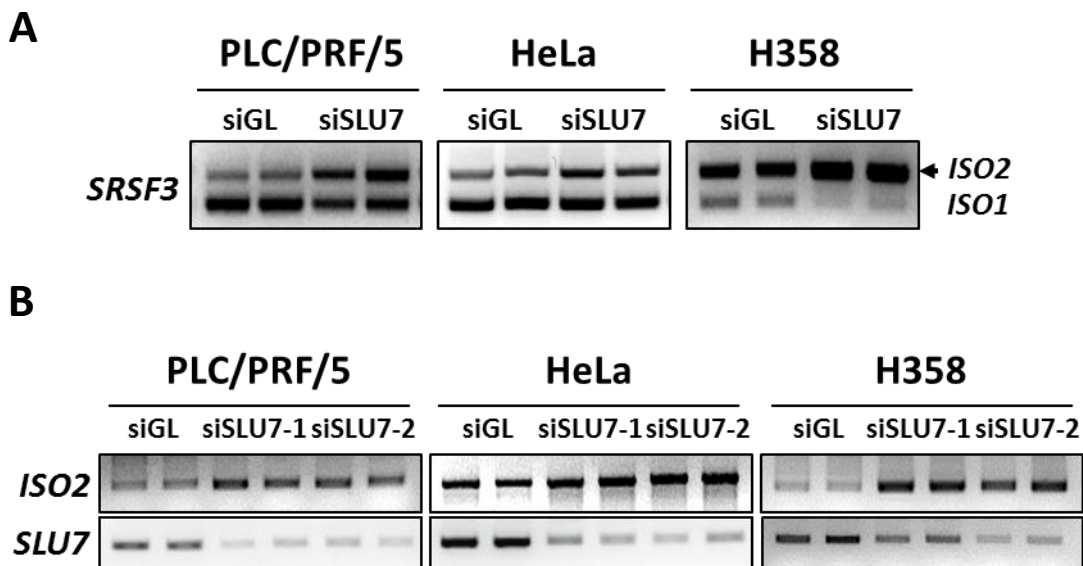


Figura 37. SLU7 modula el *splicing* de *SRSF3*. (A) Análisis del *splicing* de *SRSF3* mediante la PCR1 (Figura 36A) en las células transformadas PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSLU7. La flecha indica el transcrito de *SRSF3-ISO2* que incorpora el exón 4 (ISO2). (B) Análisis de la PCR2 (Figura 36A) de la expresión de *SRSF3-ISO2* (ISO2) en las tres líneas celulares con dos siRNAs distintos de SLU7. Se muestra una PCR de *SLU7* como control del silenciamiento.

Así mismo, observamos que SLU7 también regulaba el *splicing* de *SRSF3* en la línea de hepatoma no tumorigénica HepaRG, detectando un aumento de la expresión de la isoforma *SRSF3-ISO2* al silenciar la expresión de SLU7 en esta línea celular (Figura 38).

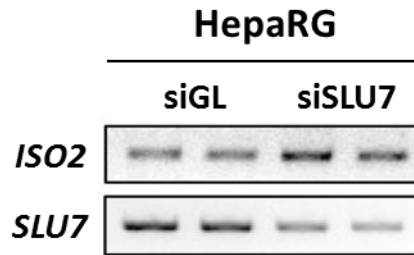


Figura 38. SLU7 modula el *splicing* de *SRSF3* en las células HepaRG. Análisis mediante la PCR2 (Figura 36A) de la expresión de *SRSF3-ISO2* (*ISO2*) y de *SLU7* en las células HepaRG a las 48 h tras la transfección con siGL (control) o siSLU7.

Realizamos un ensayo de RNA-CLIP con el fin de determinar el mecanismo de regulación de SLU7 sobre el *splicing* de *SRSF3*. Como se presenta en la Figura 39, se detectó la unión de SLU7 al mRNA de *SRSF3*, lo cual sugiere que SLU7 puede actuar de forma directa en la regulación del *splicing* de *SRSF3* participando en la escisión del exón 4 para generar la isoforma 1 (*SRSF3-ISO1*) que dará lugar a la proteína funcional de *SRSF3*.

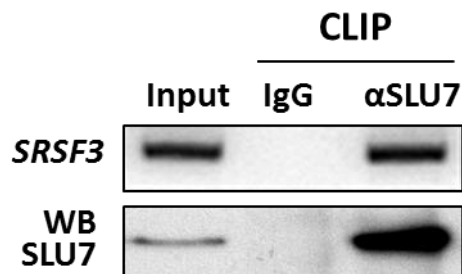


Figura 39. SLU7 modula directamente el *splicing* de *SRSF3*. Análisis de RNA-CLIP para la detección de la unión de SLU7 al mRNA de *SRSF3* en las células PLC/PRF/5. El panel de arriba representa el resultado de la PCR de *SRSF3* en el cDNA de las muestras del input (extracto total) y de la fracción de CLIP tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo control (IgG) o el anticuerpo anti-SLU7 (α SLU7). El panel de abajo representa el análisis por *Western blot* de la expresión de SLU7 en las muestras de proteína del input y los CLIPs con el IgG control o el anticuerpo anti-SLU7 (α SLU7).

A continuación, analizamos el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre el *splicing* de *SRSF1* observando una alteración en el procesamiento del pre-mRNA en las tres líneas celulares, aunque con resultados diferentes (Figura 40). En concreto, en las células PLC/PRF/5 y H358 el silenciamiento de SLU7 favoreció la escisión del exón 4 dando lugar a una isoforma de menor tamaño denominada variante 6 (Var 6) de *SRSF1* (Figura 40A). Sin embargo, en las células HeLa el análisis del *splicing* de *SRSF1*

mediante esta misma PCR (PCR2 de la Figura 36B) no mostró diferencias significativas. En esta línea celular, concretamente observamos que el silenciamiento de SLU7 resultó en la incorporación del intrón 3 (Var 2 y 3) en el mRNA de *SRSF1* (Figura 40B).

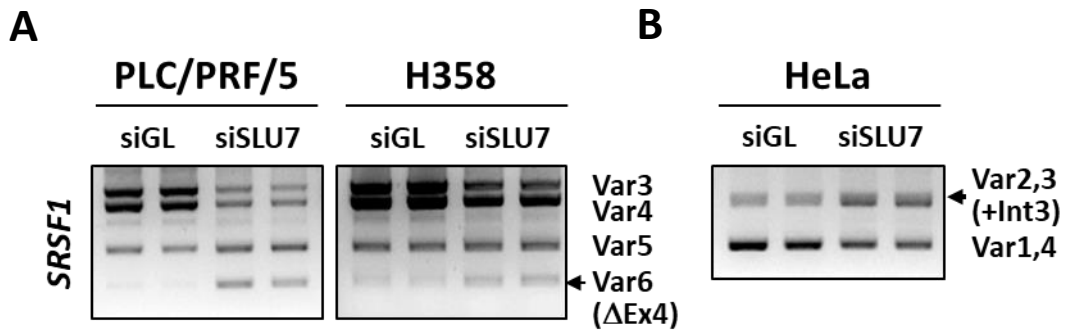


Figura 40. SLU7 modula el *splicing* de *SRSF1*. (A) Análisis de la expresión del gen de *SRSF1* mediante la PCR2 (Figura 36B). El silenciamiento de SLU7 en las células transformadas PLC/PRF/5 y H358 promueve la escisión del exón 4 en el mRNA de *SRSF1* dando lugar a la variante 6 (Var6) (flecha). (B) Análisis de la expresión del gen de *SRSF1* mediante la PCR1 (Figura 36B). El silenciamiento de SLU7 en las células transformadas HeLa promueve la incorporación del intrón 3 en el mRNA de *SRSF1* dando lugar a las variantes 2 y/o 3 (Var2 y Var3) (flecha).

La formación de la variante 6 en las células PLC/PRF/5 se confirmó mediante otra PCR con una pareja de cebadores específicos para la amplificación de esta isoforma (Figura 41).

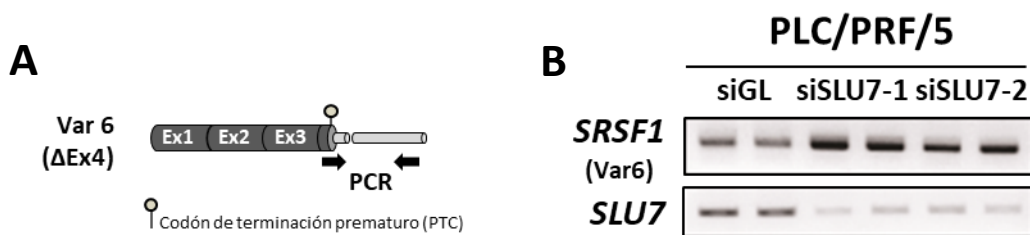


Figura 41. El silenciamiento de SLU7 promueve la acumulación de la variante 6 de *SRSF1* en las células PLC/PRF/5. (A) Representación esquemática del mRNA de la variante 6 de *SRSF1* (Var6). Se indica la localización de los cebadores utilizados para su detección por PCR (flechas). (B) Análisis de la expresión de la variante 6 de *SRSF1* mediante la PCR del apartado A en las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la transfección con los dos siRNAs específicos de SLU7 (siSLU7-1 o siSLU7-2).

Una vez confirmado en las distintas líneas celulares que el *splicing* de *SRSF3* y *SRSF1* se veía significativamente alterado al disminuir la expresión de *SLU7*, analizamos si estos cambios de expresión repercutían en los niveles de ambas proteínas SR.

Como se observa en la Figura 42, la expresión de la proteína *SRSF1* disminuyó en las tres líneas celulares silenciadas de *SLU7*. Sin embargo, las células si*SLU7* no mostraron cambios en la expresión proteica de *SRSF3* presentando el mismo nivel de proteína que las células control.

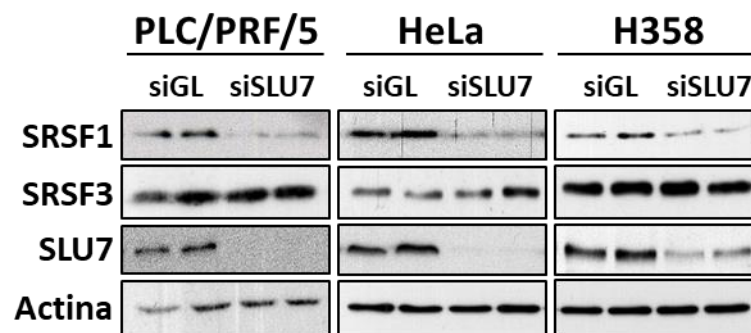


Figura 42. *SLU7* es esencial para la expresión de *SRSF1*. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de *SRSF1*, *SRSF3*, *SLU7* y actina, como control de carga, en las células PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h del silenciamiento de *SLU7*.

3.3. Inducción de las proteínas truncadas de *SRSF3* tras el silenciamiento de *SLU7*

La retención del exón 4 en el mRNA de *SRSF3* (*SRSF3-ISO2*) resulta en la incorporación de un PTC en el mensajero que, en condiciones normales, debería ser eliminado por el mecanismo de degradación de mRNA sin sentido (NMD). Sin embargo, también se ha descrito que en determinadas situaciones como, por ejemplo, en la inducción de estrés oxidativo^{198,225}, esta isoforma alternativa de *SRSF3* puede dar lugar a una proteína truncada (*SRSF3-TR*) de menor tamaño que ha perdido parte del dominio SR^{198,225}.

Así pues, decidimos volver a analizar la expresión proteica de *SRSF3* tras el silenciamiento de *SLU7* con otro anticuerpo que reconoce una región más próxima al N-terminal (Aa 84-104, Thermo Fisher Scientific) presente en todas las posibles isoformas de *SRSF3*.

Como muestra la Figura 43A, al silenciar SLU7 en la línea celular H358, en la cual habíamos observado una mayor inducción de la expresión de la isoforma *SRSF3-ISO2* tras el silenciamiento de SLU7 (Figura 37), detectamos varias proteínas truncadas de SRSF3 (*SRSF3-TR*) de un peso molecular menor que 20 KDa. Para confirmar que estas *SRSF3-TR* se sintetizaban a partir del transcrito de *SRSF3-ISO2*, diseñamos un siRNA frente al exón 4 de *SRSF3* (*siISO2*) permitiendo silenciar exclusivamente la expresión de esta isoforma (Figura 43B). Como se observa en la Figura 43A, el silenciamiento específico de la expresión de la isoforma *SRSF3-ISO2* impidió la inducción de las formas truncadas de SRSF3 detectadas al silenciar SLU7.

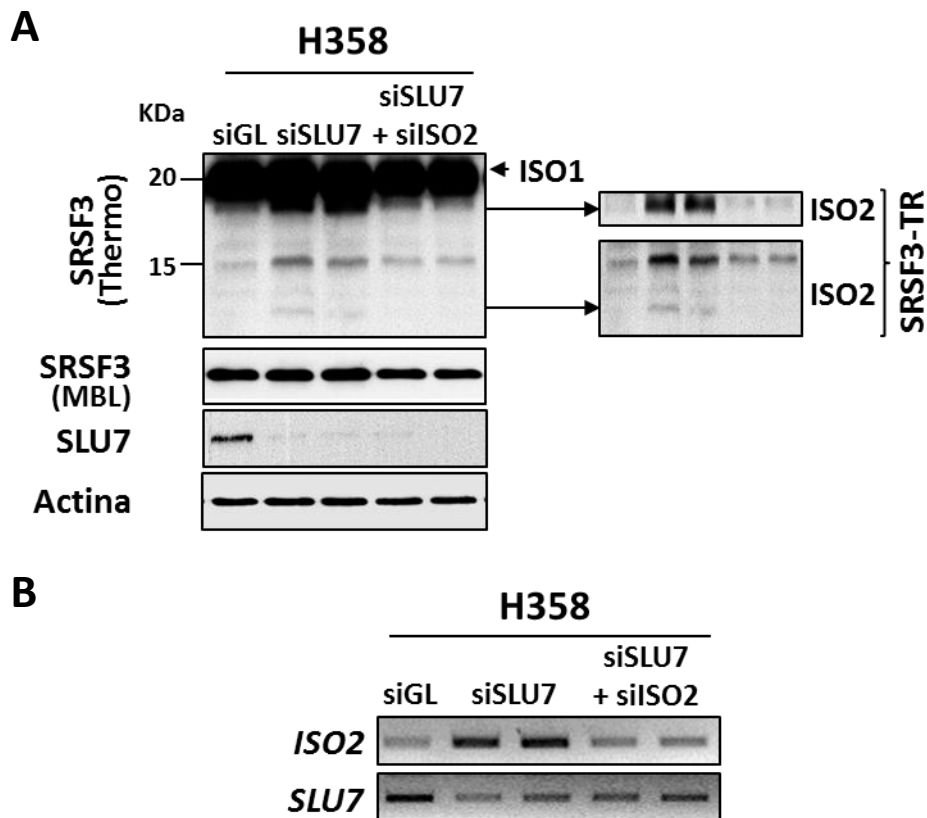


Figura 43. SLU7 previene la expresión de las proteínas truncadas de SRSF3. (A) Análisis mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-SRSF3 de la casa comercial Thermo Fisher Scientific para detectar la expresión de SRSF3 (ISO1) y las proteínas truncadas de SRSF3 (*SRSF3-TR*) en las células H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2 (el siRNA específico de la isoforma que incorpora el exón 4 en el mRNA de *SRSF3*, *SRSF3-ISO2*). En los paneles de la derecha se muestran los fragmentos de la membrana a diferente exposición del *Western blot* de SRSF3 (Thermo) para una mejor detección de las proteínas truncadas de SRSF3 (*SRSF3-TR*). Análisis mediante *Western blot* de la expresión de SRSF3 (ISO1) con el anticuerpo de la casa comercial MBL que reconoce la isoforma 1 (ISO1). Se muestra la detección de SLU7 como control del silenciamiento y la de actina como control de carga. (B) Análisis del silenciamiento de *SRSF3-ISO2* (ISO2) mediante la PCR2 (Figura 36A) y de SLU7 en las muestras analizadas en A.

Conjuntamente, estos resultados muestran que SLU7 es esencial para el correcto *splicing* y expresión tanto de SRSF1 como de SRSF3, impidiendo la expresión de las isoformas truncadas de la proteína SRSF3. Así pues, en base a estos resultados obtenidos, sugerimos que SLU7 puede estar impidiendo la formación de los R-loops a través de la regulación de SRSF1 y SRSF3, sin descartar además una acción directa o a través de otros factores.

4. LAS PROTEINAS TRUNCADAS DE SRSF3 PARTICIPAN EN LA ACUMULACIÓN DE R-LOOPS INDUCIDA AL SILENCIAR SLU7

El silenciamiento de la expresión de SLU7 induce la acumulación del transcrito alternativo de *SRSF3* (*SRSF3-ISO2*) y de sus proteínas truncadas (SRSF3-TR). Por ello, decidimos evaluar la posible implicación de estas SRSF3-TR en el fenotipo observado al silenciar la expresión de SLU7.

4.1. El silenciamiento de SRSF3-ISO2 previene la alteración del *splicing* y expresión de SRSF1 asociadas al silenciamiento de SLU7

En primer lugar, analizamos si la inducción de SRSF3-ISO2 tras el silenciamiento de SLU7 presentaba un papel en el *splicing* y expresión de SRSF1. Como se muestra en la Figura 44, la inhibición de la inducción de SRSF3-ISO2 que resulta del silenciamiento de SLU7 evitó la inducción de las variantes alternativas de *SRSF1* (Var6 o Var2-3). Concretamente, en las células PLC/PRF/5 se corrigió la acumulación de la variante 6 (Figura 44A), mientras que en las células HeLa se impidió la inducción de las variantes 2 y/o 3 (Figura 44B).

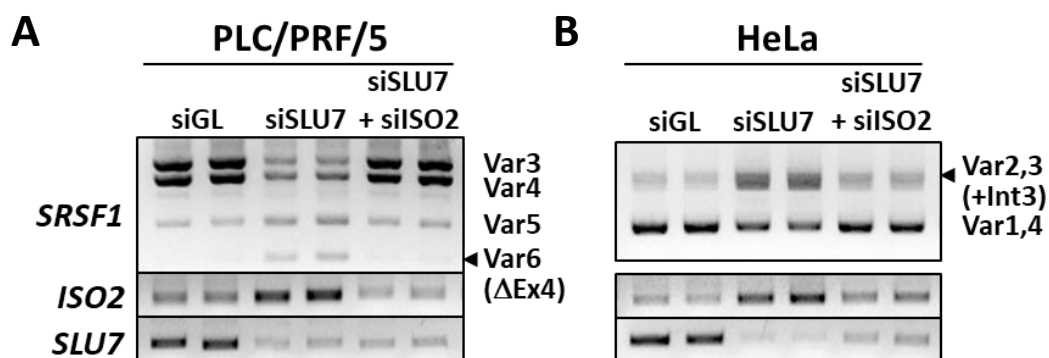


Figura 44. Implicación de SRSF3-ISO2 en el *splicing* alternativo de SRSF1. Análisis del *splicing* de *SRSF1* en las células PLC/PRF/5 y HeLa a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2. (A) Análisis de la PCR2 (Figura 36B) del gen de *SRSF1* en las células PLC/PRF/5. La flecha indica la acumulación de la variante 6 (Var6) de *SRSF1*. Se muestran las PCRs de *SRSF3-ISO2* y *SLU7* como control de los silenciamientos. (B) Análisis de la PCR1 (Figura 36B) del gen de *SRSF1* en las células HeLa. La flecha indica la acumulación de la variante 2 y/o 3 (Var2, 3) de *SRSF1* (flecha). Se muestran las PCRs de *SRSF3-ISO2* (mediante la PCR2, Figura 36A) y *SLU7* como control de los silenciamientos.

Mediante *Western blot* confirmamos que la corrección del *splicing* de *SRSF1* venía acompañada de la recuperación de los niveles de expresión de su proteína (Figura 45).

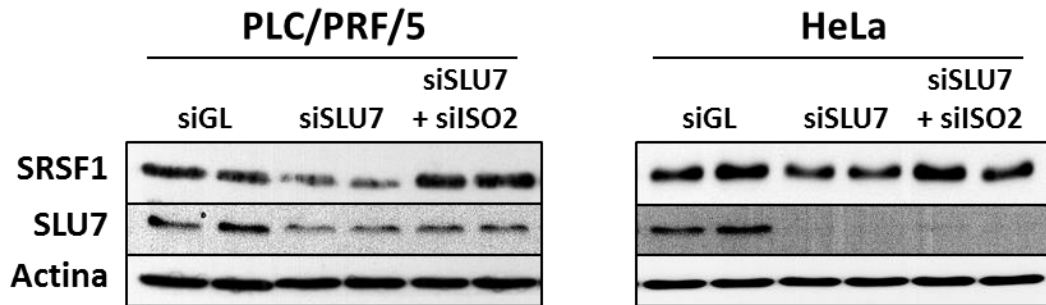


Figura 45. Implicación de SRSF3-ISO2 en la regulación de la expresión de SRSF1 por SLU7. Análisis mediante *Western blot* de SRSF1, SLU7 y actina, como control de carga, en las células PLC/PRF/5 y HeLa a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2.

El conjunto de los ensayos demuestra que la isoforma *SRSF3-ISO2* y, probablemente, sus proteínas truncadas están involucradas en las alteraciones de la expresión de *SRSF1* observadas en las células silenciadas de *SLU7*, ya que cuando se impide la acumulación de *SRSF3-ISO2* en estas células, el *splicing* y la expresión de *SRSF1* no se ven afectados.

4.2. El silenciamiento de SRSF3-ISO2 previene la acumulación de R-loops y la inducción de daño en el DNA asociadas al silenciamiento SLU7

Continuamos caracterizando el papel de *SRSF3-ISO2* en el fenotipo descrito al silenciar *SLU7*. Como se ha mencionado anteriormente y de acuerdo con la literatura ¹¹¹, la inducción de R-loops observada al silenciar la expresión de *SLU7* podría deberse a la inhibición de la expresión de *SRSF1* presente en estas células. Como ya demostramos que la isoforma *SRSF3-ISO2* estaba implicada en esta inhibición, decidimos analizar la formación de R-loops mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo S9.6 en las células PLC/PRF/5 transfectadas simultáneamente con siSLU7 y siISO2. Como se observa en la Figura 46A, la acumulación de R-loops en los núcleos de las células silenciadas de *SLU7* (Figura 46A) se vio significativamente disminuida cuando se impidió la inducción de *SRSF3-ISO2* (Figura 46B).

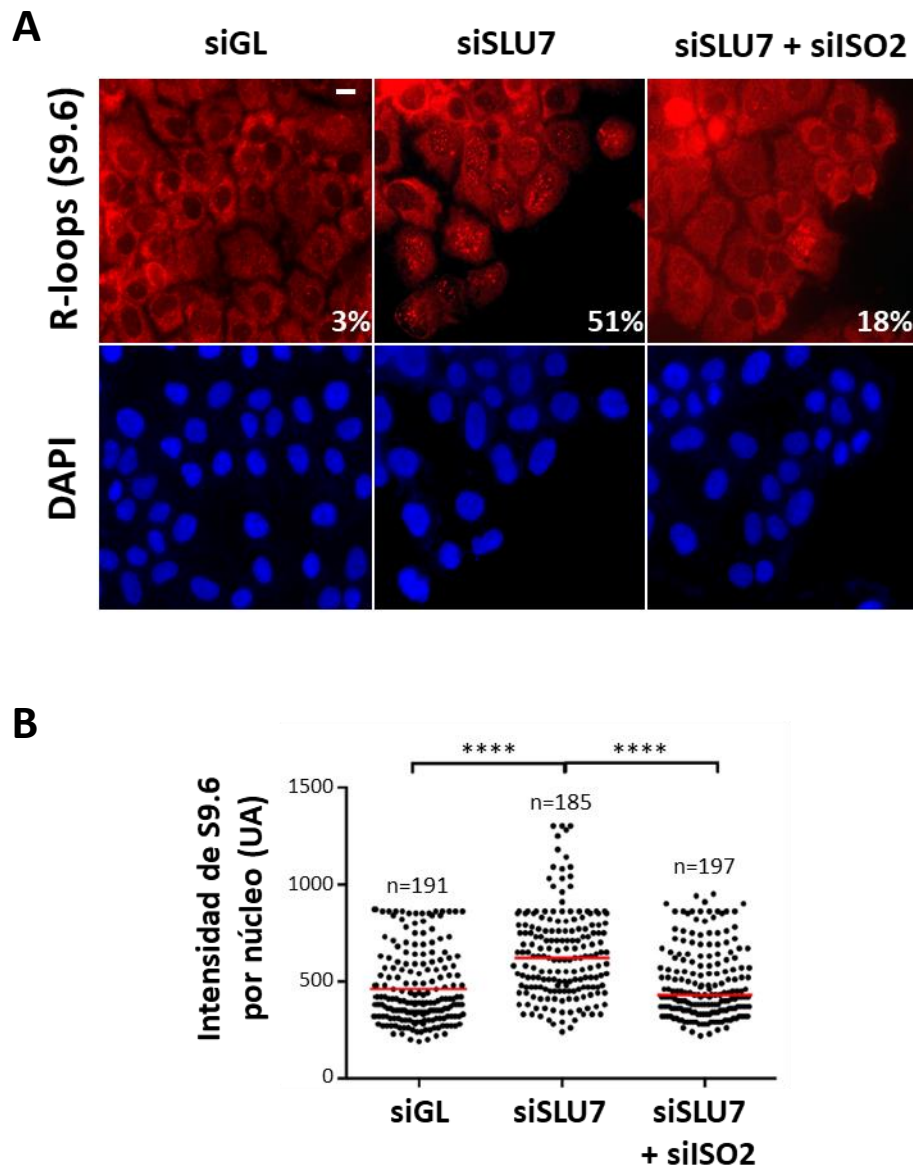


Figura 46. La isoforma SRSF3-ISO2 favorece la formación de R-loops en ausencia de SLU7. (A) Inmunofluorescencia para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 (rojo) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestra el porcentaje de células con señal S9.6 en el núcleo. Barra de escala: 10 μ m. (B) Cuantificación de la intensidad de S9.6 en los núcleos de las células mediante el programa *ImageJ*. La señal de DAPI se utilizó para crear una máscara del núcleo. Se indica el número de núcleos cuantificados por condición. Las barras rojas hacen referencia a la mediana de intensidad S9.6 por condición (**** p <0,0001, Test U de Mann-Whitney).

De acuerdo con estos resultados, observamos que la prevención de la inducción de SRSF3-ISO2 en las células PLC/PRF/5 y HeLa silenciadas de SLU7 (Figura 45) redujo la presencia de daño en el DNA (Figura 47).

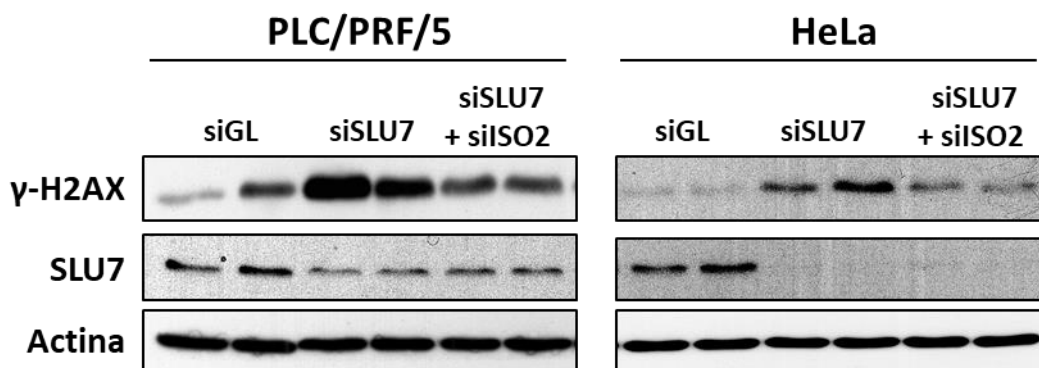


Figura 47. La isoforma SRSF3-ISO2 participa en la inducción de daño en el DNA al silenciar la expresión de SLU7. Análisis mediante *Western blot* de H2AX fosforilado (γ -H2AX), SLU7 y actina como control de carga en las células PLC/PRF/5 y HeLa a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2.

Estos resultados muestran que la acumulación de R-loops y el daño en el DNA que resultan del silenciamiento de SLU7 están mediados en gran parte por la alteración del *splicing* de SRSF3 y la inducción de las isoformas truncadas de SRSF3, lo cual repercute en el mRNA de SRSF1 alterando su *splicing* e impidiendo la expresión de su proteína.

4.3. Las proteínas truncadas de SRSF3 pueden actuar como dominante negativo de SRSF3-ISO1

Nuestros datos muestran que la isoforma SRSF3-ISO2 juega un papel en la inhibición de SRSF1 mediada por el silenciamiento de SLU7. Como se ha mencionado, está demostrado que existe una regulación mutua entre SRSF3-ISO1 y SRSF1, de forma que, por ejemplo, el silenciamiento de SRSF3 resulta en la inhibición de la expresión de SRSF1²²⁴. En nuestro estudio, las alteraciones en la expresión de SRSF1 se producen sin alteraciones en los niveles de la proteína codificada por la isoforma SRSF3-ISO1 (Figura 42); por ello, postulamos que las proteínas truncadas de SRSF3, codificadas por la isoforma SRSF3-ISO2, podrían estar actuando como dominante negativo de SRSF3-ISO1. Para evaluar esta hipótesis, primero comparamos si el efecto sobre el *splicing* de SRSF1 del silenciamiento de SRSF3 era similar al del silenciamiento de SLU7. El siRNA utilizado para el silenciamiento de SRSF3 inhibe la expresión tanto de SRSF3-ISO1 como de

SRSF3-ISO2. Como se observa en la Figura 48, tanto en las células PLC/PRF/5 como en las células HeLa, el silenciamiento de SRSF3 (siSRSF3) produjo las mismas alteraciones en el *splicing* de *SRSF1* que el silenciamiento de SLU7.

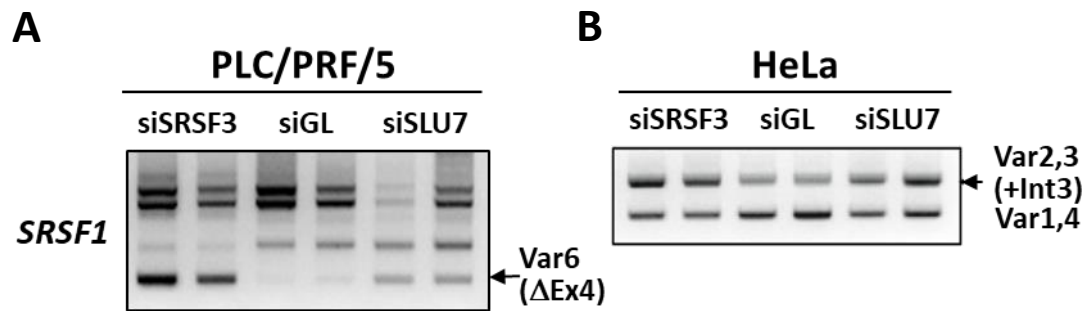


Figura 48. SRSF3 y SLU7 modulan el *splicing* de *SRSF1* de forma similar. (A) Análisis mediante la PCR2 (Figura 36B) del gen *SRSF1*. El silenciamiento de SRSF3 (siSRSF3) o SLU7 en las células transformadas PLC/PRF/5 promueve la escisión del exón 4 en el mRNA de *SRSF1* dando lugar a la variante 6 (Var6, flecha). (B) Análisis mediante la PCR1 (Figura 36B) del gen *SRSF1*. El silenciamiento de SRSF3 (siSRSF3) o SLU7 en las células transformadas HeLa promueve la incorporación del intrón 3 en el mRNA de *SRSF1* dando lugar a las variantes 2 y/o 3 (Var2,3, flecha).

Como era de esperar, estas alteraciones del *splicing* se tradujeron en la reducción de los niveles proteicos de SRSF1 en ambas líneas celulares, tanto al silenciar SLU7 como al silenciar SRSF3 (Figura 49).

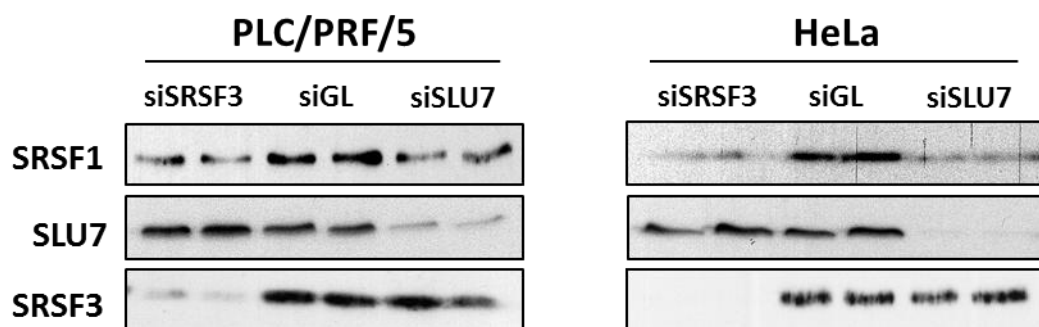


Figura 49. SRSF3 y SLU7 modulan la expresión de SRSF1. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de SRSF1, SLU7 y SRSF3 en las células PLC/PRF/5 y HeLa a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSRSF3.

A continuación, evaluamos la presencia de R-loops tras el silenciamiento de SRSF3. Como se observa en la Figura 50, el análisis de inmunofluorescencia para la detección de R-loops reveló que el silenciamiento de SRSF3 en las células PLC/PRF/5 promovía la formación de híbridos de RNA:DNA o R-loops.

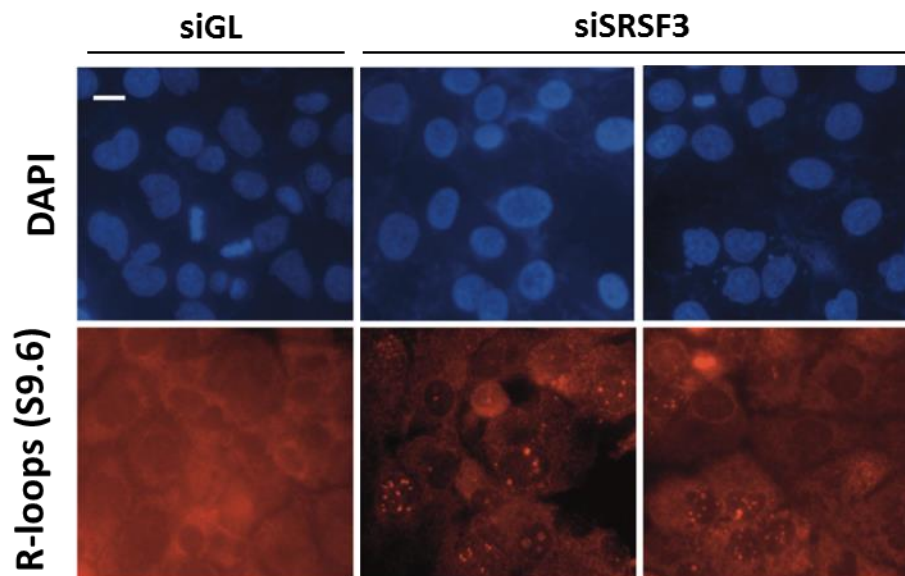


Figura 50. SRSF3 previene la formación de R-loops. Inmunofluorescencia para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 (rojo) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control) o siSRSF3. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m.

Una vez comprobado que el silenciamiento de SRSF3 fenocopiaba muchos de los eventos observados al silenciar SLU7, decidimos comprobar si la inducción de SRSF3-ISO2 observada al silenciar SLU7 podía estar inhibiendo la actividad de SRSF3-ISO1. Para ello, analizamos la expresión de $p53\beta$, una isoforma de $p53$ generada por *splicing* alternativo tras la inhibición de SRSF3-ISO1²²⁶. Como se observa en la Figura 51, confirmamos la inducción descrita de $p53\beta$ tras el silenciamiento de SRSF3 y detectamos este mismo efecto tras el silenciamiento de SLU7. Además, cuando se evitó la acumulación de SRSF3-ISO2 en las células silenciadas de SLU7 (siSLU7+siISO2) claramente se impidió la inducción de este *splicing* alternativo de $p53$. Este resultado sugiere que la inducción de la expresión de $p53\beta$ en las células siSLU7 podría deberse a la función inhibitoria de las formas SRSF3-TR sobre SRSF3-ISO1.

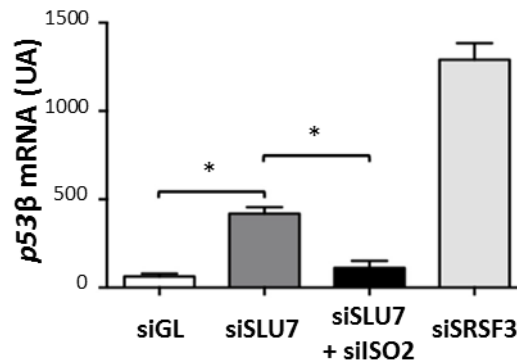


Figura 51. La inducción de *p53β* tras el silenciamiento de la expresión de *SLU7* depende de *SRSF3-ISO2*. Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de *p53β* en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7, siSLU7+siISO2 o siSRSF3 (* $p < 0,05$).

El conjunto de nuestros resultados nos permite sugerir que las proteínas truncadas de *SRSF3*, inducidas al silenciar la expresión de *SLU7*, podrían actuar como dominante negativo de la actividad de *SRSF3-ISO1* repercutiendo, entre otras, en la expresión de *SRSF1*, en la formación de R-loops y en la inducción de daño en el DNA.

5. LAS PROTEÍNAS TRUNCADAS DE *SRSF3* PARTICIPAN EN LAS ALTERACIONES MITÓTICAS OBSERVADAS EN LAS CÉLULAS SILENCIADAS DE *SLU7*

5.1. La prevención de la expresión de *SRSF3-ISO2* en las células silenciadas de *SLU7* revierte la parada en el ciclo celular y previene la muerte por apoptosis

Continuamos caracterizando hasta qué punto *SRSF3-ISO2* y sus proteínas truncadas participaban en el fenotipo que resultaba del silenciamiento de *SLU7*. Como ya se ha mencionado al inicio, el efecto más evidente y contundente del silenciamiento de *SLU7* en las células transformadas es la muerte por apoptosis²⁰² que en este trabajo hemos demostrado que está precedida por una parada prolongada en mitosis (Figura 15).

Por ello analizamos si la prevención de la inducción de *SRSF3-ISO2* tenía efecto en la respuesta apoptótica observada en las células PLC/PRF/5 silenciadas de *SLU7*, analizando por *Western blot* la escisión de la proteína *PARP1* (*Poly (ADP-ribose) Polymerase*) como marcador de apoptosis. Como se muestra en la Figura 52, la inhibición de la inducción de *SRSF3-ISO2* en las células silenciadas de *SLU7* (siSLU7+siISO2) impidió la fragmentación de *PARP1*.

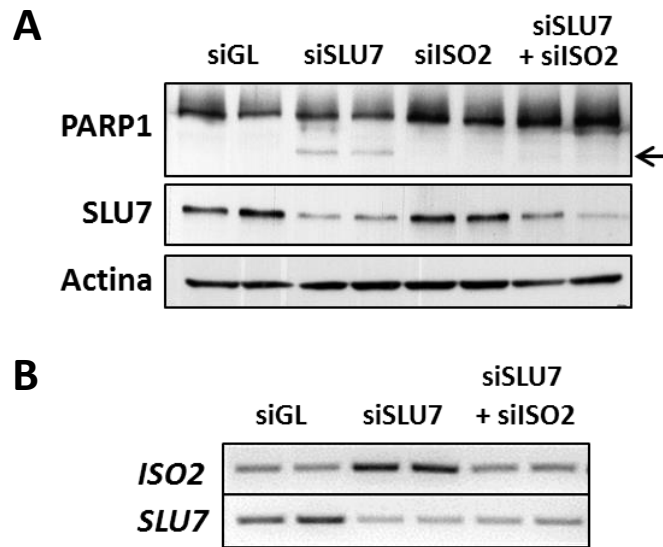


Figura 52. La inhibición de la expresión de SRSF3-ISO2 en las células silenciadas de SLU7 previene su muerte por apoptosis. (A) Análisis por *Western blot* de PARP1 (*Poly (ADP-ribose) Polymerase*) en las células PLC/PRF/5 tras 72 h de transfección con siGL (control), siSLU7, siISO2 o siSLU7+siISO2. Se muestra un *Western blot* representativo del silenciamiento de SLU7 y de actina como control de carga. (B) Análisis del silenciamiento de *SRSF3-ISO2 (ISO2)* (PCR2 en Figura 36A) y *SLU7* mediante PCR en las células del apartado A.

A continuación, analizamos si este efecto estaba precedido por una recuperación de la progresión en el ciclo celular. Como se observa en la Figura 53, la inhibición de la inducción de SRSF3-ISO2 claramente rescató a las células siSLU7 de la parada en la fase G2/M.

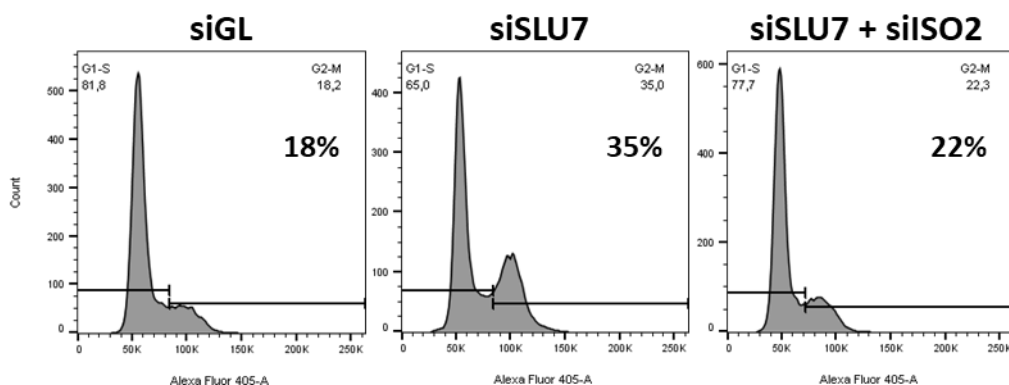


Figura 53. SRSF3-ISO2 media en la parada en el ciclo celular inducida al silenciar SLU7. La progresión en el ciclo celular se analizó mediante FACS en las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M.

Estos resultados demuestran que tanto la muerte (Figura 52) como la parada en el ciclo celular (Figura 53), ambas inducidas al silenciar la expresión de SLU7, se recuperan cuando se previene la expresión de SRSF3-ISO2, lo cual sugiere un papel de estas isoformas truncadas de SRSF3 en las alteraciones mitóticas observadas.

5.2. El silenciamiento de SRSF3-ISO2 corrige la falta de cohesión entre las cromátidas hermanas inducida al silenciar SLU7

Hemos demostrado que la parada en mitosis observada en las células siSLU7 está estrechamente relacionada con la falta de cohesión entre las cromátidas hermanas (Figura 22), como consecuencia de una alteración en el *splicing* y expresión de sororina (Figura 24). Por ello, quisimos estudiar si SRSF3-ISO2 juega un papel en estos procesos descritos analizando el efecto de la inhibición de la expresión de las SRSF3-TR en las células PLC/PRF/5 también silenciadas de SLU7.

En primer lugar y como se muestra en la Figura 54, el silenciamiento de SRSF3-ISO2 recuperó la unión entre las cromátidas hermanas alterada al silenciar SLU7, explicando el restablecimiento de la progresión del ciclo celular observado en estas células (Figura 53).

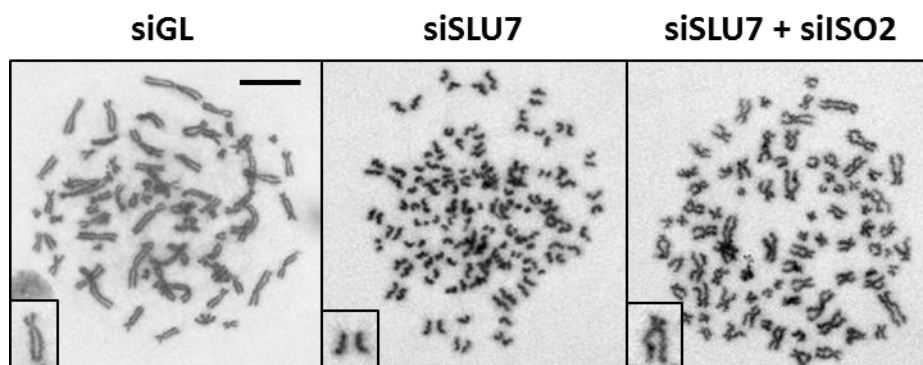


Figura 54. SRSF3-ISO2 participa en la alteración de la cohesión de las cromátidas hermanas inducida al silenciar SLU7. Imágenes de extensión de cromosomas en metafase de las células PLC/PRF/5 tras 48 h de transfección de siGL (control), siSLU7 o siSLU7+siISO2 y 3 h de tratamiento con nocodazol. Barra de escala: 10 μ m.

A continuación, decidimos estudiar si este restablecimiento de la cohesión de las cromátidas hermanas en las células siSLU7+siISO2 podía deberse a la corrección de la expresión de *sororina*. Así pues, evaluamos el papel de SRSF3-ISO2 en el *splicing* y la expresión de *sororina* en las células PLC/PRF/5, HeLa y H358. Como se observa en la Figura 55, la alteración en el *splicing* de *sororina* fue corregida al impedir la inducción de SRSF3-ISO2 en todas las líneas celulares en las que se había silenciado a su vez la expresión de SLU7.

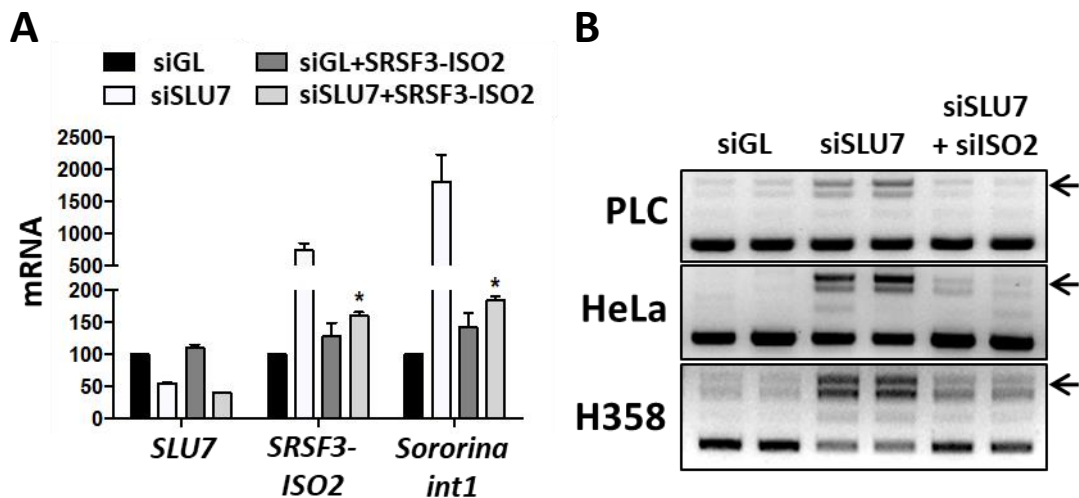


Figura 55. El silenciamiento de SRSF3-ISO2 corrige el *splicing* aberrante de *sororina* inducido al silenciar SLU7. (A) Análisis por PCR a tiempo real de la expresión de *SLU7*, de la isoforma *SRSF3-ISO2* y de la incorporación del intrón 1 en el mRNA de *sororina* (*sororina int1*) (PCR1 de la Figura 23) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7, siISO2 o siSLU7+siISO2 (* $p < 0,05$ respecto a siSLU7). (B) Análisis de los transcritos de *sororina* mediante la PCR3 (Figura 23) en las líneas celulares PLC/PRF/5 (PLC), HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+ siISO2. Las flechas indican la incorporación aberrante del intrón 1 y 2 en el mRNA de *sororina*.

Nuestros datos muestran que las isoformas SRSF3-TR podrían ejercer una función de dominante negativo sobre la actividad de SRSF3-ISO1 interfiriendo, por ejemplo, en la regulación del *splicing* y la expresión de SRSF1. Por ello, decidimos estudiar si este era el caso también de la regulación del *splicing* de *sororina*. Para ello, analizamos el efecto de la disminución de la expresión de SRSF3 sobre el *splicing* de *sororina*.

Inesperadamente y como se muestra en la Figura 56, a diferencia del silenciamiento de SLU7, el silenciamiento de SRSF3 no alteró el procesamiento de los intrones 1 y 2 del pre-mRNA de *sororina* en ninguna de las líneas estudiadas, expresándose exclusivamente el mRNA procesado. Estos resultados, sugieren que la alteración del *splicing* de *sororina* observada al silenciar SLU7 no está asociada a una inhibición de SRSF3-ISO1. Por tanto, descartada la función dominante negativo de las SRSF3-TR sobre la actividad de SRSF3-ISO1, concluimos que las isoformas truncadas (SRSF3-TR) podrían inducir directamente el *splicing* aberrante de *sororina*.

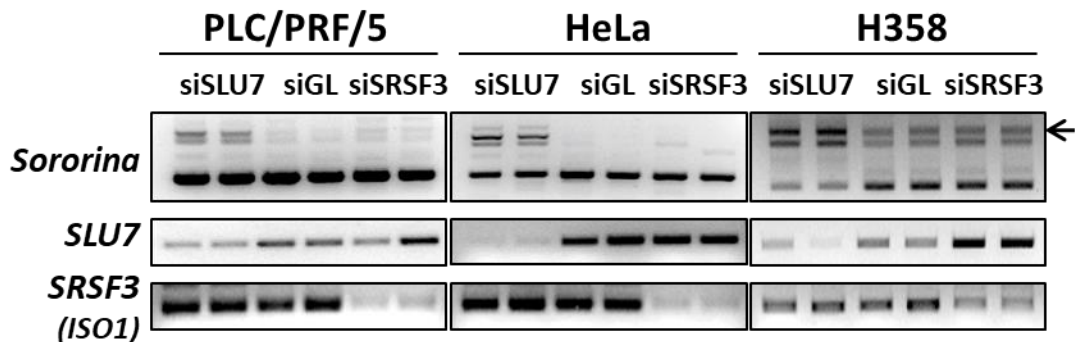


Figura 56. SRSF3 no regula el *splicing* de *sororina*. Análisis mediante PCR de los transcritos de *sororina* (PCR3 de la Figura 23), de *SLU7* y de *SRSF3-ISO1* (PCR3 de la Figura 36A) en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSRSF3. La flecha indica la incorporación aberrante del intrón 1 y 2 al mRNA de *sororina*.

5.3. Las proteínas truncadas de SRSF3 regulan de forma directa el *splicing* alternativo de *sororina*

Con objeto de evaluar el papel directo de las proteínas truncadas de SRSF3, diseñamos tres construcciones distintas de sobreexpresión de SRSF3-ISO2 (Figura 57). Las construcciones se diferencian en el tamaño del inserto clonado: (1) pcDNA-SRSF3-ISO2 Exon4 incluye el cDNA de SRSF3 hasta el final del exón 4, (2) pcDNA-SRSF3-ISO2 V5 hasta el PTC del exón 4 y con la secuencia V5 fusionada y (3) pcDNA-SRSF3-ISO2 Stop finaliza en el PTC del exón 4.

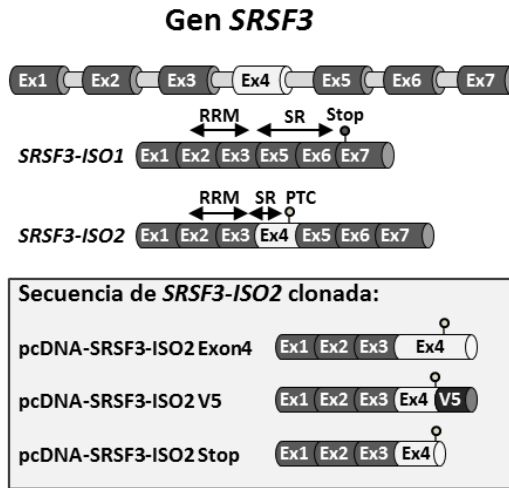


Figura 57. Representación esquemática de las construcciones de SRSF3-ISO2. Se representa el gen de *SRSF3*, sus isoformas (ISO1 e ISO2), los dominios RRM y SR y las construcciones generadas en el plásmido pcDNA3 para la sobreexpresión de SRSF3-ISO2.

En primer lugar, analizamos mediante *Western blot* la expresión de SRSF3 con el anticuerpo que reconoce todas las isoformas (Thermo Fisher Scientific) en las células PLC/PRF/5 a las 48 horas de la transfección de las distintas construcciones. Como se observa en la Figura 58, la expresión de la proteína de SRSF3-ISO1 no se vio alterada con la transfección de las construcciones. Sin embargo, hay que destacar que el patrón de expresión de las proteínas generadas por las construcciones no se correspondía al patrón de expresión detectado cuando se indujo la expresión de la isoforma SRSF3-ISO2 endógena al silenciar SLU7 (Figura 43). Con las construcciones se detectó una única isoforma de alrededor de 15 KDa, cuyo tamaño aumentó por la fusión del epítipo V5. Sin embargo, no se detectó la banda de casi 20 KDa que se expresaba al silenciar SLU7 y que claramente se veía inhibida tras la co-transfección con el siISO2 (Figura 43).

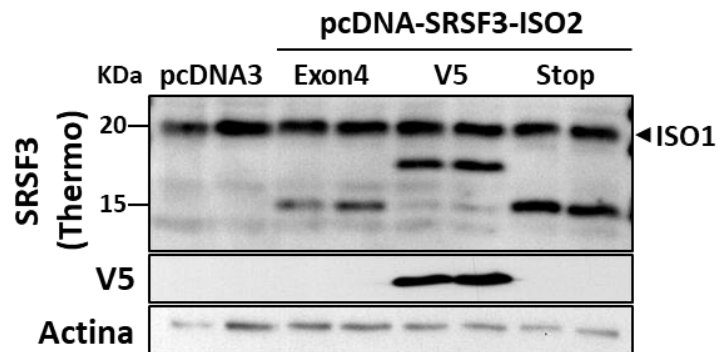


Figura 58. Construcciones de SRSF3-ISO2 para sobreexpresar las proteínas SRSF3-TR. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de SRSF3 (anticuerpo anti-SRSF3 de Thermo), V5 y actina como control de carga en las PLC/PRF/5 tras 48 h de la transfección con el plásmido control (pcDNA3) o los plásmidos de sobreexpresión pcDNA-SRSF3-ISO2 Exon4, V5 y Stop. La flecha indica la expresión de SRSF3-ISO1.

A continuación, analizamos mediante PCR a tiempo real el *splicing* de *sororina* tras la sobreexpresión de estas construcciones. Como se observa en la Figura 59, todas las construcciones indujeron de forma significativa los transcritos no procesados de *sororina*, incorporando el intrón 1 y 2 en su mRNA y reproduciendo las alteraciones de expresión de *sororina* descritas al silenciar la expresión de SLU7. Por tanto, estos resultados demuestran por primera vez la implicación de las SRSF3-TR en la regulación del *splicing* de *sororina*.

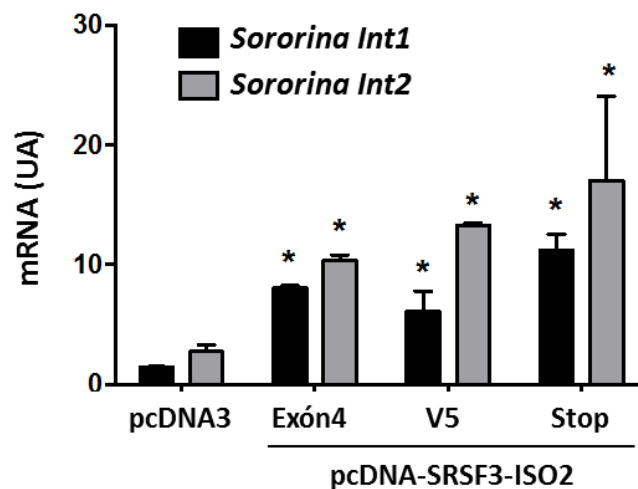


Figura 59. La sobreexpresión de SRSF3-ISO2 altera el *splicing* de *sororina*. Análisis por PCR a tiempo real de la incorporación del intrón 1 (*sororina Int1*) (PCR1 de la Figura 23) y el intrón 2 (*sororina Int2*) (PCR2 de la Figura 23) en el mRNA de *sororina* en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con el plásmido control (pcDNA3) o los tres plásmidos de sobreexpresión de SRSF3-ISO2, pcDNA-SRSF3-ISO2 Exon4, V5 y Stop (* $p < 0,05$ respecto al plásmido control).

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo por el cual las SRSF3-TR podían estar induciendo el *splicing* aberrante de *sororina*, mediante análisis bioinformático identificamos dos posibles motivos de unión para SRSF3 en el intrón 1 de *sororina* (Figura 60). Por ello decidimos estudiar si las proteínas truncadas de SRSF3 eran capaces de unirse a estos motivos y, así, regular la retención del intrón 1.

Para analizar esta hipótesis, sintetizamos dos oligos de mRNA biotinilados correspondientes a cada una de las secuencias predichas de unión a SRSF3 (O1 y O2) (Figura 60). Como control negativo sintetizamos el oligo 1 con 3 nucleótidos modificados (rojo) en el motivo de unión descrito (Figura 60). Utilizando estos oligos, realizamos un ensayo de *RNA-pull down* en las células PLC/PRF/5 transfectadas con uno de los plásmidos de sobreexpresión de SRSF3-ISO2.

Intrón 1 del gen de *Sororina*

GTGAGCGGAGGGCGCGGGGAGACGTGAGGTCGAGCCGTTTGGGGGACGCAGTCC
 GGTGAAAGATGGCCTCTTCCCTCCCGCTGCCGCCGCCGAGGAGGCGCCCTTAAA
 AGGGCTTGTTTGGGAATCTTCTCGCTGTCTCTAGAACCTGTTCTCTGGACTCTAA
 GGTCTAGAGTCTCTCTACCACCTTAACCTTTTTCTCTTTCCAG

Oligo 1 mutado

gccucuuC**ACGC**ACGCUGCCG

Figura 60. Motivos predichos de unión de SRSF3 en el intrón 1 del gen de *sororina*. Secuencia del intrón 1 del gen de *sororina* con los sitios predichos de unión para SRSF3 resaltados en azul. En negrita, se muestra la secuencia correspondiente a los oligos (O1 y O2) de RNA biotinilados sintetizados para realizar el ensayo de *RNA-pull down*. En la parte inferior se indica la secuencia del oligo 1 mutado utilizado como control negativo, los cambios de nucleótidos en el motivo de unión aparecen marcados en rojo.

Como se observa en la Figura 61A, el *Western blot* de SRSF3 (anticuerpo de Thermo Fisher Scientific) reveló la unión de la isoforma SRSF3-ISO1 a los oligos O1 y O2 en las células control transfectadas con el plásmido control (pcDNA3), demostrando la capacidad de SRSF3-ISO1 de unirse a las secuencias presentes en el intrón 1 de *sororina*. Más importante, nuestros datos mostraron que en las células que sobreexpresaban SRSF3-ISO2, la isoforma truncada de SRSF3 también era capaz de unirse a los dos oligos. En este punto, decidimos estudiar si las isoformas de SRSF3 inducidas tras el silenciamiento de la expresión de SLU7 eran capaces de unirse a los oligos O1 y O2. Como se observa en la Figura 61B, a las 48 horas tras el silenciamiento de la expresión de SLU7 en las células PLC/PRF/5 las dos isoformas de SRSF3-TR inducidas eran capaces de unirse a los oligos O1 y O2 del intrón 1 de *sororina*.

Para confirmar la especificidad de esta unión, repetimos el experimento con el oligo 1 y con el mismo oligo con la secuencia del motivo de unión a SRSF3 mutada. Como se aprecia en la Figura 61C, las proteínas SRSF3-TR unidas al oligo 1 tras el silenciamiento de SLU7 no se unieron al oligo mutado (MUT), confirmando la especificidad de la unión de las SRSF3-TR al intrón 1 de *sororina*.

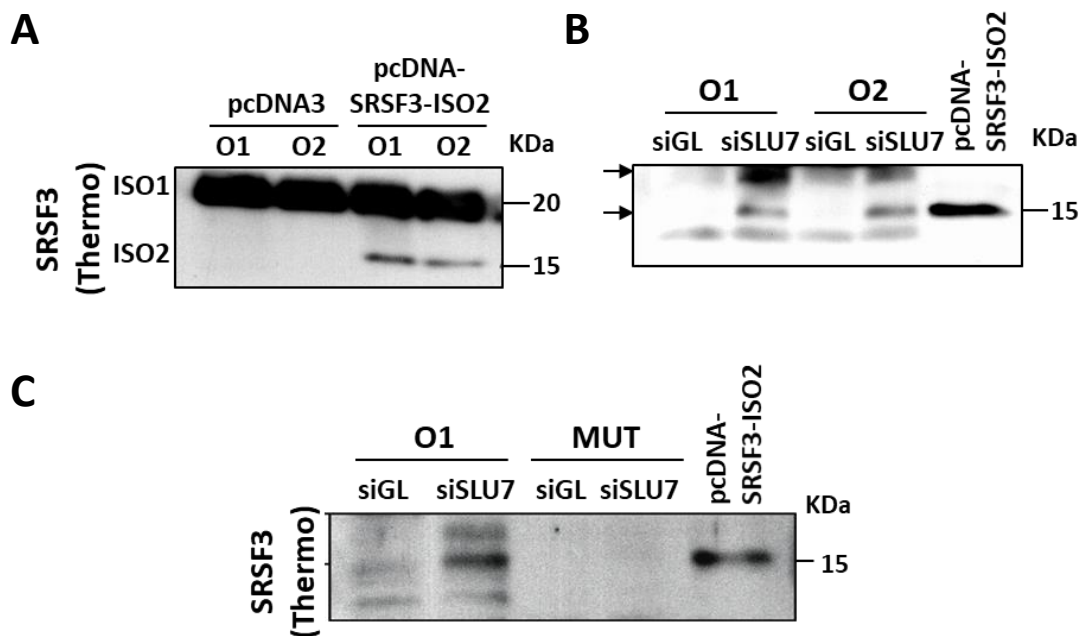


Figura 61. SRSF3-ISO1 y las proteínas truncadas de SRSF3 se unen al intrón 1 de *sororina*. Detección mediante *Western blot* de SRSF3 (anticuerpo de Thermo Fisher Scientific) en el extracto proteico obtenido tras el *RNA-pull-down* con los oligos de RNA biotilados (O1 y O2) que contienen las secuencias consenso de unión de SRSF3 en el intrón 1 de la *sororina*. (A) Las células PLC/PRF/5 fueron transfectadas con uno de los plásmidos de sobreexpresión de SRSF3-ISO2 (pcDNA-SRSF3-ISO2) o el correspondiente plásmido vacío como control (pcDNA3). Tras el *RNA-pull-down* se observa que la isoforma SRSF3-ISO1 se une a ambos oligos en todas las muestras y la isoforma SRSF3-ISO2 en las células que la sobreexpresan. (B) Las células PLC/PRF/5 fueron transfectadas con siGL (control) o siSLU7 y el *RNA-pull-down* se realizó a las 48 h. Las dos isoformas SRSF3-TR inducidas tras el silenciamiento de SLU7 se unen a ambos oligos (flechas). (C) El experimento descrito en B se repitió realizando el *RNA-pull-down* con el O1 y el mismo oligo con la secuencia consenso de unión mutada (MUT). Las isoformas SRSF3-TR inducidas tras el silenciamiento de SLU7 que se unen al oligo O1 no se unen al oligo MUT.

Nuestros datos muestran que todas las isoformas de SRSF3 (ISO1 e ISO2) se unen a los motivos de unión descritos en el intrón 1 de *sororina*. Cabe mencionar que las proteínas truncadas de SRSF3 pierden parte del dominio SR de interacción con otras proteínas, aunque siguen manteniendo el dominio de unión al RNA (RRM). Por ello, postulamos que mientras que la unión de SRSF3-ISO1 es requerida para el correcto *splicing* de *sororina*, la asociación de las SRSF3-TR a los motivos presentes en el intrón 1 de *sororina* altera su *splicing*, probablemente, modificando el reclutamiento de los factores que participan en el procesamiento de su pre-mRNA. Es llamativo que esta alteración no se puede achacar a una función de SRSF3-TR como dominante negativo de SRSF3-ISO1, puesto que el silenciamiento de SRSF3 no repercute en el *splicing* del intrón.

En resumen, todos estos resultados demuestran por primera vez, que las proteínas truncadas de SRSF3 podrían tener una función propia y podrían contribuir a la generación del ambiente de inestabilidad genómica observado al silenciar la expresión de SLU7.

6. El microRNA miR-17 PREVIENE EL FENOTIPO ALTERADO DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS SILENCIADAS DE SLU7

En un trabajo previo de nuestro grupo, se demostró que la muerte de las células transformadas observada al silenciar la expresión de SLU7 dependía de la inhibición del clúster oncogénico de microRNAs miR17-92. Más en concreto, demostramos que miR-17 rescataba de la muerte a las células transformadas silenciadas de SLU7 ²⁰².

En el presente trabajo, hemos profundizado más en los eventos que anteceden la muerte programada de las células transformadas al silenciar SLU7 y hemos demostrado la inducción de una parada en el ciclo celular asociada a la alteración de la cohesión de las cromátidas hermanas.

Además, hemos demostrado el papel indispensable de la isoforma *SRSF3-ISO2* y de las proteínas truncadas de SRSF3 en el desarrollo de este fenotipo.

Por todo ello, nos preguntamos si la falta de miR-17 inducida al silenciar SLU7 podía estar participando en los eventos descritos en esta tesis.

6.1. La expresión de miR-17 corrige las alteraciones mitóticas

Así pues, en primer lugar, analizamos el efecto de miR-17 en la progresión del ciclo de las células PLC/PRF/5, HeLa y H358 silenciadas de SLU7. Como se muestra en la Figura 62, la co-transfección de miR-17 corrigió la parada en el ciclo celular inducida por la disminución de la expresión de SLU7 en las tres líneas celulares (Figura 62A). Además, miR-17 permitió la progresión en el ciclo celular de estas mismas células PLC/PRF/5 tras la eliminación del tratamiento con nocodazol durante toda la noche (Figura 62B).

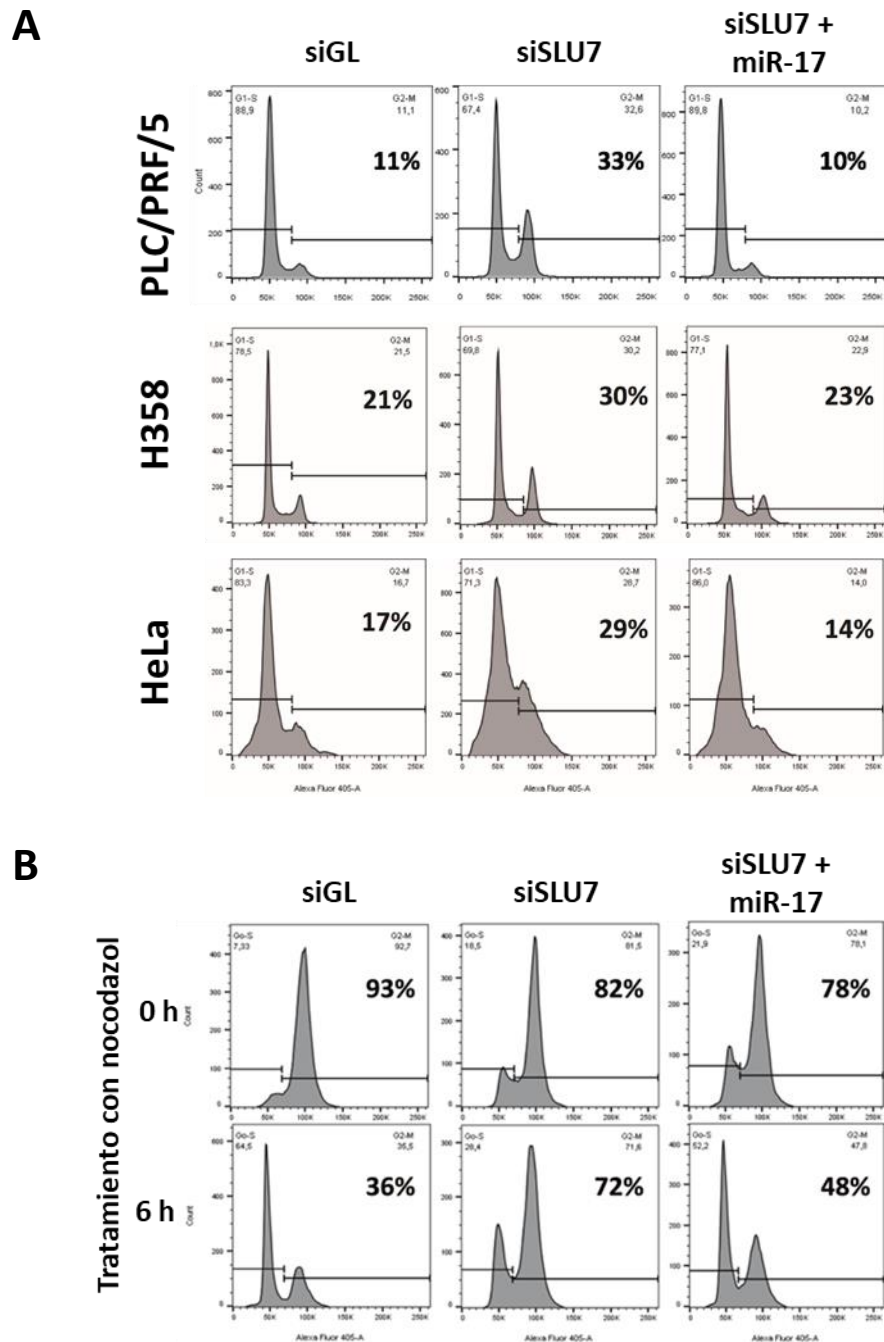


Figura 62. miR-17 previene la parada en el ciclo celular inducida al silenciar SLU7. (A) La progresión en el ciclo celular se analizó mediante FACS en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 a las 48 h tras la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M. (B) Análisis del ciclo celular por FACS de las células PLC/PRF/5 a las 48 h tras la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17 y tras el tratamiento con nocodazol durante toda la noche (0 h) o a las 6 h de cultivo tras la eliminación del tratamiento. Se indica el porcentaje de células en la fase G2/M.

A la vista de estos resultados, analizamos el estado de la cohesión entre las cromátidas hermanas en las células PLC/PRF/5 y HeLa silenciadas de SLU7 y transfectadas con miR-17. La Figura 63 muestra que la expresión de miR-17 en las células silenciadas de SLU7 corrigió la falta de cohesión recuperando la conformación típica en X de los cromosomas metafásicos.

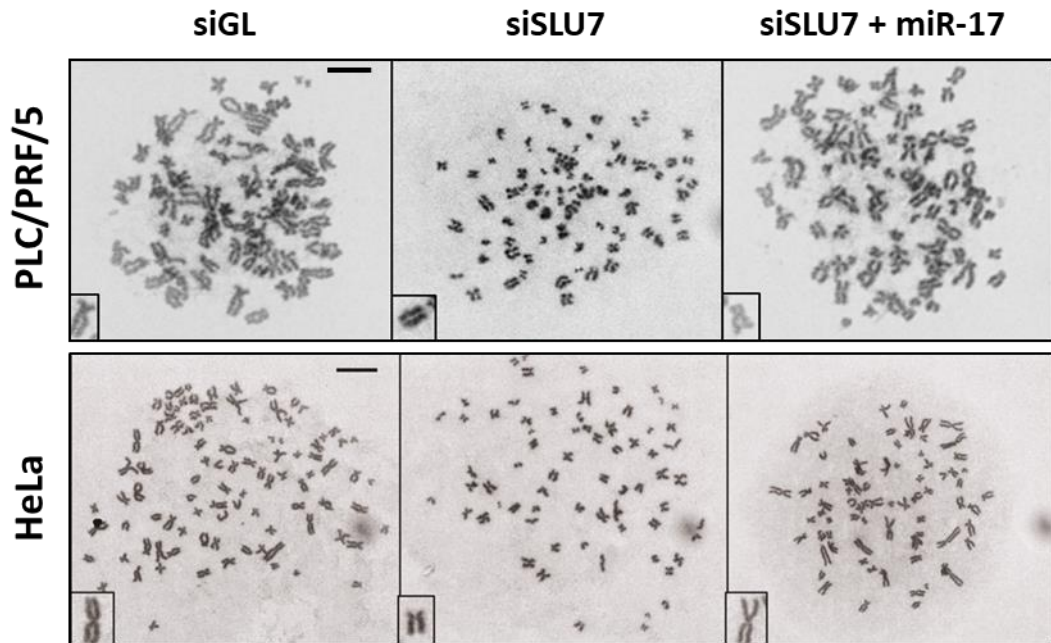


Figura 63. La expresión de miR-17 corrige la falta de cohesión entre las cromátidas hermanas inducida al silenciar SLU7. Imágenes de extensión de cromosomas en metafase de las células PLC/PRF/5 y HeLa tras 48 h de transfección de siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17 y 3 h de tratamiento con nocodazol. Barra de escala: 10 μ m. Se muestra la foto ampliada de un cromosoma característico en cada condición.

Llegados a este punto, decidimos estudiar si miR-17 revertía la alteración del *splicing* de *sororina* inducida tras el silenciamiento de la expresión de SLU7. Llamativamente, como se muestra en la Figura 64A, en las líneas celulares PLC/PRF/5, HeLa y H358 observamos que la retención aberrante del intrón 1 y 2 en las células siSLU7 se vio impedida cuando las células fueron transfectadas con miR-17. Estos mismos resultados se confirmaron mediante PCR a tiempo real (Figura 64B).

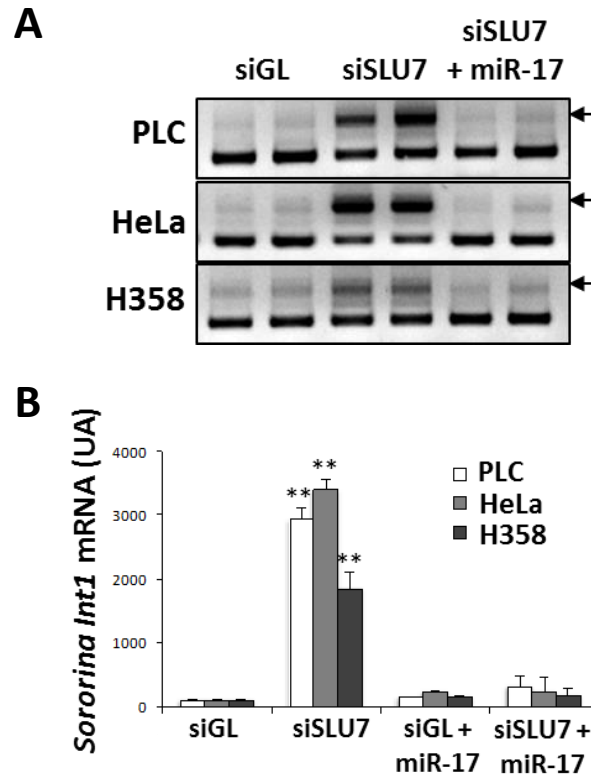


Figura 64. La expresión de miR-17 previene el *splicing* aberrante de *sororina* inducido al silenciar **SLU7.** (A) Análisis de los transcritos de *sororina* mediante la PCR3 (Figura 23) en las líneas celulares PLC/PRF/5 (PLC), HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17. Las flechas indican la incorporación aberrante del intrón 1 y 2 al mRNA de *sororina*. (B) Análisis por PCR a tiempo real de la incorporación del intrón 1 en el mRNA de *sororina* (*sororina int1*) (PCR1 de Figura 23) en las tres líneas celulares a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7, siGL+miR-17 o siSLU7+miR-17 (** $p < 0,01$ respecto al control).

De acuerdo con ello, la expresión de miR-17 en las células silenciadas de SLU7 restauró los niveles de proteína de sororina (Figura 65).

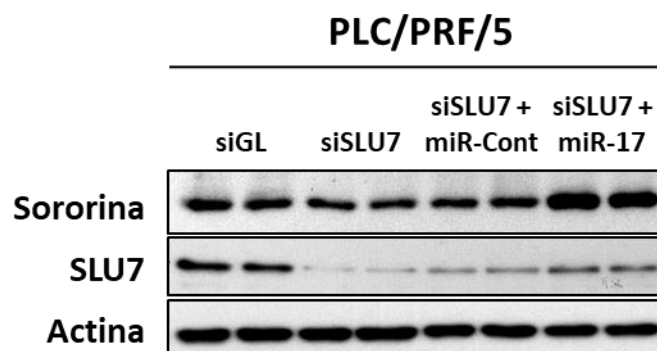


Figura 65. La expresión de miR-17 recupera la expresión de sororina en las células silenciadas de **SLU7.** Análisis mediante *Western blot* de la expresión de sororina, SLU7 y actina, como control de carga, en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7, siSLU7+miR-Control (miR-Cont) o siSLU7+miR-17.

Así pues, nuestros datos muestran que las alteraciones mitóticas que preceden a la muerte de las células transformadas inducidas al silenciar SLU7 podrían estar relacionadas con la disminución de la expresión del oncomir miR-17, dado que su transfección previene el desarrollo de este fenotipo y, por tanto, la muerte final. Puesto que nuestros datos muestran que estas alteraciones están también asociadas a la inducción del *splicing* aberrante de *SRSF3* y a la acumulación de la isoforma *SRSF3-ISO2* al silenciar SLU7, quisimos explorar si esta acumulación se podía asociar a la caída de expresión de miR-17.

6.2. Implicación de miR-17 en la regulación de la expresión de *SRSF3-ISO2*

Las células han desarrollado distintos mecanismos para evitar la acumulación y expresión de proteínas truncadas que puedan perjudicar su viabilidad, un ejemplo de ello es la regulación mediada por los microRNAs ²²⁷. En este contexto, la incorporación de un PTC en el mRNA redefine toda la secuencia corriente abajo como una secuencia de terminación 3'UTR. Estas regiones pueden incluir elementos de respuesta a microRNAs que al ser reconocidos llevan a la aceleración del proceso de deadenilación del mRNA junto con la inhibición de la traducción ²²⁷.

En este sentido, nos planteamos si la incorporación de un PTC en el exón 4 del mRNA de *SRSF3-ISO2* podría redefinir la región posterior del mRNA como 3'UTR haciéndola susceptible al reconocimiento y degradación por miR-17, y controlando así que estas isoformas truncadas de *SRSF3* no se expresen en condiciones normales.

Para verificar esta hipótesis, realizamos un análisis bioinformático para la determinación de sitios de unión de miR-17 en el exón 4 de *SRSF3*, identificándose un posible motivo de unión en esta región de estudio (Figura 66). Para estudiar si *SRSF3-ISO2* podía ser una diana de miR-17, clonamos la secuencia del exón 4 completa (pExon4) (Figura 66) fusionada a la región terminal 3' del gen de luciferasa en el plásmido reportero pMiR Luciferasa. Como control negativo, generamos otra construcción clonando el exón 4 con la secuencia semilla de miR-17 mutada (pMut) (Figura 66).

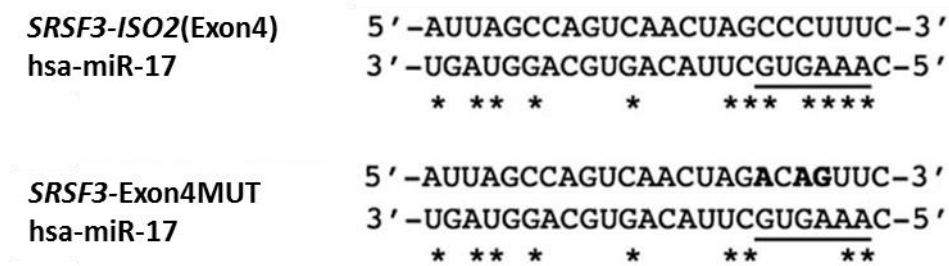


Figura 66. Posible secuencia de unión de miR-17 en el exón 4 de SRSF3. Secuencia de unión de miR-17 en el exón 4 de *SRSF3* identificada mediante análisis bioinformático. Los nucleótidos correspondientes a la secuencia semilla están subrayados. La secuencia superior corresponde al fragmento del exón 4 clonado como 3'UTR en el plásmido luciferasa pMIR-reportero (pEXON4). La secuencia inferior representa el mismo fragmento con tres mutaciones (negrita) en el motivo de reconocimiento de miR-17 clonado como control negativo (pMut).

Transfectamos ambos plásmidos en las células PLC/PRF/5 y HeLa junto con el microRNA miR-17 o un microRNA como control negativo (miR-control) y comparamos la actividad luciferasa entre las diferentes condiciones. Como se muestra en la Figura 67, en ambas líneas celulares observamos una caída significativa de la actividad luciferasa únicamente cuando fueron transfectadas con miR-17 y el plásmido del exón 4. Sin embargo, miR-17 no alteró la actividad luciferasa del plásmido Exon4 con la secuencia semilla mutada (pMut) confirmando que este exón y, por lo tanto, la isoforma *SRSF3-ISO2* es una diana de miR-17.

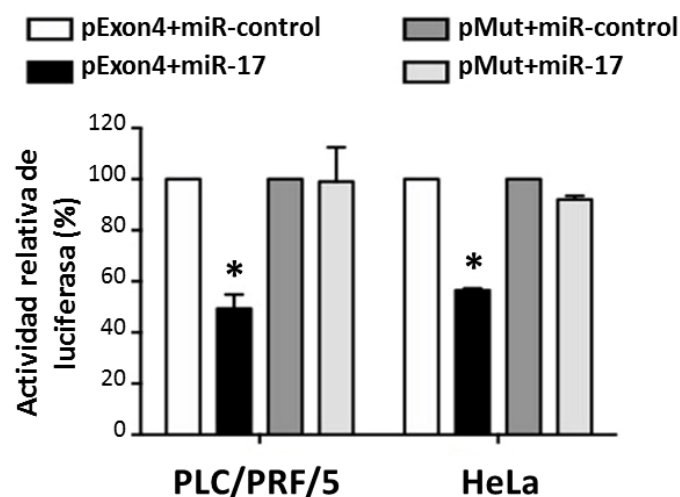


Figura 67. miR-17 se une a la secuencia semilla del exón 4 de SRSF3. Cuantificación de la actividad luciferasa de los plásmidos pExon4 y pMut (control) en presencia de miR-control o miR-17 en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HeLa (* $p < 0,05$ respecto al control pExon4+miR-control).

Finalmente, analizamos la expresión génica y proteica de SRSF3 en las células silenciadas de SLU7 y transfectadas con miR-17. Como se observa en la Figura 68A y B y confirmando lo descrito anteriormente, la expresión de miR-17 impidió la acumulación de la isoforma alternativa *SRSF3-ISO2* tras el silenciamiento de SLU7 en las tres líneas celulares. De acuerdo con ello, tampoco se detectó expresión de las proteínas truncadas de SRSF3 (SRSF3-TR) al silenciar la expresión de SLU7 en las células H358 (Figura 68C).

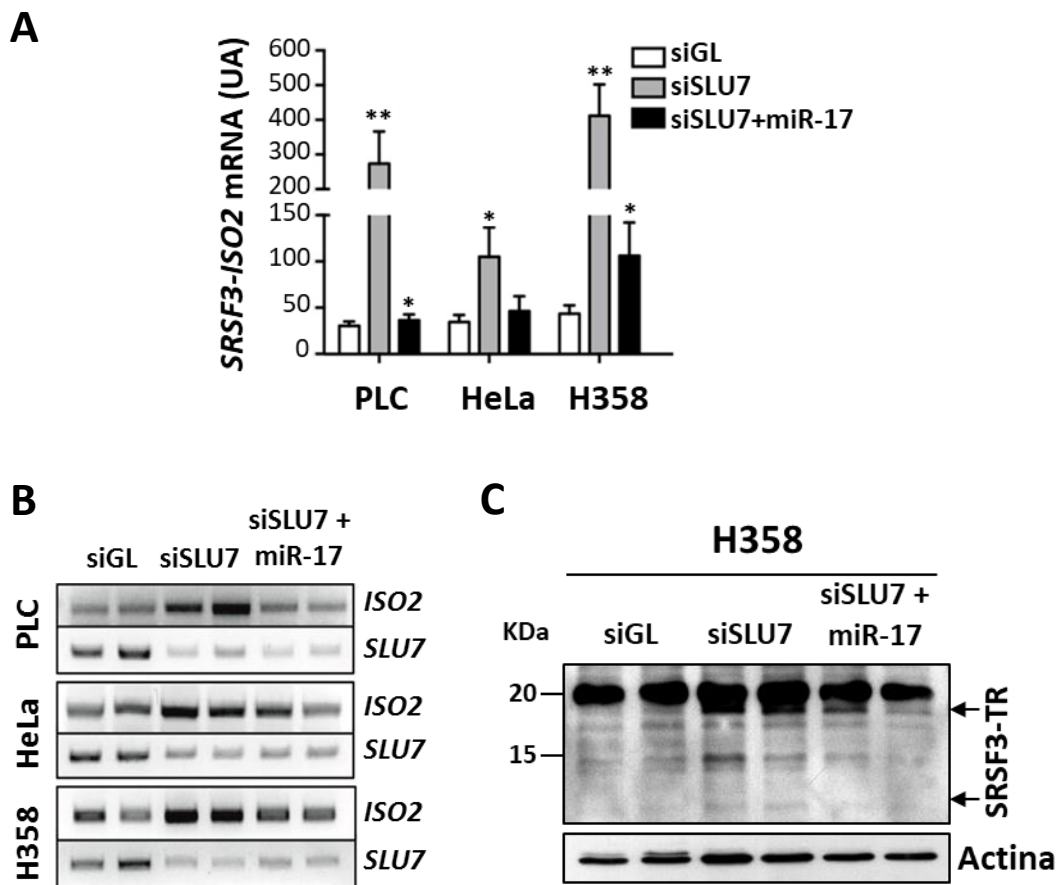


Figura 68. miR-17 previene la acumulación de SRSF3-ISO2 y la expresión de las proteínas truncadas de SRSF3. (A) Análisis por PCR a tiempo real de la incorporación del exón 4 en el mRNA de *SRSF3* (SRSF3-ISO2) (PCR2 de la Figura 36A) en las células PLC/PRF/5 (PLC), HeLa y H358 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17 (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ respecto al control en la condición de siSLU7 y respecto a siSLU7 en la condición de siSLU7+siISO2). (B) Análisis de la expresión de *SRSF3-ISO2* mediante la PCR2 (Figura 36A) y de *SLU7* en las muestras descritas en A. (C) Análisis mediante *Western blot* de SRSF3 con el anticuerpo anti-SRSF3 de Thermo Fisher Scientific y actina, como control de carga, en los extractos de proteínas de las células H358 descritas en A. Las flechas señalan la expresión de las proteínas truncadas de SRSF3 (SRSF3-TR).

Todos estos datos muestran que SLU7 es un importante regulador del *splicing* y expresión de SRSF3, evitando la expresión de *SRSF3-ISO2* y de las proteínas truncadas de SRSF3 a través de, al menos, dos mecanismos. Por un lado, SLU7 regula el *splicing* de *SRSF3* garantizando el procesamiento correcto del exón 4 (Figura 37) y favoreciendo así la expresión de la isoforma SRSF3-ISO1 y, por otro lado, controla la expresión de miR-17²⁰² que impide la acumulación del mRNA de *SRSF3-ISO2* (Figura 68).

6.3. miR-17 previene el *splicing* aberrante de *SRSF1* y la acumulación de R-loops

Una vez establecida la relación entre miR-17 y SRSF3-ISO2, decidimos estudiar el papel de miR-17 en todos los fenotipos asociados a la inducción de SRSF3-ISO2.

En primer lugar, analizamos el *splicing* de *SRSF1* en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HeLa co-transfectadas con siSLU7 y miR-17. Como se muestra en la Figura 69, la expresión de miR-17 claramente corrigió la acumulación de la variante 6 (Var 6) observada en las células PLC/PRF/5 y las variantes 2 y/o 3 (Var2,3) en las células HeLa al silenciar SLU7.

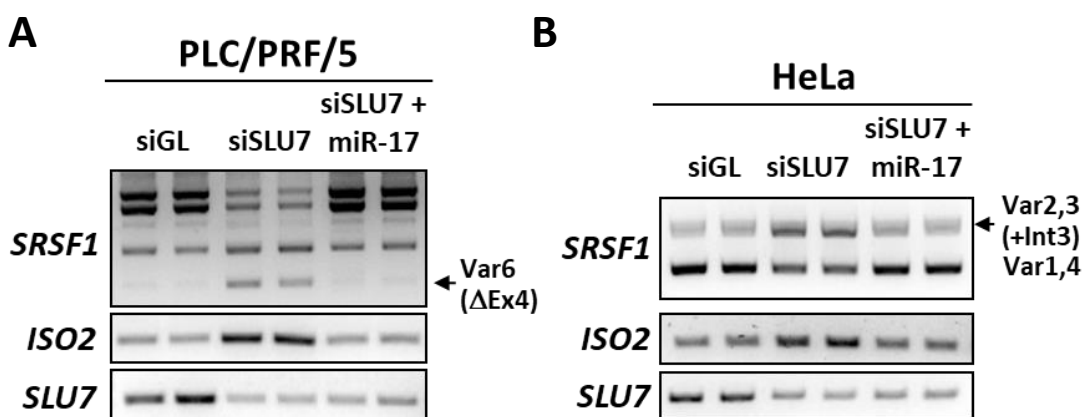


Figura 69. miR-17 previene el *splicing* aberrante de *SRSF1*. (A) Análisis mediante PCR de la expresión de *SRSF1* (PCR2 en Figura 36B), *SRSF3-ISO2* y *SLU7* en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17. La flecha indica la variante 6 (Var6). (B) Análisis mediante PCR de la expresión de *SRSF1* (PCR1 en Figura 36B), *SRSF3-ISO2* (PCR2 en Figura 36A) y *SLU7* en las células HeLa a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17. La flecha indica la variante 2 y/o 3 (Var2,3).

Por último, analizamos el efecto de la expresión de miR-17 sobre la formación de R-loops. Los resultados de microscopía de fluorescencia de las células PLC/PRF/5 (Figura 70A) revelaron una disminución significativa de la señal S9.6 (Figura 70B) en los núcleos de las células transfectadas simultáneamente con siSLU7 y miR-17, demostrando así el papel protector de miR-17 en la acumulación de R-loops inducida al silenciar SLU7.

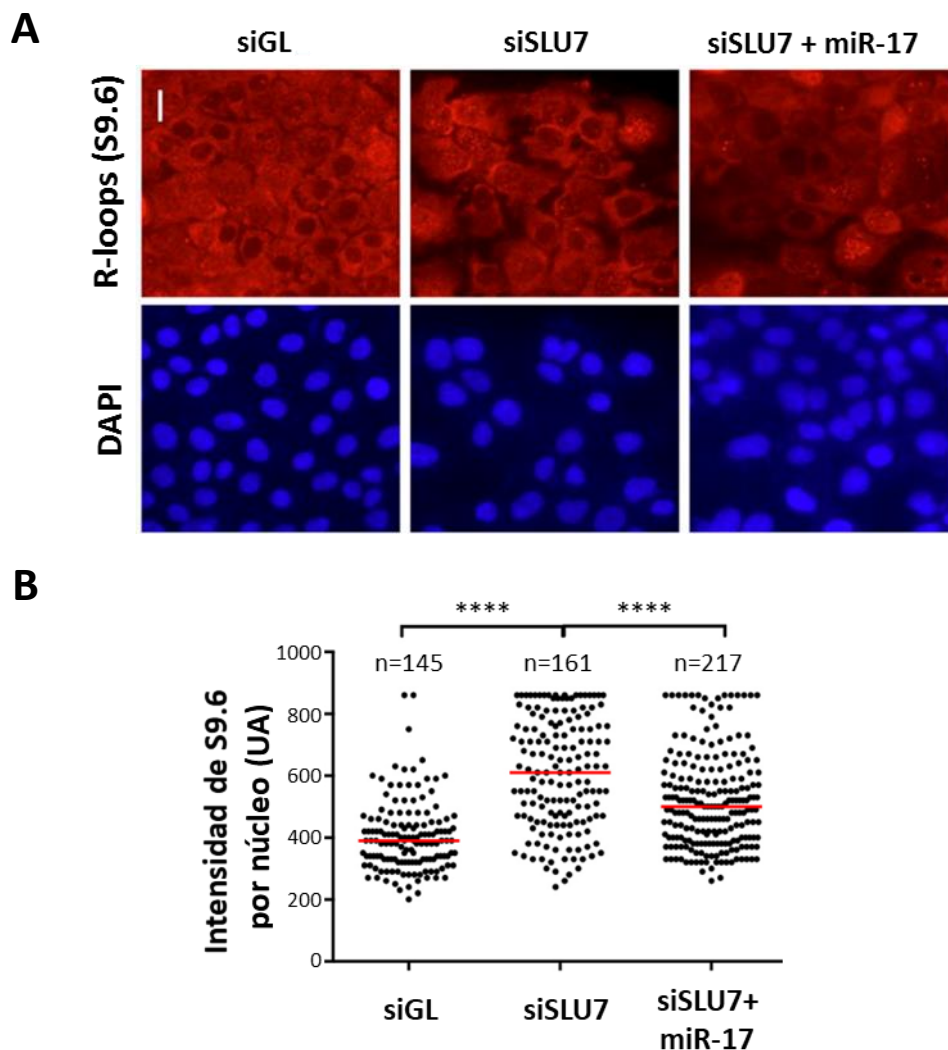


Figura 70. miR-17 previene la formación de R-loops en ausencia de SLU7. (A) Inmunofluorescencia para la detección de R-loops con el anticuerpo S9.6 (rojo) en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de la transfección con siGL (control), siSLU7 o siSLU7+miR-17. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m. (B) Cuantificación de la intensidad de S9.6 en los núcleos de las células mediante el programa *ImageJ*. La señal de DAPI se utilizó para crear una máscara del núcleo. Se indica el número de núcleos cuantificados por condición. Las barras rojas hacen referencia a la mediana de intensidad S9.6 por condición (**** $p < 0,0001$, Test U de Mann-Whitney).

En conclusión, nuestros datos confirman el papel relevante de la disminución de la expresión de miR-17 en el fenotipo desencadenado al silenciar SLU7, en gran parte mediado por el control que ejerce evitando la acumulación de la isoforma SRSF3-ISO2.

7. LA AUSENCIA DE SLU7 EN EL HÍGADO DE RATÓN INDUCE INESTABILIDAD GENÓMICA

Todos nuestros datos muestran que SLU7 actúa como un guardián del genoma que garantiza la estabilidad genética evitando la acumulación de daño en el DNA y mutaciones asociadas a la formación de R-loops, además de prevenir alteraciones cromosómicas asociadas a defectos en la segregación de los cromosomas durante la mitosis.

Por ello, en este punto decidimos estudiar este papel de SLU7 *in vivo*. En el hígado, los hepatocitos presentan un fenotipo quiescente con una mínima tasa de proliferación. Sin embargo, tras una hepatectomía parcial (HP), el hígado adquiere una enorme capacidad regenerativa entrando los hepatocitos de forma sincronizada en la fase G1 del ciclo celular para dividirse y recuperar así la masa hepática perdida ²²⁸.

En nuestros estudios previos, describimos el papel esencial de SLU7 *in vivo* en la preservación de la identidad hepatocelular, presentándose como un factor imprescindible para la expresión de genes fundamentales del mantenimiento tanto de la función metabólica del hígado como de su quiescencia ¹⁸⁹. De hecho, nuestros datos previos muestran que la disminución de la expresión hepática de SLU7 promueve la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular tanto en un hígado en estado normal como tras la HP ¹⁸⁹. Además, observamos que los niveles endógenos de SLU7 caen rápidamente tras la HP de manera transitoria recuperándose ya a las 3 horas tras la HP ¹⁸⁹.

7.1. La ausencia de SLU7 compromete el proceso de regeneración hepática

En base a todos estos datos, decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de SLU7 en la progresión del ciclo celular de los hepatocitos, así como, en la capacidad regenerativa del hígado tras la HP. La inhibición de la expresión de SLU7 se realizó utilizando los virus adenoasociados (AAV) ya descritos ¹⁸⁹, bajo un promotor hepatoespecífico que expresa un shRNA específico de SLU7 (AAV-shSLU7) o un shRNA control (AAV-Ren). Los ratones se sacrificaron a diferentes tiempos tras la HP (Figura 71).

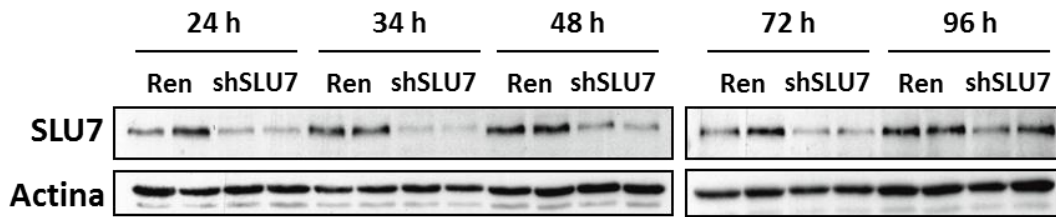


Figura 71. Silenciamiento de SLU7 en los ratones hepatectomizados. Análisis mediante *Western blot* del silenciamiento de SLU7 en los ratones sacrificados a las 24, 34, 48, 72 y 96 h de la HP realizada a los 21 días tras la inyección de los virus adenoasociados (AAV) que codifican un shRNA control (AAV-Ren) o un shRNA específico de SLU7 (AAV-shSLU7). Se muestra el *Western blot* de actina como control de carga.

La evaluación del estado de proliferación de los hepatocitos se analizó mediante inmunohistoquímica de Ki-67²²⁹. Como se muestra en la Figura 72, los ratones operados no hepatectomizados (SH) en los que se silenció la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7) presentaron un aumento en el número de hepatocitos en proliferación, confirmando nuestros datos previos de que la reducción de la expresión de SLU7 promueve la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular¹⁸⁹.

Llamativamente, a pesar de la entrada temprana en el ciclo celular, la disminución de SLU7 (AAV-shSLU7) repercutió de manera evidente en la progresión normal de la mitosis de los ratones hepatectomizados. En concreto, los ratones control AAV-Renila presentaron un pico de hepatocitos en proliferación a las 48 horas tras HP con un elevado número de hepatocitos en anafase (Figura 72). Sin embargo, en los ratones en los que se inhibió la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7), a este tiempo detectamos un menor número de hepatocitos en proliferación y a diferencia de los ratones control, estos hepatocitos se encontraban en prometafase (Figura 72). Estas figuras prometafásicas fueron persistentes a las 72 y 96 horas tras la HP indicando que la inhibición de la expresión de SLU7 condicionaba considerablemente la progresión en la mitosis.

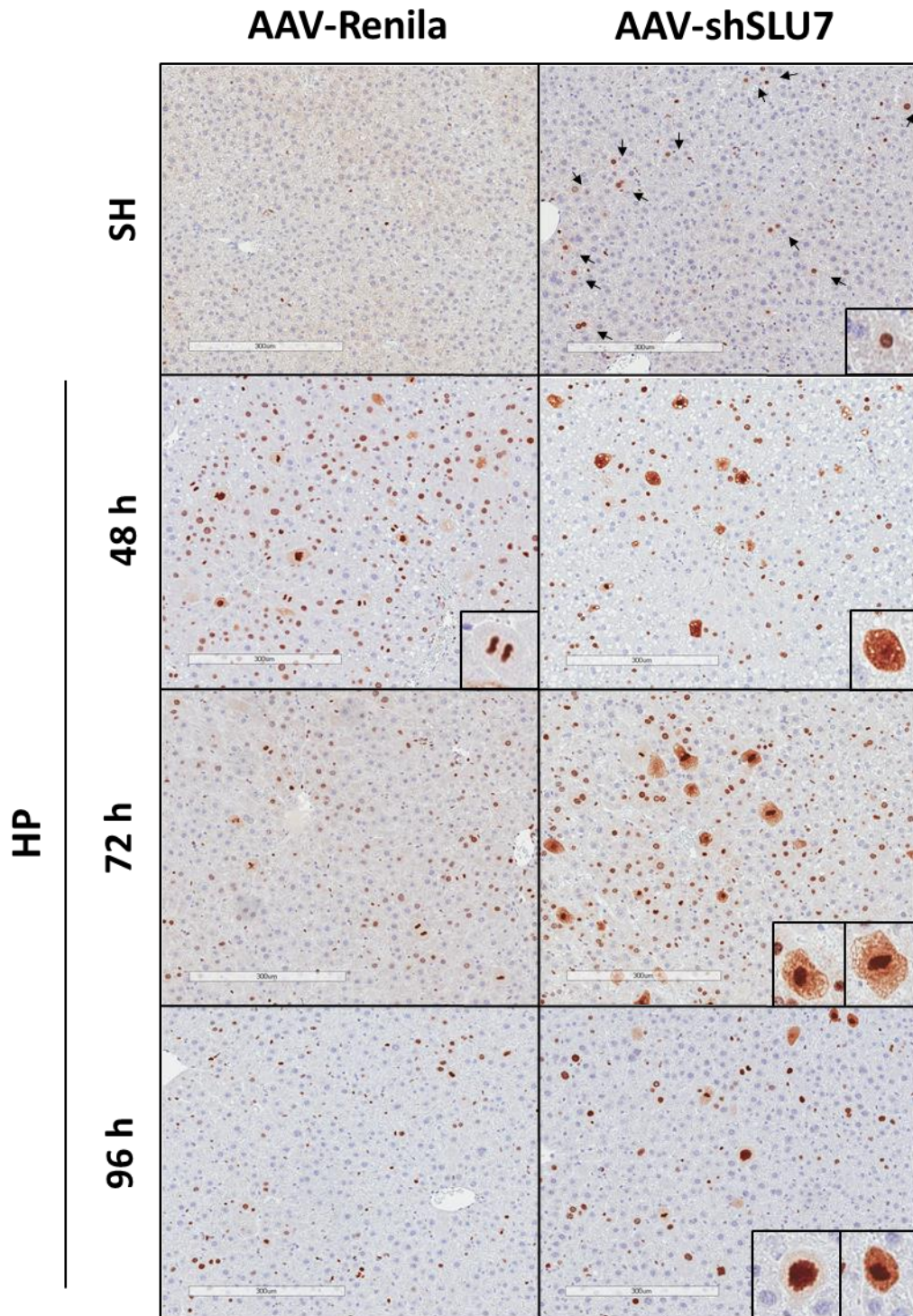


Figura 72. SLU7 es esencial para la progresión en el ciclo celular *in vivo* tras la hepatectomía parcial. Inmunohistoquímica de Ki-67 en el hígado de ratones operados control (SH, *sham*) o en los ratones sacrificados a las 48, 72 y 96 h de la HP realizada a los 21 días tras la inyección de los virus adenoasociados (AAV) que codifican un shRNA control (AAV-Renilla) o un shRNA específico de SLU7 (AAV-shSLU7). Las IHQ fueron contrastadas con hematoxilina-eosina. Las flechas señalan los hepatocitos en proliferación (n=5 ratones por grupo). Barra de escala: 300 μm.

Esta interrupción en la progresión del ciclo celular repercutió considerablemente en la recuperación de la masa hepática de los ratones AAV-shSLU7. Como podemos observar en la Figura 73, la pérdida inicial de masa hepática fue similar en ambos grupos de ratones (AAV-Renila y AAV-shSLU7). Sin embargo, a las 96 horas tras la HP los ratones control (AAV-Renila) habían recuperado su masa hepática inicial, mientras que los ratones AAV-shSLU7 presentaron desde el inicio un retraso significativo en dicha recuperación, y a las 96 horas aún no habían alcanzado su peso inicial.

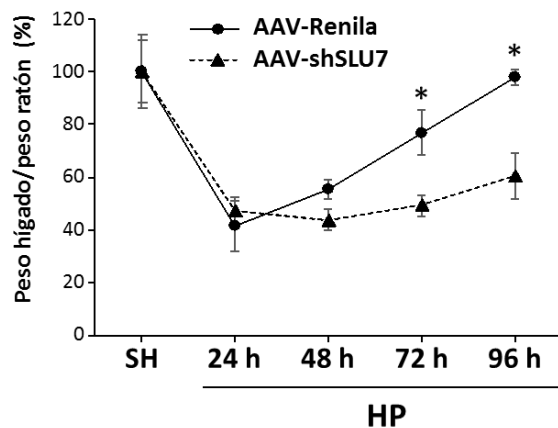


Figura 73. La inhibición de SLU7 en el hígado de ratón condiciona la recuperación de la masa hepática tras la hepatectomía parcial. Se representa en porcentaje la relación entre el peso del hígado y el peso del ratón en los ratones AAV-Renila (control) y AAV-shSLU7 a las 24, 48, 72 y 96 h tras la hepatectomía parcial (HP) respecto a los ratones no hepatectomizados (SH) (* $p < 0,05$ respecto al control) (n=5 ratones por grupo).

7.2. La disminución de la expresión de SLU7 en el hígado promueve el *splicing* aberrante de *sororina* durante la regeneración tras la hepatectomía parcial

Tras confirmar que la disminución de la expresión de SLU7 repercute en la progresión de la mitosis de los ratones hepatectomizados, decidimos evaluar si los mecanismos moleculares implicados estaban relacionados con los descritos *in vitro*.

En primer lugar, analizamos la expresión de *sororina* tras la HP en los ratones. A las 24 horas tras la HP, ambos grupos de ratones mostraron una ligera inducción de la expresión total de *sororina* (Figura 74A). No obstante, a las 34 horas los ratones control (AAV-Renila) presentaron un incremento muy significativo de la expresión

de *sororina* que no se observó en los ratones AAV-shSLU7 (Figura 74A). De forma significativa, a las 24 horas tras la HP estos ratones (AAV-shSLU7) presentaron un incremento de la isoforma aberrante de *sororina* que resulta de la incorporación del intrón 1 a su mRNA (Figura 74B y C). De acuerdo con todo ello, en este mismo punto, observamos una disminución de los niveles de la proteína sororina en los ratones AAV-shSLU7 (Figura 74D). Además, estos ratones presentaron un aumento de la expresión de los marcadores de mitosis MAD2, que sugiere la activación del punto de control de ensamblaje del huso acromático, y de P21, un inhibidor fundamental del ciclo celular inducido en situaciones de estrés (Figura 74D). Todo ello confirmó la presencia de alteraciones mitóticas en los ratones AAV-shSLU7.

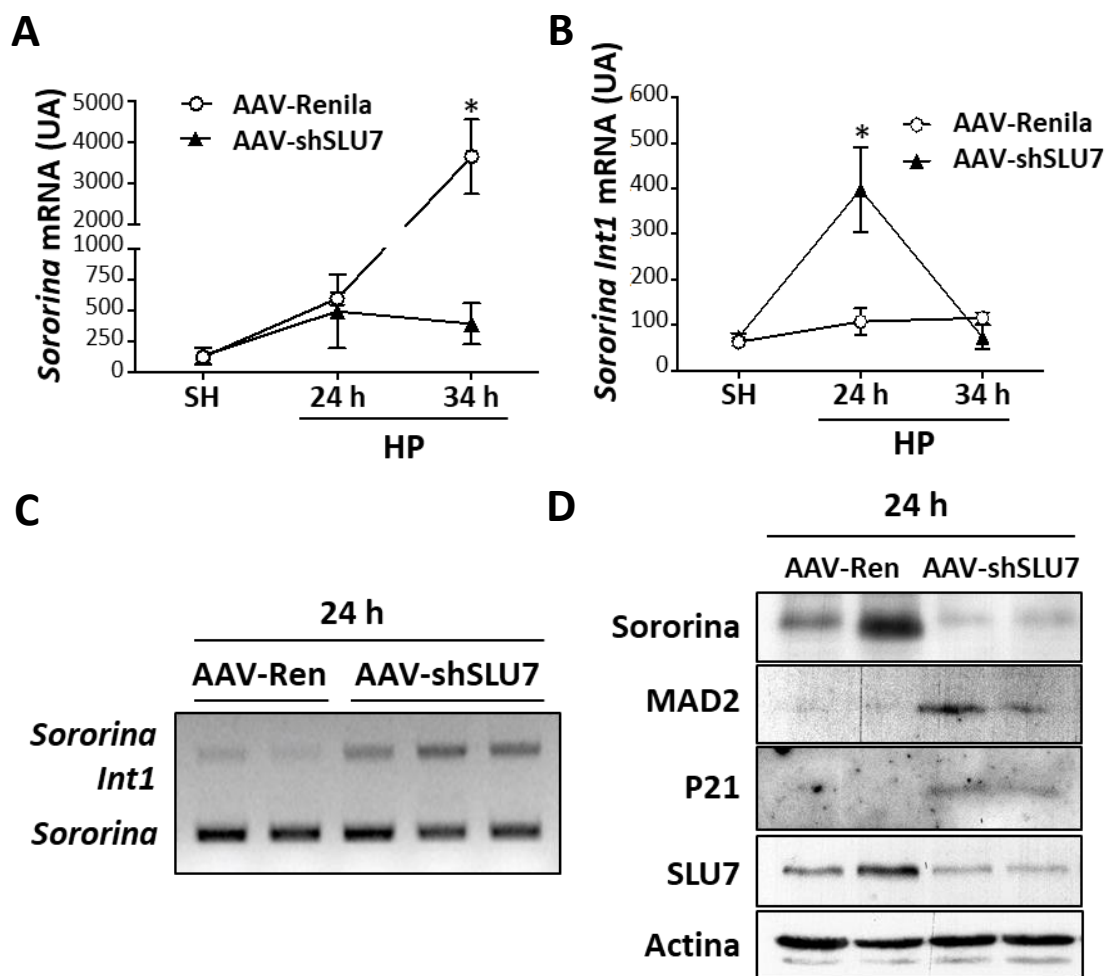


Figura 74. SLU7 es necesario para el correcto *splicing* y expresión de *sororina* *in vivo*. (A) PCR a tiempo real de la expresión del mRNA de *sororina* en el hígado de los ratones AAV-Renila (control) y AAV-shSLU7 sometidos a la cirugía control (SH) y a las 24 y 34 h tras la HP (* $p < 0,05$ respecto al control) (n=5 ratones por grupo). (B) PCR a tiempo real para detectar la incorporación aberrante del intrón 1 en el mRNA de *sororina* (PCR1 Figura 23) en las muestras descritas en A. (* $p < 0,05$ respecto al control) (C) Análisis mediante la PCR3 (Figura 23) de la incorporación aberrante del intrón 1 en el mRNA de *sororina* en los ratones AAV-Renila (AAV-Ren) y AAV-shSLU7 a las 24 h de la HP. (D) Análisis mediante *Western blot* de la expresión de sororina, MAD2, P21, SLU7 y actina como control de carga en el hígado de los ratones AAV-Renila (AAV-Ren) y AAV-shSLU7 a las 24 h de la HP.

Estos resultados demuestran que SLU7 es necesario para el correcto *splicing* y expresión de sororina en el hígado, y para la correcta progresión de la mitosis durante la regeneración hepática. Además, de acuerdo con los resultados *in vitro* anteriormente descritos, sugiere que SLU7 juega un papel *in vivo* en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

De acuerdo con ello, y como se muestra en la Figura 75, a las 24 horas tras la HP los ratones AAV-shSLU7 presentaron un incremento de los niveles de γ -H2AX confirmando la acumulación de daño en el DNA en estos ratones.

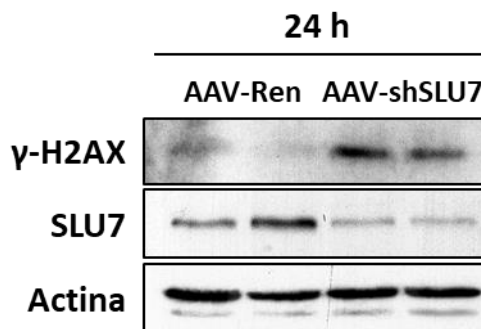


Figura 75. El silenciamiento de SLU7 *in vivo* induce daño en el DNA tras la hepatectomía parcial. Análisis mediante *Western blot* de γ -H2AX, SLU7 y actina, como control de carga, en los ratones AAV-Renila (AAV-Ren) y AAV-shSLU7 a las 24 h de la hepatectomía parcial.

7.3. SLU7 es esencial para mantener la estabilidad genómica en el hígado del ratón

Nuestros resultados muestran la relevancia del mantenimiento de unos niveles adecuados de SLU7 para la correcta progresión en el ciclo celular y para la preservación de la estabilidad genómica también *in vivo*.

En trabajos previos, hemos demostrado que la expresión de SLU7 está significativamente disminuida en el hígado humano enfermo¹⁷². Además, se ha descrito la presencia de niveles elevados de γ -H2AX no sólo en el HCC, sino también en etapas pre-neoplásicas como la cirrosis¹⁰. En base a los presentes resultados, la reducción de la expresión de SLU7 podría estar asociada a la inducción de inestabilidad genómica durante la progresión de la enfermedad hepática. Por ello, quisimos explorar si esa reducción en el hígado sano promovía un ambiente de inestabilidad genómica que, en definitiva, pudiera favorecer la evolución hacia el HCC.

Como se muestra en la Figura 76, la inhibición de la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7) en el hígado sano favoreció la presencia de daño en el DNA de los hepatocitos, puesto de manifiesto por el aumento de la fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX) tanto por *Western blot* (Figura 76A) como por IHQ (Figura 76B).

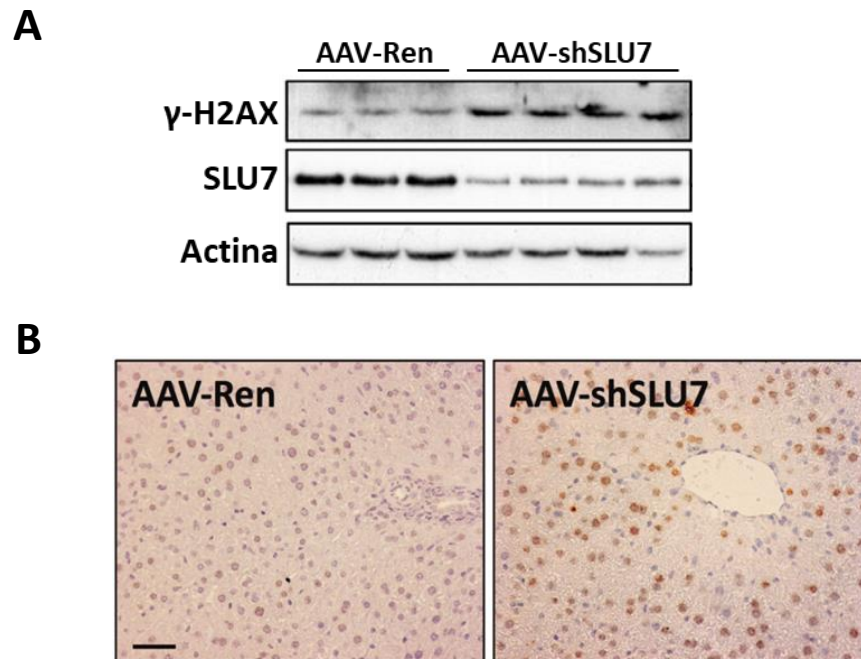
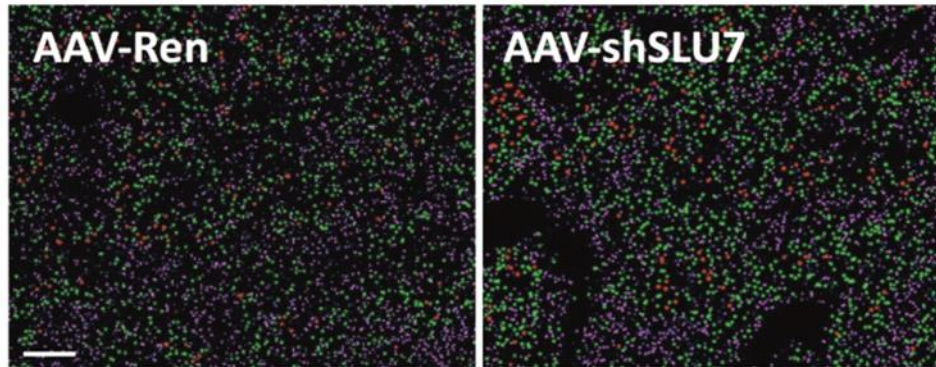


Figura 76. El silenciamiento de SLU7 promueve la inducción de daño en el DNA en el hígado del ratón. (A) Análisis mediante *Western blot* de la expresión de γ -H2AX, SLU7 y actina como control de carga en los hígados de ratones a los 21 días tras la inyección con los virus AAV control (AAV-Ren) y AAV-shSLU7. (B) IHQ de γ -H2AX en los hígados de los ratones control (AAV-Ren) y AAV-shSLU7. Barra de escala: 30 μ m.

Además, fuimos capaces de comprobar que los ratones AAV-shSLU7 presentaban una alteración en la ploidía nuclear de los hepatocitos (Figura 77B). En concreto, la inhibición de la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7) incrementó significativamente el número de hepatocitos octoploides (8n). Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis inicial de que la disminución de la expresión de SLU7 puede contribuir a promover la inestabilidad genómica.

A



B

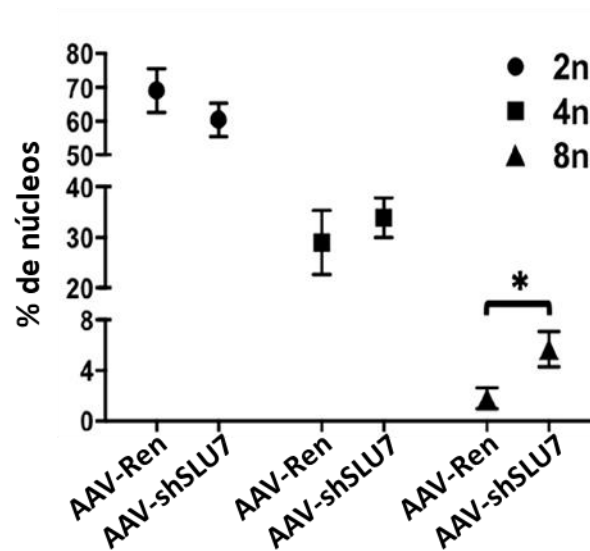


Figura 77. El silenciamiento de SLU7 compromete la ploidía de los hepatocitos en el hígado del ratón. (A) Imágenes de la ploidía en los hígados de los ratones control (AAV-Ren) y AAV-shSLU7. Los núcleos 2n se marcan en morado, los 4n en verde y los 8n en rojo. Barra de escala 150 μ m. (B) Cuantificación de la ploidía a partir de las imágenes descritas en el apartado A. Se muestra el porcentaje de núcleos 2n, 4n y 8n. (n=4 ratones por grupo) (*p<0,05).

7.4. Papel *in vivo* de las proteínas SRSF3-TR: expresión en la patología hepática

Por último, evaluamos la expresión de SRSF3-ISO2 *in vivo*. Llamativamente, en los ratones AAV-shSLU7 en reposo se detectó una acumulación de la isoforma alternativa de SRSF3 (*Srsf3-Iso2*) que no se observó en los ratones control (AAV-Ren) (Figura 78). Estos resultados consolidan nuestros datos *in vitro* y sugieren un papel de SLU7 *in vivo* en la regulación de SRSF3 para asegurar la estabilidad genómica.

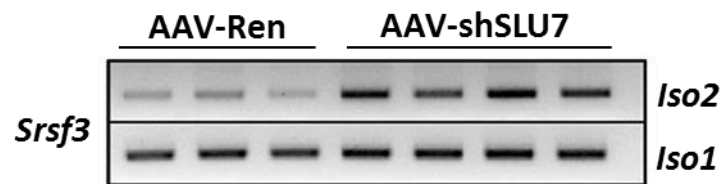


Figura 78. SLU7 impide la expresión de *Srsf3-Iso2* *in vivo*. Análisis de la PCR1 (Figura 36A) para la detección de la isoforma 1 de SRSF3 (*Iso1*) y de la PCR2 (Figura 36A) para la detección de la isoforma 2 (*Iso2*) en los hígados de los ratones control (AAV-Ren) y AAV-shSLU7 en reposo.

Llegados a este punto, decidimos evaluar la expresión de SRSF3-ISO2 en el hígado de pacientes con cirrosis o HCC. Como se muestra en la Figura 79, la expresión del mRNA de *SRSF3-ISO2* se vio significativamente aumentada en los pacientes con cirrosis o HCC, de acuerdo con la expresión disminuida de SLU7 observada previamente en estas mismas patologías hepáticas ¹⁷².

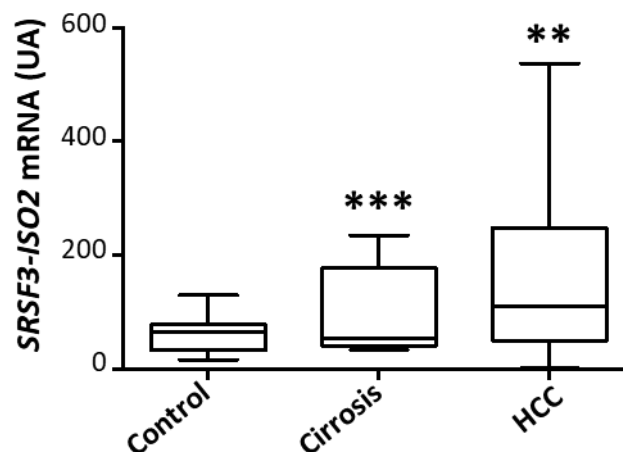


Figura 79. La expresión de *SRSF3-ISO2* se asocia con la progresión de la patología hepática. Análisis de PCR a tiempo real de la isoforma *SRSF3-ISO2* (PCR2 Figura 36A) en muestras de tejido hepático humano control (n=10), cirrótico (n=24) o hepatocarcinoma (HCC) (n=22), (**p<0,01 y ***p<0,001 respecto al control).

Nuestros datos *in vitro* mostraron que las formas truncadas de SRSF3 codificadas por la isoforma SRSF3-ISO2 inducida al silenciar SLU7 alteran el *splicing* de *sororina* comprometiendo la progresión normal de la mitosis. Vista la inducción de *SRSF3-ISO2* en los hígados de los pacientes, decidimos estudiar si también se desencadenaban estos mecanismos. Para ello, decidimos realizar un ensayo de *RNA-pull down* con el oligo O1 del intrón 1 de *sororina* en muestras de hígados humanos para analizar la unión de las proteínas truncadas de SRSF3. Preparamos mezclas de 3 hígados control (CO), 3 cirróticos (CI) y 3 HCCs (HCC). Como se observa

en la Figura 80A, en las muestras de HCC y en menor medida en las cirróticas, fuimos capaces de detectar un aumento de las proteínas SRSF3-TR de acuerdo con el patrón de expresión inducido *in vitro* al silenciar SLU7 (Figura 61B). Estos resultados demuestran por primera vez la presencia de formas truncadas de SRSF3 en el hígado enfermo.

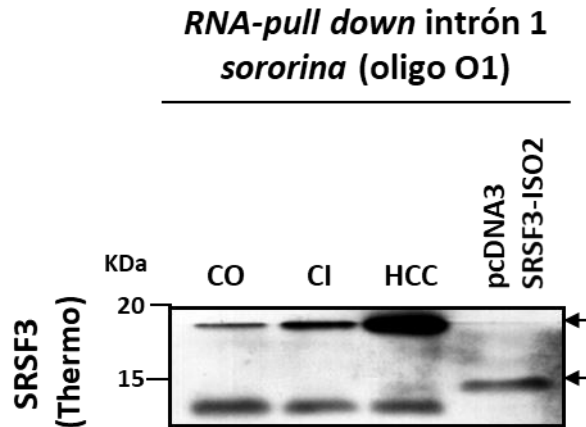


Figura 80. Las formas truncadas SRSF3-TR están presentes en el hígado enfermo humano y podrían regular el *splicing* de *sororina*. Detección mediante *Western blot* de SRSF3 (Thermo) en el extracto proteico de hígados control (CO), hígados cirróticos (CI) y HCC obtenidos tras el *RNA-pull-down* con el oligo de RNA biotilado O1, que contienen la secuencia consenso de unión de SRSF3 en el intrón 1 de *sororina*. Las flechas señalan las proteínas SRSF3-TR que se unen al intrón 1 de *sororina* que corresponden con las proteínas inducidas al silenciar la expresión de SLU7.

En definitiva, nuestro trabajo demuestra que SLU7 juega un papel relevante preservando la estabilidad genómica tanto *in vitro* como *in vivo*, en gran parte, a través del correcto *splicing* y expresión de SRSF3 y miR-17. Además, demostramos por primera vez que las isoformas aberrantes de SRSF3 juegan un papel en la inducción de inestabilidad genómica. De forma relevante, sugerimos que estos mecanismos pueden contribuir considerablemente a la progresión de la enfermedad hepática.

DISCUSIÓN

La estabilidad genómica es esencial para garantizar la homeostasis y viabilidad celular, así como para preservar la fidelidad en la transmisión de la información genética entre generaciones celulares. El genoma está sujeto a constantes variaciones que a menudo son parte de la evolución natural de la especie. No obstante, en diferentes situaciones que incluyen la persistente exposición a agentes nocivos, la integridad celular puede verse comprometida estableciéndose alteraciones en el genoma, que si no son detectadas y reparadas con eficacia pueden suponer la iniciación y la progresión de la transformación maligna ^{1,2}. Así pues, la inestabilidad genómica se considera una de las condiciones facilitadoras de la transformación oncogénica al permitir a la célula adquirir las habilidades requeridas para proliferar de manera ilimitada preservando su viabilidad ^{2,3,6}. Esta inestabilidad puede asociarse a la inducción de daño en el DNA con la subsiguiente fijación de mutaciones puntuales o de reordenamientos cromosómicos, o al establecimiento de inestabilidad cromosómica (CIN) que supone la pérdida o ganancia en el número de cromosomas (aneuploidía) debido a alteraciones mitóticas ^{1,5,15,49,230}.

Dada la relevancia de la estabilidad genómica, las células poseen numerosos mecanismos para preservar la integridad del genoma participando en la prevención, la detección y la reparación de las alteraciones ^{3,231,232}. Estos sistemas de supervisión dependen de un correcto patrón de expresión génica, que incluye tanto la regulación de la maquinaria de transcripción como del *splicing* ^{44,121}.

En este sentido, recientemente se ha demostrado que la transcripción puede repercutir de forma directa, sin mediar alteraciones de la expresión génica, en la inducción de inestabilidad genómica o TAGIN ^{14,17,23,27,233}. Por ejemplo, se ha observado que las restricciones topológicas de la hebra de DNA suponen un obstáculo para el avance de la maquinaria de transcripción, ralentizando su progresión normal y prolongando el tiempo en el que la hebra no transcrita queda accesible a posibles agresiones de agentes genotóxicos ^{12,14,17,29,234}. Así mismo, una de las mayores fuentes de TAGIN es el estrés replicativo asociado a conflictos entre la transcripción y la replicación ^{14,27,33,233}. La competición por la misma hebra de DNA puede facilitar el encuentro y colisión entre ambas maquinarias dando lugar a estrés de replicación e inestabilidad genómica ^{27,33}. Por último, una fuente indiscutible de TAGIN supone la acumulación de R-loops o estructuras híbridas de RNA:DNA sin resolver ^{14,17,33,235}. Los R-loops se forman de manera co-transcripcional cuando la hebra de RNA sintetizada hibrida de manera estable con la hebra complementaria de DNA, dejando a la hebra de DNA no transcrita expuesta y accesible a posibles agresiones ^{26,35}. Se ha observado que la asociación co-transcripcional a la hebra nascente de mRNA de diferentes miembros de los complejos proteicos que participan en su metabolismo evita la formación de R-loops y, por consiguiente, previene el asentamiento de inestabilidad genómica en las células ^{38,43,44,106,111}.

De esta forma, los factores que participan en el procesamiento del mRNA regulan el mantenimiento de la estabilidad genómica a diferentes niveles. Por un lado, de forma indirecta, regulando la transcripción y el *splicing* de genes implicados en la respuesta al daño en el DNA y en la mitosis y, por otro lado, de forma directa previniendo la formación de R-loops durante la transcripción ^{44,106,121}.

En la presente tesis hemos demostrado que el factor de *splicing* SLU7 juega un papel fundamental no redundante en la preservación de la integridad genómica, evitando la TAGIN a través de la prevención de la formación de R-loops, e impidiendo la acumulación de alteraciones mitóticas asegurando el correcto emparejamiento de las cromátidas hermanas.

SLU7 es un factor de *splicing* conservado, que se asocia con otras proteínas para formar el complejo del espliceosoma encargado de garantizar la fidelidad en la selección del sitio 3' de *splicing* (dinucleótido AG) ⁸⁷⁻⁸⁹. Nuestro grupo ha demostrado que la expresión del mRNA de *SLU7* está disminuida en el hígado de los pacientes con cirrosis y en el HCC ¹⁷². A su vez, cuando se inhibe la expresión de SLU7 en los hepatocitos de ratones, mediante virus adenoasociados que expresan un shRNA específico (AAV-shSLU7), se pierde el fenotipo diferenciado del hepatocito, incluidas sus funciones metabólicas y la quiescencia ¹⁸⁹. Todo ello sugiere que la pérdida de la expresión de SLU7 observada a lo largo de la patología hepática participa en la progresiva desdiferenciación y pérdida de función del hígado característica de los pacientes, y podría además facilitar la transformación maligna de los hepatocitos ¹⁴⁹.

De acuerdo con los datos presentados en esta tesis, la caída de la expresión de SLU7 durante el proceso de hepatocarcinogénesis favorecería, además, la inestabilidad genómica. SLU7 es necesario para evitar la acumulación de R-loops, que como hemos mencionado son fuente importante de inestabilidad asociada a la transcripción. De hecho, las lesiones en el DNA observadas al disminuir la expresión de SLU7, puestas de manifiesto por el incremento del marcador de daño γ -H2AX ¹⁰⁶, están estrechamente relacionadas con la acumulación de R-loops, disminuyendo significativamente en presencia de la ribonucleasa H1 (RNasa H1). Los experimentos realizados *in vivo* ponen de manifiesto la relevancia de SLU7 en el mantenimiento de la estabilidad genómica, ya que su silenciamiento en el hígado de ratón mediante el AAV-shSLU7 induce un incremento de γ -H2AX. Estos datos junto con la presencia de daño en el DNA, descrita en el hígado cirrótico de los pacientes ¹⁰, sugieren un papel de la disminución de la expresión de SLU7 en el desarrollo de inestabilidad genómica durante el proceso de hepatocarcinogénesis.

Sin embargo y llamativamente, a pesar de la disminución gradual de la expresión de SLU7 que acompaña la evolución de la enfermedad hepática hasta el HCC ¹⁷², su

expresión en las células transformadas es esencial para su supervivencia ²⁰². De hecho, uno de los objetivos principales de esta tesis ha sido comprender por qué SLU7 afecta a la viabilidad de las células transformadas de diferente origen y no a la de los hepatocitos normales ²⁰². En los últimos años, numerosos estudios han evidenciado el papel central del complejo del espliceosoma en la progresión normal de las distintas etapas de la mitosis. La pérdida de su función conduce a la catástrofe mitótica entendida como la muerte celular en respuesta a la acumulación excesiva de anomalías mitóticas sin resolver ^{118,121,122,236,237}. Nuestros datos muestran que SLU7 es necesario para una correcta progresión del ciclo celular, y que la muerte programada de las células transformadas tras el silenciamiento de SLU7 está precedida, además, por la acumulación de R-loops y de lesiones en el DNA y por una parada prolongada en la mitosis. La disminución de SLU7 en las células transformadas resulta en figuras mitóticas alteradas con un incorrecto ensamblaje del huso acromático, una activación prolongada del sistema de control del ensamblaje del huso acromático y una falta de cohesión entre las cromátidas hermanas. Todos estos eventos mitóticos contribuirían al daño en el DNA, la aneuploidía celular y la inestabilidad genómica. En las células transformadas, esta exacerbación de los niveles de inestabilidad genómica ya existentes, junto con el estrés replicativo generado por la presencia de R-loops en estas células con alta tasa de proliferación comprometerían de forma más específica su viabilidad ²³⁸⁻²⁴¹. Numerosos autores sugieren explotar la sensibilidad de las células transformadas al estrés replicativo como una nueva estrategia terapéutica contra el cáncer ^{12,241,242}. Por todo ello, el silenciamiento de SLU7 podría representar una nueva diana terapéutica.

Nuestros datos muestran que SLU7 es requerido para la correcta progresión de la mitosis en un contexto de proliferación *in vivo* de células no transformadas, como es el proceso de la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial (HP). Los hepatocitos son células quiescentes que presentan una gran capacidad regenerativa como respuesta compensatoria a la muerte celular inducida por un daño hepático o ante la pérdida de masa hepática ²⁴³. Tras una HP, los hepatocitos entran en el ciclo celular de una manera sincronizada y controlada, y proliferan con el fin de reestablecer el parénquima hepático sin llegar a comprometer la funcionalidad del hígado ^{244,245}. Anteriormente, observamos que la expresión de SLU7 está sujeta a una regulación muy precisa que garantiza el éxito de la regeneración hepática ¹⁸⁹. La entrada en el ciclo celular de los hepatocitos tras la HP requiere de la disminución inmediata de la expresión de SLU7. Esta inhibición de la expresión permite la activación de la transcripción de genes mitogénicos que regulan la salida de la fase G0 y la entrada en G1 ¹⁸⁹. Sin embargo, a las 3 horas tras la HP hay una recuperación de los niveles de mRNA de *SLU7* ¹⁸⁹, y los datos de esta tesis demuestran que esta recuperación es necesaria para permitir una correcta progresión en la mitosis y restablecimiento de la masa hepática. De acuerdo con ello, los ratones AAV-shSLU7

hepatectomizados, a pesar de presentar una entrada anticipada en el ciclo celular, presentan una acumulación de figuras mitóticas aberrantes incluso a las 72 horas tras la HP, además de daño en el DNA, activación del punto de control del ensamblaje del huso acromático y un significativo retraso en la recuperación de la masa hepática.

No sólo hemos demostrado que SLU7 es un factor fundamental para mantener la estabilidad genómica impidiendo la acumulación de lesiones durante la transcripción y la mitosis, sino que también hemos caracterizado los mecanismos moleculares implicados.

Como se ha mencionado anteriormente, otros factores con capacidad de unión al RNA que participan en su metabolismo han sido involucrados en la prevención de la formación de R-loops^{38,43,44,106,111}. Por tanto, el papel protector de SLU7 frente a la TAGIN como componente del espliceosoma podría ser directo, mediante su interacción con la hebra de RNA que se está sintetizando durante el proceso de transcripción y de *splicing*. Sin embargo, también podría actuar de una manera indirecta. Las proteínas SRSF1, SRSF2 y SRSF3 fueron las primeras proteínas de unión al RNA implicadas en la preservación de la integridad genómica¹¹¹. Habiendo demostrado el papel de SLU7 en la regulación de SRSF3¹⁸⁹ y dada la compleja relación entre SRSF3 y SRSF1^{183,224}, las alteraciones en estas proteínas podrían también estar implicadas en el fenotipo descrito al silenciar SLU7.

Numerosas evidencias sugieren que existe una red de regulación estrictamente controlada entre los factores que regulan el *splicing*. Estos factores garantizan tanto su expresión coordinada como unos niveles de expresión adecuados^{246,247}, dado que cambios modestos en los niveles de expresión de estos factores pueden tener efectos muy relevantes^{248,249}. El ejemplo mejor estudiado es la autorregulación y la regulación mutua de las proteínas de la familia SR^{99,100,246,250}. Así, SRSF1 y SRSF3 se regulan mutuamente²²⁴, de forma que la disminución de SRSF3 resulta en un aumento de las isoformas de SRSF1 reguladas por NMD y la consiguiente disminución de los niveles de SRSF1¹⁸³. A su vez, SRSF1 impide la incorporación del exón 4 de SRSF3 en la isoforma *SRSF3-ISO2*, manteniendo los niveles de la proteína SRSF3 codificada por la isoforma *SRSF3-ISO1*⁹⁸. En relación con la autorregulación, SRSF1 promueve la inducción de su *splicing* alternativo para generar isoformas que serán sustrato de la maquinaria NMD⁹⁹. De igual forma, un incremento en la concentración de SRSF3 favorece el *splicing* alternativo de su propio gen, promoviendo la retención del exón 4 para producir el transcrito *SRSF3-ISO2* diana de la NMD^{98,225}.

En esta compleja red de regulación, nuestros datos muestran que los niveles de SLU7 juegan un importante papel para que SRSF1 y SRSF3 se expresen de manera

correcta. Como se ha mencionado, anteriormente habíamos demostrado que la disminución de la expresión de SLU7 repercute en el procesamiento normal del gen de SRSF3 induciendo la acumulación de la isoforma *SRSF3-ISO2*¹⁸⁹. Ahora sabemos que esta desregulación del *splicing* se debe a la interacción directa de SLU7 con el gen de SRSF3 para promover la exclusión del exón 4 y mantener la expresión de la proteína completa SRSF3 a partir de la isoforma *SRSF3-ISO1*. Nuestros datos además muestran que la isoforma SRSF3-ISO2, inducida al silenciar SLU7, es responsable de la alteración del *splicing* de SRSF1 induciendo la expresión de las isoformas reguladas por la NMD y la consiguiente disminución de la proteína SRSF1. Esta disminución, como se ha indicado anteriormente, podría participar en la inducción de los R-loops¹¹¹ tras el silenciamiento de SLU7.

Llamativamente, en nuestro estudio la significativa inducción de la isoforma SRSF3-ISO2 tras el silenciamiento de SLU7 no va acompañada de una clara disminución de los niveles de la proteína SRSF3. Sin embargo, el fenotipo inducido al silenciar SLU7, incluida la formación de los R-loops y las alteraciones de la mitosis, depende claramente de la inducción de SRSF3-ISO2. En los últimos años, se ha observado que la generación de la variante de *splicing* *SRSF3-ISO2* puede dar lugar a una proteína truncada (SRSF3-TR) en condiciones de estrés^{197,198}, y el silenciamiento de SLU7 en las células transformadas está asociado a la inducción de estrés oxidativo²⁰². Se postula que en estas situaciones, la inhibición de la maquinaria de la NMD impide la degradación de los mensajeros sin sentido llevando a la acumulación de *SRSF3-ISO2* en el citoplasma¹⁹⁸. Esta isoforma codifica para una proteína truncada de SRSF3 de menor tamaño la cual conserva intacto el dominio de reconocimiento de RNA (RRM), común a la isoforma 1 de SRSF3. Sin embargo, carece de la mayor parte del dominio SR, el cual se fosforila de manera diferencial para regular la localización de la proteína y su interacción con otras proteínas¹⁹⁸. La utilización de un anticuerpo frente al dominio RRM de SRSF3 nos ha permitido detectar la acumulación de proteínas truncadas de SRSF3 (SRSF3-TR) tras el silenciamiento de la expresión de SLU7 expresadas a partir del transcrito *SRSF3-ISO2*. Estas proteínas truncadas podrían actuar como dominante negativo de SRSF3, como lo sugiere el hecho de que el silenciamiento de SRSF3 copia el fenotipo del silenciamiento de SLU7 en cuanto a la inducción de la expresión de la diana de SRSF3 *p53β*, la alteración del *splicing* de *SRSF1* o la inducción de R-loops. Sin embargo y llamativamente, el efecto dominante negativo de las proteínas SRSF3-TR sobre la actividad de SRSF3 no puede explicar la alteración del *splicing* de *sororina*, responsable de la falta de cohesión de las cromátidas hermanas y de la parada en la mitosis inducida al silenciar SLU7. Estos datos sugieren que las isoformas SRSF3-TR pueden poseer también funciones específicas.

La especificidad de la interacción de las proteínas SR con el pre-mRNA está dictada por el dominio RRM⁹⁴ que interacciona con secuencias consenso, en el caso de SRSF3 ricas en pirimidinas⁹⁵. Nuestro análisis bioinformático identificó dos motivos conservados de unión para la proteína SRSF3 en el intrón 1 del gen de *sororina*⁹⁷ y confirmamos, que tanto la proteína completa codificada por la isoforma *SRSF3-ISO1* como las proteínas truncadas de SRSF3 son capaces de unirse a estas secuencias de RNA. Sin embargo, la retención del intrón 1 en el mensajero de *sororina* sólo es evidente cuando están presentes las proteínas SRSF3-TR, bien inducidas tras el silenciamiento de SLU7 o bien tras su sobreexpresión. Además, el *splicing* aberrante de *sororina* no es promovido tras el silenciamiento de la expresión de SRSF3, lo cual excluye un efecto dominante negativo de SRSF3-TR sobre SRSF3. Por todo ello, postulamos que las proteínas SRSF3-TR unidas al intrón 1 de *sororina* podrían presentar un patrón de interacciones con otros factores de *splicing* diferente a la isoforma completa debido a su reducido dominio SR, el cual induce su inclusión. Nuestros datos muestran que las proteínas truncadas de SRSF3 no sólo pueden actuar como dominante negativo de SRSF3, sino que también pueden presentar funciones específicas. Y ponen de manifiesto, que en cualquier caso sus funciones comprometen a través de diferentes mecanismos la estabilidad genómica e incluso la supervivencia, al menos, de las células transformadas.

Es importante resaltar que nuestro trabajo muestra por primera vez la acumulación de la isoforma *SRSF3-ISO2* y de las proteínas SRSF3-TR en los hígados de pacientes cirróticos y en los HCC, lo cual podría estar asociado con la disminución observada de la expresión de SLU7¹⁷², y sugeriría un posible papel de estas isoformas en el proceso patológico.

En relación con la expresión de las proteínas truncadas SRSF3-TR, al silenciar SLU7 se detectan al menos dos bandas de SRSF3-TR que desaparecen al silenciar la expresión de SRSF3-ISO2 con un siRNA específico dirigido al exón 4. Estas bandas también se detectan en las muestras de hígado de los pacientes. Sin embargo, llama la atención que este patrón de bandas no se reproduce cuando se sobreexpresa la isoforma SRSF3-ISO2 tras ser clonada en un plásmido, detectándose sólo la banda de alrededor de 15 KDa y no la de 20 KDa. En la actualidad no somos capaces de explicar esta discrepancia entre la expresión endógena dependiente de SRSF3-ISO2 y la exógena.

Todos nuestros datos muestran que una de las funciones principales de SLU7 es asegurar el correcto *splicing* de *SRSF3* e impedir la acumulación de las proteínas codificadas a partir de la isoforma aberrante *SRSF3-ISO2*. En este sentido, hemos identificado al menos dos mecanismos por los que SLU7 impide la expresión de SRSF3-ISO2. Por un lado, SLU7 regula directamente el *splicing* de *SRSF3* promoviendo

la exclusión del exón 4 y la expresión de la isoforma SRSF3-ISO1. Por otro lado, SLU7 induce la expresión del microRNA oncogénico miR-17²⁰², que aquí hemos demostramos que degrada a la isoforma SRSF3-ISO2.

La inclusión o exclusión diferencial de un exón o un intrón puede suponer un cambio del marco de lectura, que a menudo lleva a la generación de un mensajero sin sentido por la incorporación de un PTC. La localización de estos PTCs 50-55 nucleótidos por encima de la última unión exón-exón hace, que el complejo EJC localizado en esta unión active a la maquinaria NMD para mediar la degradación del mRNA sin sentido^{227,251}. En estas condiciones, la secuencia situada a continuación del PTC adquiere las características de una región 3' no traducida (3'UTR). En estas regiones 3'UTR se localizan la mayoría de las secuencias de reconocimiento de otro sistema de regulación post-transcripcional, los microRNAs²²⁷. Los microRNAs son importantes represores de la expresión genética incorporándose en el complejo de silenciamiento mediado por RNA, RISC (*RNA-induced silencing complexes*), para inducir el silenciamiento del mensajero diana^{252,253}. Tras la incorporación de un PTC, la presencia de elementos de respuesta a un microRNA en la nueva región 3'UTR supondrá la degradación del mRNA sin sentido por el microRNA. De esta forma, los microRNAs suponen otro sistema de vigilancia contra la acumulación de mRNA sin sentido²²⁷.

En un trabajo anterior, demostramos que SLU7 se une al locus *C13orf25* y promueve la retención de los intrones 2 y 3 en el transcrito B y la expresión del clúster oncogénico de microRNAs, miR17-92²⁰². En dicho trabajo postulamos que la inhibición de la expresión de miR-17 tras el silenciamiento de SLU7, y la subsiguiente inducción de sus genes diana P21 y BIM participarían en la muerte por apoptosis inducida en las células transformadas²⁰². Nuestros datos actuales confirman el importante papel de miR-17 en la supervivencia celular, evitando además la acumulación de la isoforma alterada de SRSF3 (SRSF3-ISO2) que incorpora el exón 4.

En resumen, nuestros resultados muestran que SLU7 es esencial para mantener la integridad genómica y la progresión en la mitosis (Figura 81). SLU7 previene la formación de R-loops asociados a la transcripción, los cuales pueden ser responsables de la inducción de daño en el DNA y del estrés replicativo. Por otro lado, SLU7 regula la transcripción y/o el *splicing* de múltiples genes y ocupa un relevante papel en la jerarquía de regulación de los genes implicados en el procesamiento del RNA, siendo fundamental para mantener la correcta expresión de SRSF3 y SRSF1. En el hígado, SLU7 es fundamental para mantener la correcta expresión de factores de transcripción, enzimas y proteínas esenciales para la preservación de las funciones metabólicas del hígado y para asegurar la correcta progresión en la mitosis durante el proceso de regeneración hepática. Todas estas funciones fundamentales de SLU7

suponen que cambios modestos de su expresión o localización puedan tener efectos muy relevantes, induciendo así la dediferenciación, la proliferación y la inestabilidad genómica asociadas al proceso de hepatocarcinogénesis ²⁵⁴.

Así mismo, la dependencia de las células transformadas de la expresión de SLU7 para su supervivencia, debido probablemente al impacto del estrés replicativo asociado a su silenciamiento, podría ser explotada como una nueva estrategia terapéutica para el cáncer.

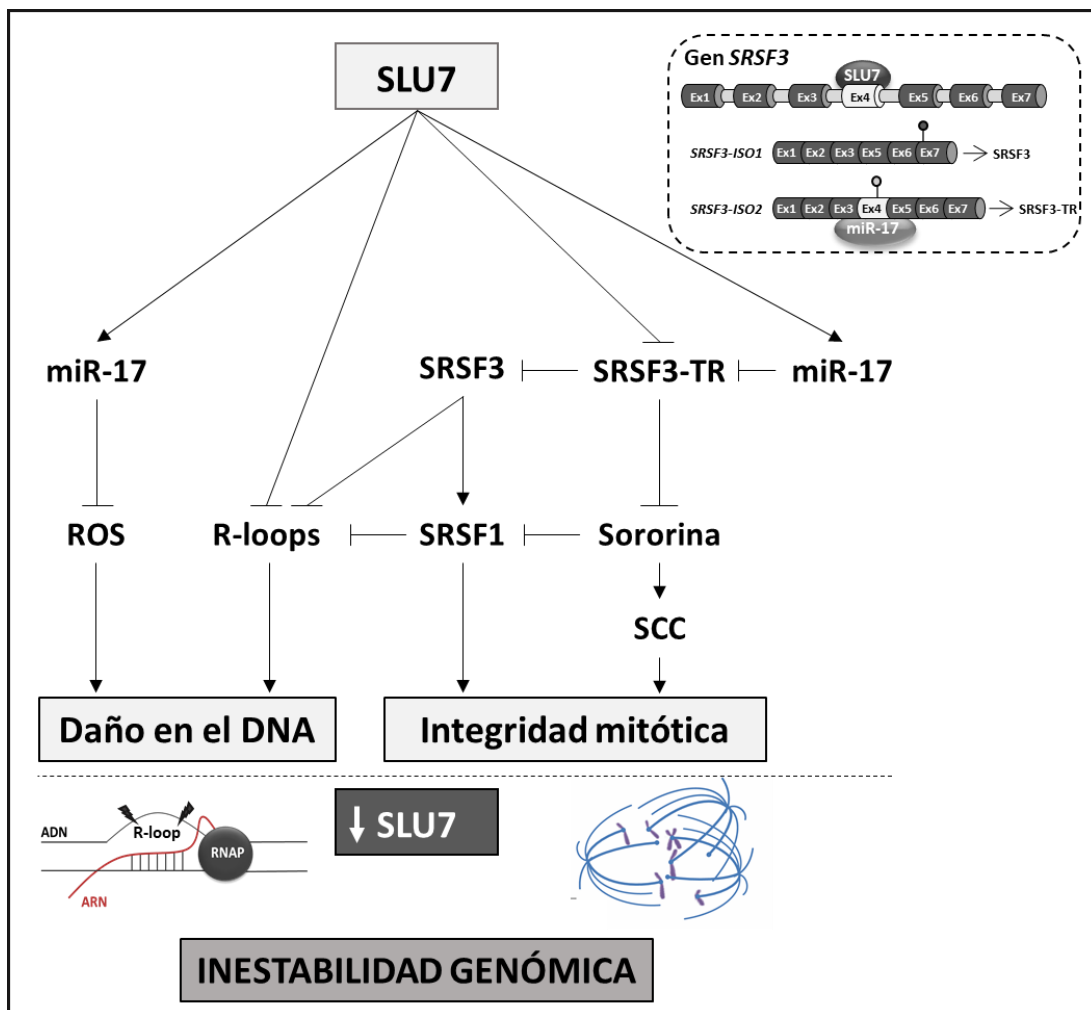


Figura 81. Representación esquemática del mecanismo de regulación por el cual SLU7 garantiza la preservación de la integridad genómica. SLU7 regula entre otros la expresión de SRSF3 y miR-17, para impedir la inducción de estrés oxidativo y R-loops y asegurar la correcta expresión de SRSF1 y sororina. En el panel superior de la derecha, se representa la regulación directa del *splicing* de *SRSF3* mediada por SLU7.

CONCLUSIONES

1. El factor de *splicing* SLU7 es esencial para mantener la estabilidad genómica al prevenir la inducción de daño en el DNA asociado a la transcripción (TAGIN) y las alteraciones cromosómicas asociadas a anomalías mitóticas, eventos que promueven la transformación maligna e iniciación de la carcinogénesis.
2. SLU7 es necesario para la correcta progresión de la mitosis regulando el *splicing* y la expresión de sororina, la cohesión de las cromátidas hermanas y el ensamblaje del huso mitótico.
3. SLU7 previene la formación de híbridos RNA:DNA o R-loops y la inducción de daño en el DNA durante la transcripción mediante la interacción directa con la hebra de RNA naciente y/o la correcta expresión de los factores de *splicing* SRSF1 y SRSF3.
4. SLU7 es fundamental para el correcto *splicing* y expresión de SRSF3 que a su vez regula a SRSF1. SLU7 controla la expresión de SRSF3 a través de al menos dos mecanismos: a) Por un lado, su unión al pre-mRNA de *SRSF3* promueve el procesamiento del exón 4 para expresar la isoforma completa *SRSF3-ISO1*, y prevenir la expresión de la isoforma alternativa *SRSF3-ISO2*, y b) por otro lado, la inducción de la expresión del microRNA oncogénico miR-17 que mediante su unión al exón 4 de *SRSF3-ISO2* favorece su degradación.
5. SLU7 previene la expresión de proteínas truncadas de SRSF3 (SRSF3-TR) a partir de la isoforma *SRSF3-ISO2*.
6. Las proteínas SRSF3-TR inducidas al silenciar la expresión de SLU7 pueden actuar como dominantes negativos de la proteína completa SRSF3, desregulando el *splicing* y la expresión de SRSF1 e induciendo la acumulación de R-loops.
7. Las proteínas SRSF3-TR pueden unirse de forma específica al intrón 1 de *sororina* para interferir en su procesamiento y repercutir en la expresión de su proteína y, por tanto, en la pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas y en la progresión en la mitosis.
8. El mantenimiento de los niveles normales de SLU7 en el hígado es esencial para evitar la poliploidización e impedir la acumulación de la isoforma *SRSF3-ISO2* y de daño en el DNA.

9. El mantenimiento de los niveles normales de SLU7 en el hígado es esencial para asegurar una correcta respuesta regenerativa tras la hepatectomía parcial. La disminución hepatoespecífica de su expresión resulta en un retraso en la recuperación de la masa hepática debido a una alteración de la progresión de la mitosis e inducción de la inestabilidad genómica.

10. La expresión de la isoforma *SRSF3-ISO2* y de las proteínas SRSF3-TR aumenta en los pacientes cirróticos y en el HCC en paralelo con la disminución de la expresión de SLU7, pudiendo contribuir a la inestabilidad genómica que precede al hepatocarcinoma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera, A. & García-Muse, T. Causes of Genome Instability. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 1–32 (2013).
2. Yixin, Y. & Dai, W. Genomic Instability and Cancer. *J. Carcinog. Mutagen.* **5**, (2014).
3. Shen, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 1–3 (2011).
4. Surova, O. & Zhivotovsky, B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* **32**, 3789–3797 (2013).
5. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913 (2005).
8. Bartkova, J. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870 (2005).
9. Rey, S. *et al.* Liver damage and senescence increases in patients developing hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 1480–1486 (2017).
10. Matsuda, Y. *et al.* DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. *Sci. World J.* **2013**, 597095 (2013).
11. Tubbs, A. & Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **168**, 644–656 (2017).
12. Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 276–280 (2015).
13. Blumenfeld, B., Ben-Zimra, M. & Simon, I. Perturbations in the Replication Program Contribute to Genomic Instability in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
14. Kim, N. & Jinks-Robertson, S. Transcription as a source of genome instability. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 204–214 (2012).
15. Levine, M. S. & Holland, A. J. The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev.* **32**, 620–638 (2018).
16. Glover, T. W., Wilson, T. E. & Arlt, M. F. Fragile sites in cancer: more than meets the eye. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 489–501 (2017).
17. Gaillard, H. & Aguilera, A. Transcription as a Threat to Genome Integrity. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 291–317 (2016).
18. Kotsantis, P. *et al.* Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer. *Nat. Commun.* **7**, 1–13 (2016).

19. Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. & Lambert, S. A. E. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 154–164 (2014).
20. Gaillard, H., Herrera-Moyano, E. & Aguilera, A. Transcription-Associated Genome Instability. *Chem. Rev.* **113**, 8638–8661 (2013).
21. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
22. Pfeiffer, P., Goedecke, W. & Obe, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15**, 289–302 (2000).
23. Sebastian, R. & Oberdoerffer, P. Transcription-associated events affecting genomic integrity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, 1–11 (2017).
24. Chan, Y. A., Hieter, P. & Stirling, P. C. Mechanisms of genome instability induced by RNA processing defects. *Trends Genet.* **30**, 245–253 (2014).
25. Lee, T. I. & Young, R. A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell* **152**, 1237–1251 (2013).
26. Aguilera, A. & García-Muse, T. R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. *Mol. Cell* **46**, 115–124 (2012).
27. Prado, F. & Aguilera, A. Impairment of replication fork progression mediates RNA polIII transcription-associated recombination. *EMBO J.* **24**, 1267–1276 (2005).
28. Ma, J. & Wang, M. D. DNA supercoiling during transcription. *Biophys. Rev.* **8**, 75–87 (2016).
29. Tuduri, S. *et al.* Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1315–1324 (2009).
30. Wang, G. & Vasquez, K. M. Effects of Replication and Transcription on DNA Structure-Related Genetic Instability. *Genes (Basel)*. **8**, 17 (2017).
31. Belotserkovskii, B. P., Tornaletti, S., D’Souza, A. D. & Hanawalt, P. C. R-loop generation during transcription: Formation, processing and cellular outcomes. *DNA Repair (Amst)*. **71**, 69–81 (2018).
32. Bermejo, R., Lai, M. S. & Foiani, M. Preventing Replication Stress to Maintain Genome Stability: Resolving Conflicts between Replication and Transcription. *Mol. Cell* **45**, 710–718 (2012).
33. García-Muse, T. & Aguilera, A. Transcription-replication conflicts: How they occur and how they are resolved. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 553–563 (2016).
34. Kotsantis, P., Petermann, E. & Boulton, S. J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov.* **8**, 537–555 (2018).

35. Sollier, J. & Cimprich, K. A. R-Loops Breaking Bad. *Trends Cell Biol.* **25**, 514–522 (2016).
36. Casellas, R. *et al.* Mutations, kataegis, and translocations in B lymphocytes: towards a mechanistic understanding of AID promiscuous activity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 164–176 (2016).
37. Skourti-Stathaki, K. & Proudfoot, N. J. A double-edged sword : R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev.* **28**, 1384–1396 (2014).
38. Santos-Pereira, J. M. & Aguilera, A. R loops: New modulators of genome dynamics and function. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 583–597 (2015).
39. Amon, J. D. & Koshland, D. RNase H enables efficient repair of R-loop induced DNA damage. *Elife* **5**, 1–20 (2016).
40. Maréchal, A. & Zou, L. RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Res.* **25**, 9–23 (2015).
41. Nguyen, H. D. *et al.* Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH1. *Mol. Cell* **65**, 832–847.e4 (2017).
42. Wahba, L., Amon, J. D., Koshland, D. & Vuica-Ross, M. RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability. *Mol. Cell* **44**, 978–988 (2011).
43. Santos-Pereira, J. M., Herrero, A. B., Moreno, S. & Aguilera, A. Npl3, a new link between RNA-binding proteins and the maintenance of genome integrity. *Cell Cycle* **13**, 1524–1529 (2014).
44. Wickramasinghe, V. O. & Venkitaraman, A. R. RNA processing and genome stability: cause and consequence. *Mol. Cell* **61**, 496–505 (2016).
45. Nishida, K., Kuwano, Y., Nishikawa, T., Masuda, K. & Rokutan, K. RNA binding proteins and genome integrity. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–13 (2017).
46. McGranahan, N., Burrell, R. A., Endesfelder, D., Novelli, M. R. & Swanton, C. Cancer chromosomal instability: Therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep.* **13**, 528–538 (2012).
47. Giam, M. & Rancati, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: A jackpot to chaos. *Cell Div.* **10**, 1–12 (2015).
48. Bakhoun, S. F. & Compton, D. A. Chromosomal instability and cancer : a complex relationship with therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* **122**, 1138–1143 (2012).
49. Thompson, S. L., Bakhoun, S. F. & Compton, D. A. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr. Biol.* **20**, R285–R295 (2010).

50. Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol.* **1170**, 29–40 (2014).
51. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **22**, R966–980 (2012).
52. Dalton, W. B. & Yang, V. W. The role of prolonged mitotic checkpoint activation in the formation and treatment of cancer. *Futur. Oncol.* **5**, 1363–1370 (2009).
53. Schuyler, S. C., Wu, Y.-F. & Kuan, V. J.-W. The Mad1-Mad2 balancing act - a damaged spindle checkpoint in chromosome instability and cancer. *J. Cell Sci.* **125**, 4197–4206 (2012).
54. Cahill, D. P. *et al.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300–303 (1998).
55. Sotillo, R., Schwartzman, J. M., Socci, N. D. & Benezra, R. Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal. *Nature* **464**, 436–440 (2010).
56. Kops, G. J. P. L., Foltz, D. R. & Cleveland, D. W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8699–8704 (2004).
57. Mills, C. C., Kolb, E. A. & Sampson, V. B. Development of chemotherapy with cell-cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. *Cancer Res.* **78**, 320–325 (2018).
58. Barbosa, J., Nascimento, A. V., Faria, J., Silva, P. & Bousbaa, H. The spindle assembly checkpoint: perspectives in tumorigenesis and cancer therapy. *Front. Biol. (Beijing)*. **6**, 147–155 (2011).
59. Tanaka, T., Fuchs, J., Loidl, J. & Nasmyth, K. Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat. Cell Biol.* **2**, 492–499 (2000).
60. Gligoris, T. & Löwe, J. Structural Insights into Ring Formation of Cohesin and Related Smc Complexes. *Trends Cell Biol.* **26**, 680–693 (2016).
61. Onn, I., Heidinger-Pauli, J. M., Guacci, V., Ünal, E. & Koshland, D. E. Sister chromatid cohesion: A simple concept with a complex reality. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 105–129 (2008).
62. Singh, V. P. & Gerton, J. L. Cohesin and human disease: lessons from mouse models. *Curr. Opin. Cell Biol.* **37**, 9–17 (2015).
63. Ocampo-Hafalla, M. T. & Uhlmann, F. Cohesin loading and sliding. *J. Cell Sci.* **124**, 685–691 (2011).
64. Ladurner, R. *et al.* Sororin actively maintains sister chromatid cohesion. *EMBO J.* **35**, 635–53 (2016).

65. Wu, F. M., Nguyen, J. V. & Rankin, S. A conserved motif at the C terminus of sororin is required for sister chromatid cohesion. *J. Biol. Chem.* **286**, 3579–3586 (2011).
66. Zhang, N. & Pati, D. C-terminus of Sororin interacts with SA2 and regulates sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* **14**, 820–826 (2015).
67. Nishiyama, T. *et al.* Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* **143**, 737–749 (2010).
68. Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A. & Peters, J. M. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**, 399–410 (2000).
69. Hauf, S. *et al.* Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* **3**, 0419–0432 (2005).
70. Nishiyama, T., Sykora, M. M., Huis in 't Veld, P. J., Mechtler, K. & Peters, J.-M. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 13404–13409 (2013).
71. Watanabe, Y. & Kitajima, T. S. Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **360**, 515–521 (2005).
72. Rivera, T. & Losada, A. Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. *BioEssays* **28**, 775–779 (2006).
73. Hellmuth, S. *et al.* Positive and negative regulation of vertebrate separase by Cdk1-cyclin B1 may explain why securin is dispensable. *J. Biol. Chem.* **290**, 8002–8010 (2015).
74. Henze, R., Dittrich, P. & Ibrahim, B. A Dynamical Model for Activating and Silencing the Mitotic Checkpoint. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
75. Barber, T. D. *et al.* Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3443–3448 (2008).
76. Fiszbein, A. & Kornblihtt, A. R. Alternative splicing switches: Important players in cell differentiation. *BioEssays* **39**, 1–11 (2017).
77. Coltri, P. P., Dos Santos, M. G. P. & Silva, G. H. G. Splicing and cancer : Challenges and opportunities. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **10**, e1527 (2019).
78. Kaida, D., Schneider-Poetsch, T. & Yoshida, M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression. *Cancer Sci.* **103**, 1611–1616 (2012).
79. Ladomery, M. Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. *Int. J. Cell Biol.* **2013**, 1–6 (2013).

80. Srebrow, A. & Kornblihtt, A. R. The connection between splicing and cancer. *J. Cell Sci.* **119**, 2635–2641 (2006).
81. Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O. & Bradley, R. K. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 413–430 (2016).
82. Carey, K. T. & Wickramasinghe, V. O. Regulatory Potential of the RNA Processing Machinery: Implications for Human Disease. *Trends Genet.* **34**, 279–290 (2018).
83. Kornblihtt, A. R. *et al.* Alternative splicing: A pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 153–165 (2013).
84. Listerman, I., Sapra, A. K. & Neugebauer, K. M. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 815–822 (2006).
85. Wahl, M. C. & Lührmann, R. SnapShot: Spliceosome Dynamics III. *Cell* **162**, 690–690.e1 (2015).
86. Wachtel, C. & Manley, J. L. Splicing of mRNA precursors: The role of RNAs and proteins in catalysis. *Molecular BioSystems* **5**, 311–316 (2009).
87. Frank, D. & Guthrie, C. An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* **6**, 2112–2124 (1992).
88. Brys, A. & Schwer, B. Requirement for SLU7 in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site. 707–717 (1996).
89. Chua, K. & Reed, R. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* **402**, 207–210 (1999).
90. Berasain, C. *et al.* Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease : Mechanisms and consequences. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3091–3102 (2010).
91. Black, D. L. Protein diversity from alternative splicing: A challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* **103**, 367–370 (2000).
92. Wang, Y. *et al.* Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed. Reports* **3**, 152–158 (2015).
93. Zhou, Z. & Fu, X. D. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**, 191–207 (2013).
94. Bradley, T., Cook, M. E. & Blanchette, M. SR proteins control a complex network of RNA-processing events. *RNA* **21**, 75–92 (2015).
95. Jeong, S. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Mol. Cells* **40**, 1–9 (2017).
96. Shepard, P. J. & Hertel, K. J. The SR protein family. *Genome Biol.* **10**, 242 (2009).
97. Änkö, M. L. *et al.* The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol.* **13**, R17 (2012).

98. Jumaa, H. & Nielsen, P. J. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J.* **16**, 5077–5085 (1997).
99. Sun, S., Zhang, Z., Sinha, R., Karni, R. & Krainer, A. R. SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 306–312 (2010).
100. Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stévenin, J. & Soret, J. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J.* **20**, 1785–1796 (2001).
101. Stamm, S. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1223–1227 (2008).
102. Shukla, S. & Oberdoerffer, S. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**, 673–683 (2012).
103. Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R. & Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16–26 (2011).
104. Muñoz, M. J., de la Mata, M. & Kornblihtt, A. R. The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 497–504 (2010).
105. Giono, L. E. *et al.* The RNA Response to DNA Damage. *J. Mol. Biol.* **428**, 2636–2651 (2016).
106. Paulsen, R. D. *et al.* A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol. Cell* **35**, 228–239 (2009).
107. Fan, J. *et al.* Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10611–10616 (2002).
108. Boucas, J. *et al.* Posttranscriptional regulation of gene expression-adding another layer of complexity to the DNA damage response. *Front. Genet.* **3**, 159 (2012).
109. Mikolaskova, B. *et al.* Maintenance of genome stability: the unifying role of interconnections between the DNA damage response and RNA-processing pathways. *Curr. Genet.* **64**, 971–983 (2018).
110. Maréchal, A. *et al.* PRP19 Transforms into a Sensor of RPA-ssDNA after DNA Damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Mol. Cell* **53**, 235–246 (2014).
111. Li, X. & Manley, J. L. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* **122**, 365–378 (2005).
112. Zhang, Z. & Krainer, A. R. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol. Cell* **16**, 597–607 (2004).

113. Huang, Y., Gattoni, R., Stévenin, J. & Steitz, J. A. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell* **11**, 837–843 (2003).
114. Sanford, J. R., Gray, N. K., Beckmann, K. & Cáceres, J. F. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev.* **18**, 755–768 (2004).
115. Aronica, L. *et al.* The spliceosome-associated protein Nrl1 suppresses homologous recombination-dependent R-loop formation in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1703–1717 (2016).
116. Gómez-González, B. *et al.* Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles. *EMBO J.* **30**, 3106–3119 (2011).
117. Dominguez, D. *et al.* An extensive program of periodic alternative splicing linked to cell cycle progression. *Elife* **5**, 1–19 (2016).
118. López-Saavedra, A. & Herrera, L. A. The role of alternative mRNA splicing in chromosome instability. *Mutat. Res.* **705**, 246–251 (2010).
119. Naro, C., Bielli, P., Pagliarini, V. & Sette, C. The interplay between DNA damage response and RNA processing: The unexpected role of splicing factors as gatekeepers of genome stability. *Front. Genet.* **6**, 1–10 (2015).
120. Jimenez, M., Arechederra, M., Ávila, M. A. & Berasain, C. Splicing alterations contributing to cancer hallmarks in the liver: central role of dedifferentiation and genome instability. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 84 (2018).
121. Hofmann, J. C., Husedzinovic, A. & Gruss, O. J. The function of spliceosome components in open mitosis. *Nucleus* **1**, 447–459 (2010).
122. Karamysheva, Z., Díaz-Martínez, L. A., Warrington, R. & Yu, H. Graded requirement for the spliceosome in cell cycle progression. *Cell Cycle* **14**, 1873–1883 (2015).
123. Sundaramoorthy, S., Vazquez-Novelle, M. D., Lekomtsev, S., Howell, M. & Petronczki, M. Functional genomics identifies a requirement of pre-mRNA splicing factors for sister chromatid cohesion. *EMBO J.* **33**, 2623–2642 (2014).
124. Watrin, E., Demidova, M., Watrin, T., Hu, Z. & Prigent, C. Sororin pre-mRNA splicing is required for proper sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO Rep.* **15**, 948–955 (2014).
125. Oka, Y. *et al.* UBL5 is essential for pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO Rep.* **15**, 956–964 (2014).
126. Van der Lelij, P. *et al.* SNW1 enables sister chromatid cohesion by mediating the splicing of sororin and APC2 pre-mRNAs. *EMBO J.* **33**, 2643–2658 (2014).
127. Kittler, R. *et al.* An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* **432**, 1036–1040 (2004).

128. Valcárcel, J. & Malumbres, M. Splicing together sister chromatids. *EMBO J.* **33**, 2601–2603 (2014).
129. Wong, M. C. *et al.* International incidence and mortality trends of liver cancer : a global profile. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
130. Baecker, A., Liu, X., La Vecchia, C. & Zhang, Z. F. Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors. *Eur. J. Cancer Prev.* **27**, 205–212 (2018).
131. Center, M. M. & Jemal, A. International Trends in Liver Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 2362–2368 (2011).
132. Villanueva, A., Hernandez-Gea, V. & Llovet, J. M. Medical therapies for hepatocellular carcinoma: A critical view of the evidence. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 34–42 (2013).
133. Llovet, J. M., Montal, R., Sia, D. & Finn, R. S. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 599–616 (2018).
134. Farazi, P. A. & DePinho, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 674–687 (2006).
135. Janevska, D., Chaloska-Ivanova, V. & Janevski, V. Hepatocellular carcinoma: Risk factors, diagnosis and treatment. *Maced. J. Med. Sci.* **3**, 732–736 (2015).
136. Gomaa, A. I., Khan, S. A., Toledano, M. B., Waked, I. & Taylor-Robinson, S. D. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **14**, 4300–4308 (2008).
137. Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O. & Heikenwalder, M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 1–18 (2019).
138. Goossens, N., Sun, X. & Hoshida, Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepatic Oncol.* **2**, 371–379 (2015).
139. Nault, J. C. *et al.* Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* **47**, 1187–1193 (2015).
140. Marengo, A., Rosso, C. & Bugianesi, E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu. Rev. Med.* **67**, 103–117 (2016).
141. Lee, S. M. *et al.* Interplay of genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Epigenomics* **8**, 993–1005 (2016).
142. Toh, T. B., Lim, J. J. & Chow, E. K. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clin. Transl. Med.* **8**, 1–15 (2019).
143. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C. & Llovet, J. M. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **149**, 1226–1239.e4 (2015).

144. Lombardi, A., Grimaldi, A., Zappavigna, S., Misso, G. & Caraglia, M. Hepatocarcinoma: genetic and epigenetic features. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **64**, 14–27 (2018).
145. Berasain, C. *et al.* The epidermal growth factor receptor: A link between inflammation and liver cancer. *Exp. Biol. Med.* **234**, 713–725 (2009).
146. Zhang, D. Y. & Friedman, S. L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **56**, 769–775 (2012).
147. Kanda, T., Goto, T., Hirotsu, Y., Moriyama, M. & Omata, M. Molecular Mechanisms Driving Progression of Liver Cirrhosis towards Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B and C Infections: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1358 (2019).
148. Saffo, S. & Taddei, T. H. Systemic Management for Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Review of the Molecular Pathways of Carcinogenesis, Current and Emerging Therapies, and Novel Treatment Strategies. *Dig. Dis. Sci.* **64**, 1016–1029 (2019).
149. Berasain, C. & Avila, M. A. Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3831–3851 (2015).
150. Trevisani, F., Cantarini, M. C., Wands, J. R. & Bernardi, M. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **29**, 1299–1305 (2008).
151. Zender, L. *et al.* Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **52**, 921–929 (2010).
152. Ally, A. *et al.* Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* **169**, 1327–1341.e23 (2017).
153. Takuma, Y. *et al.* Telomerase reverse transcriptase gene amplification in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 1300–1304 (2004).
154. Zhao, L.-H. *et al.* Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **7**, 12992 (2016).
155. Lee, J. S. The mutational landscape of hepatocellular carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.* **21**, 220 (2015).
156. Monga, S. P. β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology* **148**, 1294–1310 (2015).
157. Cieply, B., Zeng, G., Proverbs-Singh, T., Geller, D. & Monga, S. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology* **49**, 821–831 (2009).
158. Llovet, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16018 (2016).

159. Zhang, L., Liu, X., Zhang, X. & Chen, R. Identification of important long non-coding RNAs and highly recurrent aberrant alternative splicing events in hepatocellular carcinoma through integrative analysis of multiple RNA-Seq datasets. *Mol. Genet. Genomics* **291**, 1035–1051 (2016).
160. Tremblay, M. P. *et al.* Global profiling of alternative RNA splicing events provides insights into molecular differences between various types of hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics* **17**, 1–16 (2016).
161. Li, S., Hu, Z., Zhao, Y., Huang, S. & He, X. Transcriptome-Wide Analysis Reveals the Landscape of Aberrant Alternative Splicing Events in Liver Cancer. *Hepatology* **69**, 359–375 (2019).
162. Berasain, C. *et al.* Alterations in the expression and activity of pre-mRNA splicing factors in hepatocarcinogenesis. *Hepatic Oncol.* **1**, 241–252 (2014).
163. Chettouh, H. *et al.* Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors. *Cancer Res.* **73**, 3974–3986 (2013).
164. Zhou, Z. J. *et al.* Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **132**, 1080–1089 (2013).
165. Cui, H., Wu, F., Sun, Y., Fan, G. & Wang, Q. Up-regulation and subcellular localization of hnRNP A2/B1 in the development of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **10**, 356 (2010).
166. Sen, S., Jumaa, H. & Webster, N. J. G. Splicing factor SRSF3 is crucial for hepatocyte differentiation and metabolic function. *Nat. Commun.* **4**, 1336 (2013).
167. Sen, S., Langiewicz, M., Jumaa, H. & Webster, N. J. G. Deletion of serine/arginine-rich splicing factor 3 in hepatocytes predisposes to hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* **61**, 171–183 (2015).
168. Wang, H. *et al.* A Coiled-Coil Domain Containing 50 Splice Variant Is Modulated by Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 3 and Promotes Hepatocellular Carcinoma in Mice by the Ras Signaling Pathway. *Hepatology* **69**, 179–195 (2019).
169. Luo, C. *et al.* SRSF2 Regulates Alternative Splicing to Drive Hepatocellular Carcinoma Development. *Cancer Res.* **77**, 1168–1178 (2017).
170. Bhate, A. *et al.* ESRP2 controls an adult splicing programme in hepatocytes to support postnatal liver maturation. *Nat. Commun.* **6**, 1–12 (2015).
171. Chen, L. *et al.* Loss at 16q22.1 identified as a risk factor for intrahepatic recurrence in hepatocellular carcinoma and screening of differentially expressed genes. *Neoplasia* **63**, 114–120 (2016).

172. Castillo, J. *et al.* Amphiregulin Induces the Alternative Splicing of p73 Into Its Oncogenic Isoform Δ Ex2p73 in Human Hepatocellular Tumors. *Gastroenterology* **137**, 1805–1815.e4 (2009).
173. Wong, W. K., Kelly, T., Li, J., Ma, H. T. & Poon, R. Y. SGO1C is a non-functional isoform of Shugoshin and can disrupt sister chromatid cohesion by interacting with PP2A–B56. *Cell Cycle* **14**, 3965–3977 (2015).
174. Yamada, H. Y. *et al.* Tumor-promoting/progressing role of additional chromosome instability in hepatic carcinogenesis in Sgo1 (shugoshin 1) haploinsufficient mice. *Carcinogenesis* **36**, 429–440 (2015).
175. Yasen, M. *et al.* Expression of Aurora B and alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue. *Cancer Sci.* **100**, 472–480 (2009).
176. Sze, K. M. F., Ching, Y. P., Jin, D. Y. & Ng, I. O. L. Role of a novel splice variant of mitotic arrest deficient 1 (MAD1), MAD1 β , in mitotic checkpoint control in liver cancer. *Cancer Res.* **68**, 9194–9201 (2008).
177. Mohr, L. *et al.* An Alternatively Spliced Bifunctional Localization Signal Reprograms Human Shugoshin 1 to Protect Centrosomal Instead of Centromeric Cohesin. *Cell Rep.* **12**, 2156–2168 (2015).
178. Wang, X. *et al.* sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev. Cell* **14**, 331–341 (2008).
179. Berasain, C. & Avila, M. A. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J. Gastroenterol.* **49**, 9–23 (2014).
180. Komposch, K. & Sibilía, M. EGFR signaling in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–31 (2016).
181. Yea, S. *et al.* Ras Promotes Growth by Alternative Splicing-Mediated Inactivation of the KLF6 Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **134**, 1521–1531 (2008).
182. Vetter, D. *et al.* Enhanced hepatocarcinogenesis in mouse models and human hepatocellular carcinoma by coordinate KLF6 depletion and increased messenger RNA splicing. *Hepatology* **56**, 1361–1370 (2012).
183. Munoz, U. *et al.* Hepatocyte growth factor enhances alternative splicing of the Kruppel-like Factor 6 (KLF6) tumor suppressor to promote growth through SRSF1. *Mol. Cancer Res.* **10**, 1216–1227 (2012).
184. Castillo, J. *et al.* Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* **66**, 6129–6138 (2006).
185. Berasain, C. *et al.* Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* **128**, 424–432 (2005).
186. DeYoung, M. P. & Ellisen, L. W. p63 and p73 in human cancer: Defining the network. *Oncogene* **26**, 5169–5183 (2007).

187. Shomron, N., Reznik, M. & Ast, G. Splicing Factor hSlu7 Contains a Unique Functional Domain Required to Retain the Protein within the Nucleus. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3782–3795 (2004).
188. Shomron, N., Alberstein, M., Reznik, M. & Ast, G. Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *J. Cell Sci.* **118**, 1151–1159 (2005).
189. Elizalde, M. *et al.* Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 2909–2920 (2014).
190. Alberstein, M. *et al.* Regulation of transcription of the RNA splicing factor hSlu7 by Elk-1 and Sp1 affects alternative splicing. *RNA* **13**, 1988–1999 (2007).
191. Yeo, G., Holste, D., Kreiman, G. & Burge, C. B. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* **5**, R74 (2004).
192. Avila, M. A. *et al.* Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **33**, 907–914 (2000).
193. Okabe, H. *et al.* Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: Identification of genetic indicators to predict patient outcome. *Cancer Res.* **61**, 2129–2137 (2001).
194. Becker, D. *et al.* Genetic signatures shared in embryonic liver development and liver cancer define prognostically relevant subgroups in HCC. *Mol. Cancer* **11**, 1–11 (2012).
195. Behnke, M., Reimers, M. & Fisher, R. The expression of embryonic liver development genes in hepatitis c induced cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. **4**, 945–968 (2012).
196. Mazurek, S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 969–980 (2011).
197. Kano, S. *et al.* Truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 accelerates cell growth through up-regulating c-Jun expression. *J. Med. Investig.* **60**, 228–235 (2013).
198. Kano, S. *et al.* Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **306**, C250–C262 (2014).
199. Chang, Y.-L., Liu, S.-T., Wang, Y.-W., Lin, W.-S. & Huang, S.-M. Amiodarone promotes cancer cell death through elevated truncated SRSF3 and downregulation of miR-224. *Oncotarget* **9**, 13390–13406 (2018).
200. Cai, S., Lu, S., Liu, L., Zhang, C. Z. & Yun, J. Increased expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha transcribed by promoter 2 indicates a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **10**, 761–771 (2017).

201. Tanaka, T. *et al.* Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *J. Pathol.* **208**, 662–672 (2006).
202. Urtasun, R. *et al.* Splicing regulator SLU7 preserves survival of hepatocellular carcinoma cells and other solid tumors via oncogenic miR-17-92 cluster expression. *Oncogene* **35**, 4719–4729 (2016).
203. Mogilyansky, E. & Rigoutsos, I. The miR-17/92 cluster: A comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.* **20**, 1603–1614 (2013).
204. Liu, F. *et al.* Prognostic role of miR-17-92 family in human cancers: evaluation of multiple prognostic outcomes. *Oncotarget* **8**, 69125–69138 (2017).
205. Meng, W. J. *et al.* MicroRNA expression profile reveals miR-17-92 and miR-143-145 Cluster in Synchronous Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)*. **94**, 1–12 (2015).
206. Danielson, L. S. *et al.* Limited miR-17-92 overexpression drives hematologic malignancies. *Leuk. Res.* **39**, 335–341 (2015).
207. Zhu, H., Han, C. & Wu, T. MiR-17-92 cluster promotes hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **36**, 1213–1222 (2015).
208. Fang, L. L. *et al.* Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* **40**, 1624–1630 (2017).
209. Pichard, L. *et al.* Human Hepatocyte Culture. *Methods Mol. Biol.* **320**, 283–294 (2006).
210. Kueng, S. *et al.* Wapl Controls the Dynamic Association of Cohesin with Chromatin. *Cell* **127**, 955–967 (2006).
211. Hatchi, E. *et al.* BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Mol. Cell* **57**, 636–647 (2015).
212. Vanoosthuyse, V. Strengths and Weaknesses of the Current Strategies to Map and Characterize R-Loops. *Non-Coding RNA* **4**, 9 (2018).
213. Zeng, Y., Cai, X. & Cullen, B. R. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. *Methods Enzymol.* **392**, 371–380 (2005).
214. Gil-Fariña, I. *et al.* IL12-Mediated Liver Inflammation Reduces the Formation of AAV Transcriptionally Active Forms but Has No Effect over Preexisting AAV Transgene Expression. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
215. Blajeski, A. L., Phan, V. A., Kottke, T. J. & Kaufmann, S. H. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J. Clin. Invest.* **110**, 91–99 (2002).

216. Sawicka, A. & Seiser, C. Histone H3 phosphorylation - A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* **94**, 2193–2201 (2012).
217. Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W. & Salmon, E. D. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J. Cell Biol.* **141**, 1181–1191 (1998).
218. Rossio, V., Galati, E. & Piatti, S. Adapt or die: how eukaryotic cells respond to prolonged activation of the spindle assembly checkpoint. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1645–1649 (2010).
219. Uhlmann, F. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 754–761 (2001).
220. Tanaka, T. U. Chromosome bi-orientation on the mitotic spindle. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **360**, 581–589 (2005).
221. Schmitz, J., Watrin, E., Lénárt, P., Mechtler, K. & Peters, J. M. Sororin Is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase. *Curr. Biol.* **17**, 630–636 (2007).
222. Li, X., Wang, J. & Manley, J. L. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev.* **19**, 2705–2714 (2005).
223. Binz, S. K., Sheehan, A. M. & Wold, M. S. Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1015–1024 (2004).
224. Ajiro, M., Jia, R., Yang, Y., Zhu, J. & Zheng, Z. M. A genome landscape of SRSF3-regulated splicing events and gene expression in human osteosarcoma U2OS cells. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1854–1870 (2016).
225. Jumaa, H., Guénet, J. & Nielsen, P. J. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. **17**, 3116–3124 (1997).
226. Tang, Y. *et al.* Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53 β , an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene* **32**, 2792–2798 (2013).
227. Zhao, Y. *et al.* MicroRNA-mediated repression of nonsense mRNAs. *Elife* **3**, 1–22 (2014).
228. Michalopoulos, G. K. Advances in liver regeneration. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 897–907 (2014).
229. Sobecki, M. *et al.* Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res.* **77**, 2722–2734 (2017).

230. Schwartzman, J.-M., Sotillo, R. & Benezra, R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 102–115 (2010).
231. Lawrence, K. S., Chau, T. & Engebrecht, J. DNA Damage Response and Spindle Assembly Checkpoint Function throughout the Cell Cycle to Ensure Genomic Integrity. *PLOS Genet.* **11**, e1005150 (2015).
232. Bakhoun, S. F., Kabeche, L., Compton, D. A., Powell, S. N. & Bastians, H. Mitotic DNA Damage Response: At the Crossroads of Structural and Numerical Cancer Chromosome Instabilities. *Trends Cancer* **3**, 225–234 (2017).
233. Aguilera, A. The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J.* **21**, 195–201 (2002).
234. Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 2–9 (2014).
235. Gan, W. *et al.* R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev.* **25**, 2041–2056 (2011).
236. Kimura, M. *et al.* Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. *Cell Death Dis.* **4**, e603 (2013).
237. Mu, R. *et al.* Depletion of pre-mRNA splicing factor Cdc5L inhibits mitotic progression and triggers mitotic catastrophe. *Cell Death Dis.* **5**, 1–12 (2014).
238. Manchado, E., Guillaumot, M. & Malumbres, M. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ.* **19**, 369–377 (2012).
239. de Lange, J. *et al.* Defective sister chromatid cohesion is synthetically lethal with impaired APC/C function. *Nat. Commun.* **6**, 8399 (2015).
240. Vargas-Rondón, N., Villegas, V. E. & Rondón-Lagos, M. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers (Basel)*. **10**, 1–21 (2017).
241. Ubhi, T. & Brown, G. W. Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment. *Cancer Res.* **79**, 1730–1739 (2019).
242. Puigvert, J. C., Sanjiv, K. & Helleday, T. Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. *FEBS J.* **283**, 232–245 (2016).
243. Bantel, H. & Schulze-Osthoff, K. Mechanisms of cell death in acute liver failure. *Front. Physiol.* **3**, 79 (2012).
244. Michalopoulos, G. K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.* **3**, 485–513 (2013).
245. Riehle, K. J., Dan, Y. Y., Campbell, J. S. & Fausto, N. New concepts in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 203–212 (2011).

-
246. Lareau, L. F., Inada, M., Green, R. E., Wengrod, J. C. & Brenner, S. E. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**, 926–929 (2007).
 247. Pervouchine, D. *et al.* Novel autoregulatory cases of alternative splicing coupled with nonsense-mediated mRNA decay. *bioRxiv* 1–22 (2018).
 248. Fu, X. D. & Ares Jr, M. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 689–701 (2014).
 249. Anczuków, O. & Krainer, A. R. Splicing-factor alterations in cancers. *RNA* **22**, 1285–301 (2016).
 250. Gonçalves, V. & Jordan, P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–10 (2015).
 251. Brogna, S. & Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 107–113 (2009).
 252. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1712 (2016).
 253. Shyu, A. Bin, Wilkinson, M. F. & Van Hoof, A. Messenger RNA regulation: To translate or to degrade. *EMBO J.* **27**, 471–481 (2008).
 254. Boege, Y. *et al.* A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development. *Cancer Cell* **32**, 342–359.e10 (2017).

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Tabla de anticuerpos

Anticuerpo	Método	Casa comercial	Referencia
Actina	WB (1°)	Sigma-Aldrich	A2066
α -Tubulina	IF (1°)	Sigma-Aldrich	T6074
β -Catenina	IF (1°)	BD Biosciences	610154
H3S10P	WB(1°)	Cell Signaling	#9701
γ -H2AX	WB (1°)/IHQ	Cell Signaling	#2577S
Ki-67	IHQ	Thermo Fisher Scientific	RM-9106
MAD2	WB (1°)	Bethyl Laboratories	a300-301A-M
P21	WB (1°)	Santa Cruz	SC-397
PARP1	WB (1°)	Santa Cruz	SC-7150
P-Ser33-RPA32	IF (1°)	Bethyl Laboratories	A300-246A
RNH1	WB (1°)	Thermo Fisher	PA5-30974
S9.6	Slot blot/IF (1°)	Milipore	MABE1095
SLU7	WB/IF (1°)	Novus Biological	NBP2-20403
SLU7 (L-16)	CLIP (1°)	Santa Cruz	SC-10829
Sororina	WB (1°)	Cedido por el Dr JM Peters, Austria	
SRSF3	WB (1°)	MBL	RN080PW
SRSF3	WB (1°)	Thermo Fisher Scientific	33-4200
SRSF1	WB (1°)	Thermo Fisher Scientific	32-4600
V5	WB (1°)	Invitrogene	R960-25
WAPL	WB (1°)	Cell Signaling	77428S
α -ratón-AlexaFluor 488	IF (2°)	Thermo Fisher Scientific	A21202
α -conejo-AlexaFluor 488	IF (2°)	Thermo Fisher Scientific	A21206
α -ratón-AlexaFluor 594	IF (2°)	Thermo Fisher Scientific	A21203
α -conejo-AlexaFluor 594	IF (2°)	Thermo Fisher Scientific	A21207
α -IgG conejo-HRP	WB (2°)	Sigma-Aldrich	A0545
α -IgG ratón-HRP	WB (2°)	Sigma-Aldrich	A0168

ANEXO 2

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados

Gen	Uso	Especie	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
Actina	PCR	Humano	AGCCTCGCCTTTGCCGA	CTGGTGCCTGGGGCG
β -actina Exón6	PCR realizada en el gDNA tratado con bisulfito para la detección de R-loops	Humano	GACCAGTTGAATAAAAGTGACACC	GCAGAATCCAGACCTCAGCCCATAGCTAACCAGA
β -actina Convertido		Humano	GGGAtTATTTGGGGGTGTtGGt	TCCCATAAaTaAAaaCAAaaC
β -actina Sin Convertir		Humano	GGGACTATTTGGGGGTGTCT	TCCCATAGGTGAAGGCAAAG
RPLP0	PCR a tiempo real	Humano, Ratón	AACATCTCCCCCTTCTCCTT	GAAGGCCTTGACCTTTTCAG
p53 β	PCR a tiempo real	Humano	CTTTGAGGTGCGTGTGTGTC	TTGAAAGCTGGTCTGGTCTCG
SLU7	PCR, PCR a tiempo real	Humano, Ratón	GAAGAAGGAGCTAGAAGAACAG	CTCCCATCATAGTCAAACATCAG
Sororina	PCR	Humano	AGTTATGTCTGGGAGGCGAAC	CTCTACAGCATGGGCCACGATC
Sororina Int1	PCR a tiempo real	Humano	AGTTATGTCTGGGAGGCGAAC	ACAGGTCTAGAGACAGCGAG
Sororina Int2	PCR a tiempo real	Humano	AGGGCCCCATCTCCTACTAAGC	AGAGGGATGAACGTGAGCTC
Sororina	PCR a tiempo real	Ratón	GTACACATGGCGGAGCGGCG	CTCTACTGCATGAGCTACGATC
Sororina Int1	PCR a tiempo real	Ratón	GTACACATGGCGGAGCGGCG	CAAGATGCTTGACGAGTTCGG
Sororina	PCR	Ratón	GTACACATGGCGGAGCGGCG	CCTCGGCCAGATTCAGAGAAC
SRSF1 (+Int3)	PCR	Humano	TGATGTTTACCGAGATGGCACTG	CGAGAGCGAGATCTGCTATG
SRSF1 (Δ Ex4)	PCR	Humano	TGATGTTTACCGAGATGGCACTG	CGCTCCATGAATCCTGGTAA
SRSF1 Var6	PCR	Humano	GATCTCATGAGAGACATATC	CGCTCCATGAATCCTGGTAA
SRSF3 ISO1	PCR	Humano	GTGGCTGCCGTGTAAGAGTGG	CTTCTTGAGATCTGCGAC
SRSF3 ISO2	PCR, PCR a tiempo real	Humano, Ratón	GTGGCTGCCGTGTAAGAGTGG	CTGACGACTGGCCAGCCTGG
SRSF3	PCR	Humano, Ratón	GTGGCTGCCGTGTAAGAGTGG	TCTCTTCTCTATCTCTAGAAAG

Splicing events in the control of genome integrity: role of SLU7 and truncated SRSF3 proteins

Maddalen Jiménez^{1,†}, Raquel Urtasun^{1,2,†}, María Elizalde¹, María Azkona¹, M. Ujue Latasa¹, Iker Uriarte^{1,3}, María Arechederra¹, Diego Alignani^{2,4}, Marina Bárcena-Varela¹, Gloria Álvarez-Sola^{1,3}, Leticia Colyn¹, Eva Santamaría^{1,3}, Bruno Sangro^{2,3,5}, Carlos Rodríguez-Ortigosa^{1,2,3}, Maite G. Fernández-Barrena^{1,2,3}, Matías A. Ávila^{1,2,3,*} and Carmen Berasain^{1,2,3,*}

¹Hepatology Program, CIMA, University of Navarra, Pamplona 31008, Spain, ²Instituto de Investigaciones Sanitarias de Navarra-IdiSNA, Pamplona 31008, Spain, ³CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid 28029, Spain, ⁴Cytometry Unit, CIMA, University of Navarra, Pamplona 31008, Spain and ⁵Hepatology Unit, Navarra University Clinic, Pamplona 31008, Spain

Received July 26, 2018; Revised November 21, 2018; Editorial Decision January 03, 2019; Accepted January 08, 2019

ABSTRACT

Genome instability is related to disease development and carcinogenesis. DNA lesions are caused by genotoxic compounds but also by the dysregulation of fundamental processes like transcription, DNA replication and mitosis. Recent evidence indicates that impaired expression of RNA-binding proteins results in mitotic aberrations and the formation of transcription-associated RNA–DNA hybrids (R-loops), events strongly associated with DNA injury. We identify the splicing regulator SLU7 as a key mediator of genome stability. SLU7 knockdown results in R-loops formation, DNA damage, cell-cycle arrest and severe mitotic derangements with loss of sister chromatid cohesion (SCC). We define a molecular pathway through which SLU7 keeps in check the generation of truncated forms of the splicing factor SRSF3 (SRp20) (SRSF3-TR). Behaving as dominant negative, or by gain-of-function, SRSF3-TR impair the correct splicing and expression of the splicing regulator SRSF1 (ASF/SF2) and the crucial SCC protein sororin. This unique function of SLU7 was found in cancer cells of different tissue origin and also in the normal mouse liver, demonstrating a conserved and fundamental role of SLU7 in the preservation of genome integrity. Therefore, the downregulation of SLU7 and the alterations of this pathway that we ob-

serve in the cirrhotic liver could be involved in the process of hepatocarcinogenesis.

INTRODUCTION

The preservation of genome integrity is essential for cellular homeostasis and ultimately for the individual's survival. DNA lesions, and failure to repair them, can lead to a variety of alterations ranging from point mutations to gross chromosomal rearrangements such as deletions, translocations, inversions, duplications and even to chromosomal numerical changes (aneuploidy) (1). An increased rate of these events is referred to as genome instability, and it has been related to the pathogenesis of ageing and neoplastic diseases, constituting one of the hallmarks of cancer (2,3). DNA lesions may originate from the action of genotoxic compounds, including xenobiotics, endogenous metabolites and particularly by agents generating reactive oxygen species (4). However, DNA breaks may also occur in association with DNA replication stress caused by a variety of conditions such as the topological characteristics of certain DNA regions, or dysregulated cell proliferation (5). More recently it has also been shown that gene transcription and alterations in the expression of RNA-binding proteins are important sources of replication stress and genome instability (6–10).

We have recently demonstrated that the splicing regulator SLU7 is essential to maintain the expression and splicing of the transcriptome characteristic of the differentiated, quiescent and metabolically functional liver (11). Importantly, we have also found that SLU7 expression is significantly downregulated in damaged liver and in hepatocellular car-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 948 194700; Fax: +34 948 194717; Email: cberasain@unav.es

Correspondence may also be addressed to Prof. Matías A. Ávila. Tel: +34 948 194700; Fax: +34 948 194717; Email: maavila@unav.es

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

[‡]CB and MAA share senior authorship.

cinoma (HCC) (12), suggesting that SLU7 inhibition may be causally related to the hepatoin sufficiency observed in patients with chronic liver injury and in the progression of hepatocarcinogenesis (13). Interestingly, we also observed that although reduced, the expression of SLU7 is still retained in human HCC cells and is essential for their survival (14). Mechanistically we found that SLU7 is required to maintain the expression of microRNAs generated from the oncogenic cluster miR-17-92 in order to inhibit apoptosis. Importantly, this function is not restricted to liver cancer cells, being SLU7 essential for the survival of transformed cells of different origin (14).

Intriguingly the dependency on SLU7 for survival found in transformed cells was not observed in normal cells. One of the major differences between normal and transformed cells is their proliferative activity, and the role of spliceosome components in cell cycle progression has been clearly established (15–17). In the present work, we demonstrate that SLU7 is essential for cells to progress through mitosis and to maintain genome stability. We found that SLU7 knockdown results in R-loops accumulation, DNA damage induction and mitotic errors such as loss of sister chromatid cohesion (SCC). Mechanistically we unravel a molecular pathway implicating new truncated forms of the splicing factor SRSF3 (SRp20) (SRSF3-TR), the microRNA miR-17 and the regulation of sororin splicing, a central event for normal chromosome segregation (18). Importantly, we found that these mechanisms also operate *in vivo*. In human liver tissue, the downregulation of SLU7 expression is paralleled by an increase in the levels of SRSF3-TR isoforms. Altogether, we have gathered *in vitro* and *in vivo* evidence showing that SLU7 is essential for the preservation of chromosomal stability and DNA integrity during cell proliferation, as well as for mitosis progression. These observations, together with our findings on reduced SLU7 expression in liver disease, may contribute to understand the mechanisms of chromosomal instability, which is an early event in hepatocarcinogenesis (19). However, our study also identifies this splicing regulator as a new molecular target for cancer therapy, given its herein demonstrated key function in the mitotic progression of cancer cells and the induction of replication stress and mitotic catastrophe upon its inhibition (4,20).

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and transfections

Human HCC cell lines PLC/PRF/5 and HepG2, human cervical carcinoma cell line HeLa and human non-small cell lung cancer cell line H358 were obtained from the ATCC, were authenticated by STR profiling and tested for mycoplasma contamination. PLC/PRF/5, HepG2 and HeLa cell lines were grown in DMEM (Gibco-Life Technology, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine and antibiotics. H358 cell line was grown in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum. HepaRG well-differentiated HCC human cell line was obtained from BioPredic (Rennes, France). Human hepatocytes (HumHep) were obtained from liver resections of patients with secondary tumors and were isolated and cultured as reported (14).

Transfections with siRNAs and microRNAs were performed with Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Sequence of siRNAs will be provided upon request. siSLU7-1 and siSLU7-2 are two independent siRNAs. Individual siRNAs were used at 75 nM, in co-transfection at 35 nM each and in double transfections siRNAs were used at 35 nM and microRNAs at 100 nM. pMIR-report plasmids (Ambion, Applied Biosystems, USA) and RNase H1 plasmid (RNH1), kindly provided by Dr A. Aguilera (Sevilla, Spain), were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Plasmids and luciferase activity

The sequence corresponding to SRSF3 exon 4 (pEXON4) and the same sequence with three nucleotides mutated (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, CA, USA) at the putative miR-17 seed sequence (pMut), were cloned into the pMIR-REPORT luciferase plasmid (Ambion, Applied Biosystems). Luciferase activity was determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, WI, USA).

Flow cytometry

Cell-cycle profiles were determined by flow cytometry analysis using a FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, CA, USA) and FxCycle™ Violet stain (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). When indicated, cells were treated overnight with nocodazole (330 nM) (Sigma-Aldrich, MO, USA) and collected or washed several times to be collected at different time points after nocodazole release.

Chromosome spreads

Chromosome spreads were prepared as described (21). Briefly, cells treated with nocodazole (1 µg/ml) for 3 h were collected and incubated in 0.075M KCl solution for 20 min, fixed in methanol/acetic acid (3:1 ratio), dropped onto glass slides and stained with 5.8% Giemsa solution (Merck-Millipore, CA, USA).

Immunofluorescence

For immunofluorescence, cells were cultured on coverslips and 48 h after transfection were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Immunofluorescence was performed with anti-alpha-tubulin (Sigma-Aldrich T9026; 1:10000) and anti-SLU7 (Novus Biological NBP2-20403; 1:1000, CO, USA) antibodies as described (14). DNA was counterstained with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA).

R-loops detection

For R-loops detection by immunofluorescence cells were fixed, 48–72 h after knockdown, with ice-cold methanol for 15 min and immunofluorescence was performed with S9.6 antibody (Millipore MABE1095; 1:250) alone or in combination with anti-P-Ser33-RPA32 (Bethyl A300-246A;

1:3000). DNA was counterstained with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA). All images were captured using the Zeiss Axio Imager.M1 microscope and analyzed using ImageJ software as described (22).

For R-loops detection by slot blot, genomic DNA from PLC/PRF/5 and HeLa cell lines was extracted using the automatic Maxwell system (Promega). Five micrograms of DNA were treated with 1 mg/ml of RNase A (Roche, IN, USA) in a final volume of 20 μ l for 30 min at 37°C. Half of the previous sample was treated with 1U of RNase H (New England Biolabs, USA) per microgram of DNA for 30 min at 37°C. DNA (2.5 μ g) was spotted on a Nylon membrane (Schleicher & Schuell, USA) using Bio-Dot[®] microfiltration apparatus (BioRad, CA, USA). After UV-crosslinking (0.12J/m²) membranes were stained with methylene blue and blocked with 5% milk/TBST. RNA-DNA hybrids were detected using the mouse S9.6 antibody (1:1000, Millipore MABE1095) in 1% BSA/TBST after overnight incubation at 4°C.

R-loops formed on the 3'UTR region of the *beta-Actin* gene were detected by a modification of the non-denaturing bisulfite polymerase chain reaction (PCR) method (23,24). See scheme in Supplementary Figure S3D. Briefly, non-denatured DNA from cells transfected with siGL, siSLU7 and siSLU7+RNH1 plasmid was subjected to bisulfite conversion (EZ-DNA Methylation Gold kit, Zymo Research Company, CA, USA). PCR1 was performed using primers sense GACCAGTTGAATAAAAGTGCACACC on *ACTB* exon 6 and anti-sense GSP2 (25) outside the predicted R-loop region. Nested PCRs were performed with strand-specific primers. Nested PCR3 was performed using the described 5'pause primers used to perform DRIP (25), which therefore detect the DNA strand hybridized with the RNA and protected from conversion in the R-loop. This PCR will be positive in non-denatured bisulfite treated DNA both in the presence and in the absence of R-loops. Nested PCR2 was performed using the converted 5'pause primers, which will specifically detect the converted single DNA strand (ssDNA) present only when R-loops are formed. The specificity of PCR2 was confirmed by sequencing.

RNA isolation and PCRs

Total RNA from cell lines and tissue was extracted using the automated Maxwell system (Promega). RNA samples were treated twice with DNase to degrade all possible traces of contaminating genomic DNA (gDNA). Reverse transcription was performed as described (26). Real time PCRs were performed using iQ SYBR Green Supermix (BioRad) in a CFX96 system (BioRad) as previously described (27). Splicing events were detected after electrophoresis of PCR products amplified with primers located on both sides of the alternated splicing event as described (12). When indicated isoform-specific primers on exon junctions were used. The bands detected after electrophoresis were sequenced to be identified and to confirm specificity. Controls included PCR reactions on RNA samples without a previous retrotranscription (-RT) reaction to exclude the amplification of contaminant gDNA (Supplementary Figure S2D and F). The

sequence of primers used in the study will be provided upon request.

Western blot analysis

For protein extraction, all cell lines were lysed in RIPA buffer or in a less stringent buffer (20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) for the SRSF3 ISO2 (SRSF3-TR) detection. The homogenates were subjected to western blot analyses as reported (26). Antibodies used were anti-SLU7 (Novus, 1:1000), anti-PARP1 (Santa Cruz SC-7150; 1:1000, CA, USA), anti-Actin (Sigma A2066; 1:6000, MO, USA), anti-Sororin (kindly provided by Dr JM Peters, Austria), anti-SRSF3 (Thermo Fisher 33-4200; 1:500 and MBL RN080PW; 1:500, MA, USA), anti-WAPL (Cell signaling 77428S; 1:1000, MA, USA), anti-H3S10P (Cell signaling #9701; 1:1000), anti- γ -H2AX (Cell signaling #2577S; 1:1000), anti-SRSF1 (Thermo Fisher 32-4600; 1:1000), anti-MAD2 (Bethyl laboratories a300-301A-M; 1:1000, TX, USA), anti-P21 (Santa Cruz SC-397; 1:1000), anti-RNaseH1 (Thermo Fisher PA5-30974; 1:1000) and anti-V5 (Invitrogen R960-25; 1:1000).

RNA-pull down

To obtain nuclei extract, PLC/PRF/5 cells were collected in nuclear isolation buffer (1.28 M sucrose, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 4% Triton X-100) and centrifugated at 0.6 \times g for 15 min at 4°C. The nuclear pellet obtained was resuspended in buffer A (150 mM KCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% NP40, 1 \times Protease inhibitor cocktail, 100 U/ml RNase inhibitor) and mechanically lysed using a dounce homogenizer for final protein extraction. For liver tissue, control, cirrhosis and HCC samples were powdered in dry ice. The powder was homogenized in cold phosphate buffered saline and the nuclei extract was obtained as explained.

For RNA-pull down assay, 0.8 nmol of 5'-biotin-labeled RNA oligos (O1, O2 and mutated O1) compassing SRSF3 binding motifs 1 and 2 from sororin intron 1, were immobilized onto 50 μ l of Neuroavidin beads (Thermo Scientific) in 1 \times TBS (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl) at 4°C for 2 h, followed by overnight incubation with 2 mg of PLC/PRF/5 or liver tissue protein nuclear extract at 4°C. Beads were then washed with 1 \times TBS and proteins were eluted with 40 μ l of 2 \times Laemmli buffer for western blot analysis.

Animal experiments

C57BL/6J male mice (Harlan) were used. The 16-week-old mice were injected i.v. with rAAVs (1 \times 10¹¹ pfu) (11). Experiments were performed 21 days after AAV injection using five animals per group and were repeated at least twice. Two-thirds partial hepatectomy (PH) and sham (SH) operations were performed as described previously (28).

Immunohistochemical staining

Immunohistochemical detection of γ -H2AX and Ki67 in paraffin embedded mouse liver tissues was carried out using

a rabbit antibody against γ -H2AX (Cell signalling #2577S; 1:1000) and a rabbit monoclonal antibody against Ki67 (Thermo Scientific RM-9106; 1:200) as described (11).

Ploidy analysis

Liver sections were deparaffinized and incubated in citrate buffer at 95°C for 20 min for antigen retrieval. Sections were incubated overnight at 4°C with anti- β -Catenin (BD Biosciences 610154, 1:400). Anti-mouse-Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher #R37120, 1:500) was used as the secondary antibody. Hoechst 33342 (0.2 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) was included in the final wash to counterstain nuclei. Images were taken using a LEICA DMI 6000 microscope at \times 20 magnification, PL APO objectives, a MicroMAX-1300Y/HS Princeton Instruments camera and Metamorph 7 software (Molecular Devices). At least 250 randomly selected fields of liver sections were imaged, corresponding to the analysis of more than 100 000 cells for nuclear ploidy analysis by a specific macro developed with ImageJ software (pixels ranging from 200 to 2500 px2) as previously described (29,30).

Human samples

Samples from patients included in the study were provided by the Biobank of the University of Navarra and were processed following standard operating procedures approved by the Ethical and Scientific Committees.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software. Data are represented as mean \pm SEM or as median when indicated. When appropriate, a Mann-Whitney U-test or independent Student's t-test was used to test for statistical differences between groups. The Chi-square test was used to compare frequencies. All experiments were performed at least three times in duplicate. A *P*-value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

SLU7 is required for the mitotic progression of transformed cells

We have demonstrated that SLU7 depletion induces the death of transformed cell lines of different origin without affecting the survival of normal liver cells (14). Given that spliceosome components are required for cell division (15,31) we decided to analyze the effect of SLU7 knockdown in cell-cycle progression. SLU7 knockdown induced a significant arrest in G2/M phase in the hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and HepG2 and in HeLa and H358 cell lines from cervical carcinoma and lung cancer respectively (Figure 1A). This arrest was confirmed with two independent SLU7 siRNAs in PLC/PRF/5 and HeLa cells (Supplementary Figure S1A). Nevertheless, cell-cycle distribution was not altered in normal human hepatocytes (HumHep) and the well differentiated human hepatoma cell line HepaRG after SLU7 knockdown (Figure 1A). In agreement with this mitotic arrest we found that SLU7 knockdown markedly

impaired the ability of PLC/PRF/5 cells to resume mitotic progression after release from overnight treatment with the mitotic inhibitor nocodazole (Supplementary Figure S1B). Ten hours after nocodazole release 58% of siSLU7 cells still remained arrested at G2/M comparing to 18% of control cells (siGL). These results indicate that SLU7 is required for progression through mitosis. The mitotic arrest upon SLU7 knockdown was confirmed by an increase in the mitotic index (Figure 1B), the increased expression of the mitotic marker Ser-10 phosphorylated histone H3 (H3S10P) (Figure 1C) and the induction of mitotic arrest deficient 2 (MAD2) protein, a key component of the mitotic checkpoint (Figure 1C), in asynchronous PLC/PRF/5 and HeLa cells 48 h after transfection with siSLU7. Altogether these results demonstrate that SLU7 knockdown compromises cell-cycle progression and more particularly mitosis progression in transformed cells.

SLU7 is required for proper spindle assembly and sister chromatid cohesion: regulation of sororin splicing

In the absence of SLU7 we noticed several mitotic abnormalities (Supplementary Figure S1C). PLC/PRF/5 cells transfected with control siRNA (siGL) displayed normal metaphases 2 h after release of overnight nocodazole treatment, with chromosomes properly aligned at the metaphase plate, correct bipolar spindles and SLU7 localization excluded from DNA (Figure 2A). However, in siSLU7 transfected cells those cells with reduced SLU7 expression displayed defects in chromosome alignment with failure of chromosomes to congress at the metaphase plate and defects in spindle polarity with monopolar or multipolar spindles (Figure 2B). The maintenance of euploidy depends on the fidelity of chromosome segregation, being aneuploidy a hallmark of most classes of solid tumors. The bipolar attachment of microtubules and the tension required to initiate anaphase depends largely on a correct SCC (32). During the last years it has been demonstrated that SCC is a process especially sensitive to alterations in the splicing machinery (18). To analyze SCC, we prepared chromosome spreads from nocodazole-arrested cells and we found that mitosis in control cells (siGL) displayed characteristic X shape chromosomes. However, most of the mitosis in the SLU7-depleted cells displayed parallel or split chromatids in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells (Figure 2C and Supplementary Figure S2A). This observation suggests that SLU7 is required for proper SCC. Different studies have associated reduced spliceosome activity with SCC defects due to splicing aberrations, being sororin pre-mRNA processing specially sensitive (18,21,33–35). Therefore, we decided to analyze if SLU7 regulates the splicing of sororin (Figure 2D). We found that SLU7 knockdown resulted in the accumulation of unspliced sororin pre-mRNA with increased retention of introns 1 and 2 (Figure 2E and F) using two different SLU7 siRNAs (Supplementary Figure S2B). The absence of contaminating genomic DNA was confirmed by PCR of RNA samples without retrotranscription (Supplementary Figure S2D). Accordingly, a reduction in sororin protein levels was observed in SLU7-depleted PLC/PRF/5 and HeLa cells (Figure 2G). Mechanistically, sororin antagonizes the cohesion release protein WAPL to ensure the

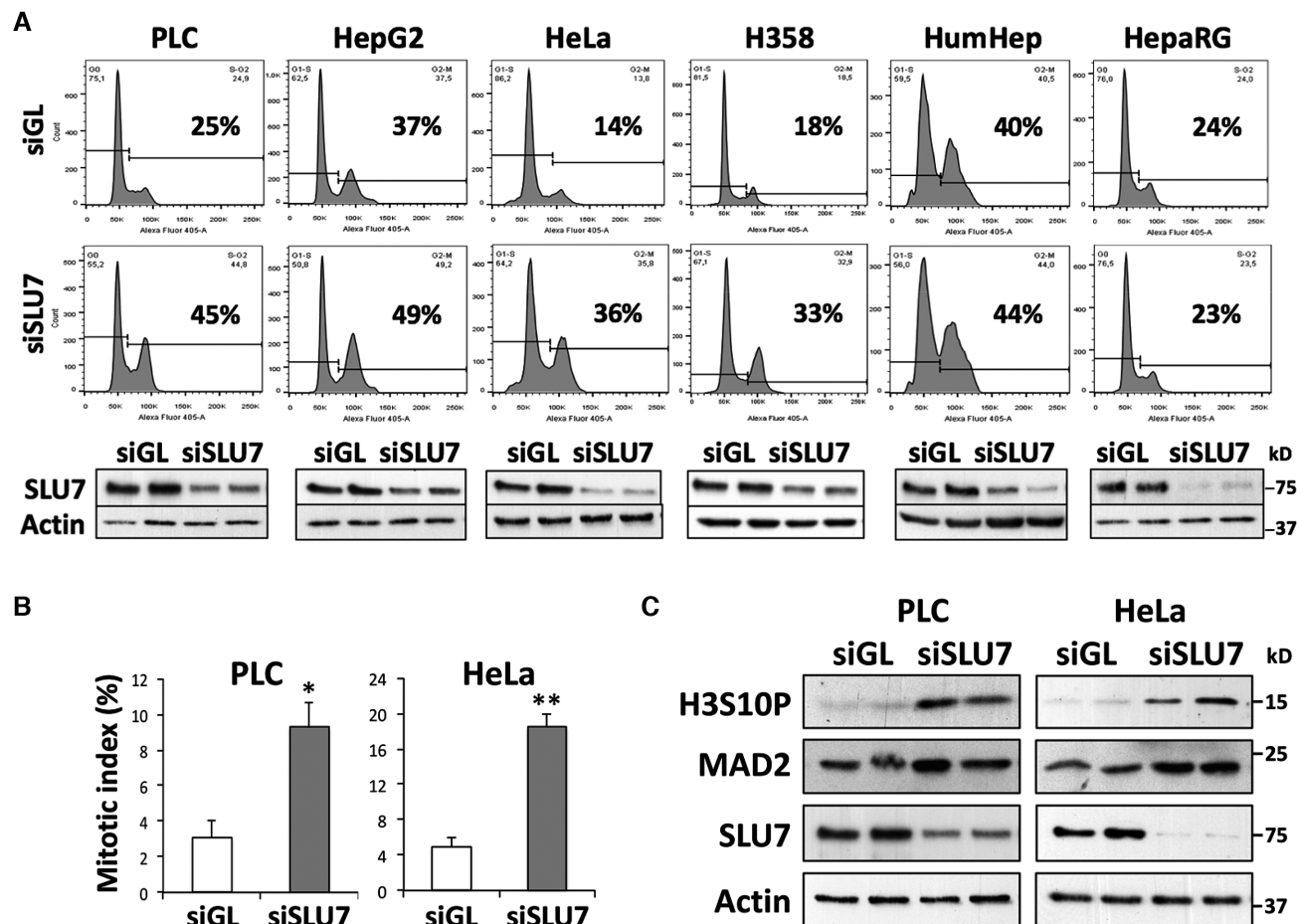


Figure 1. SLU7 is required for mitosis progression in transformed cells. (A) SLU7 knockdown induces cell-cycle arrest at G2/M in asynchronous transformed cells. Progression through the cell cycle was analyzed by FACS 48 h after transfection with siSLU7 or control siGL in asynchronous human hepatoma cells (PLC/PRF/5 and HepG2), the transformed cell lines HeLa (cervical carcinoma) and H358 (lung cancer), normal human hepatocytes (HumHep) and the well-differentiated human hepatoma cell line HepaRG. The percentage of cells in G2/M phase is indicated. Western blot analysis confirms SLU7 knockdown. Actin was used as loading control. At least two independent experiments of FACS analysis were performed for each cell line. (B) The mitotic index was calculated in asynchronous PLC/PRF/5 and HeLa cells 48 h after transfection with siSLU7 and control siGL by measuring the presence of condensed chromosomes stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). More than 250 cells per condition coming from five independent experiments performed in duplicates were counted. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (C) Western blot analysis of the mitotic marker Ser-10 phosphorylated histone H3 (H3S10P) and the mitotic arrest deficient 2 (MAD2) protein, in PLC/PRF/5 and HeLa cells 48 h after transfection with siSLU7 and control siGL.

stable association of cohesin with chromatin (36). In fact, sororin is essential for chromatid cohesion only in the presence of WAPL (36). To confirm that SCC defects elicited after SLU7 knockdown depend largely on sororin inhibition we simultaneously silenced WAPL expression. As shown in Supplementary Figure S2G–I, co-depletion of WAPL reversed SCC defects elicited in PLC/PRF/5 cells by SLU7 knockdown.

SLU7 is required to protect cells from R-loop formation and DNA damage induction

The depletion of RNA processing factors, including the splicing factor SRSF1 (ASF/SF2), has been associated with G2/M arrest and genome instability through more direct mechanisms than SCC control, such as the formation of RNA-DNA hybrids or R-loops (6,37). R-loops contribute to genome instability in at least two ways: by the exposure of ssDNA and thus increasing the risk of DNA damage

and mutagenesis, and by inducing DNA replication stress through the impairment of replication fork progression (38,39). We have already demonstrated that SLU7 knockdown induces DNA damage in transformed cells (14) (Supplementary Figure S3A) and now we show that it also induces G2/M arrest. Therefore, we decided to analyze R-loop formation in SLU7 silenced cells. As shown in Figure 3A and B and Supplementary Figure S3B–E, by immunocytochemistry, dot-blot and non-denaturing bisulfite footprinting, we found that SLU7 knockdown leads to R-loop formation in both PLC/PRF/5 and HeLa cells, and that these R-loops are resolved in the presence of RNase H1 (RNH1). Interestingly we also observed that the increase in γ -H2AX detected upon SLU7 knockdown was significantly reduced by RNase H1 transfection (Figure 3C), suggesting that DNA damage induced by SLU7 knockdown depends largely on R-loop formation. Accordingly, phosphorylated replication protein A (RPA), an ssDNA-binding heterotrimeric complex sensor of DNA damage,

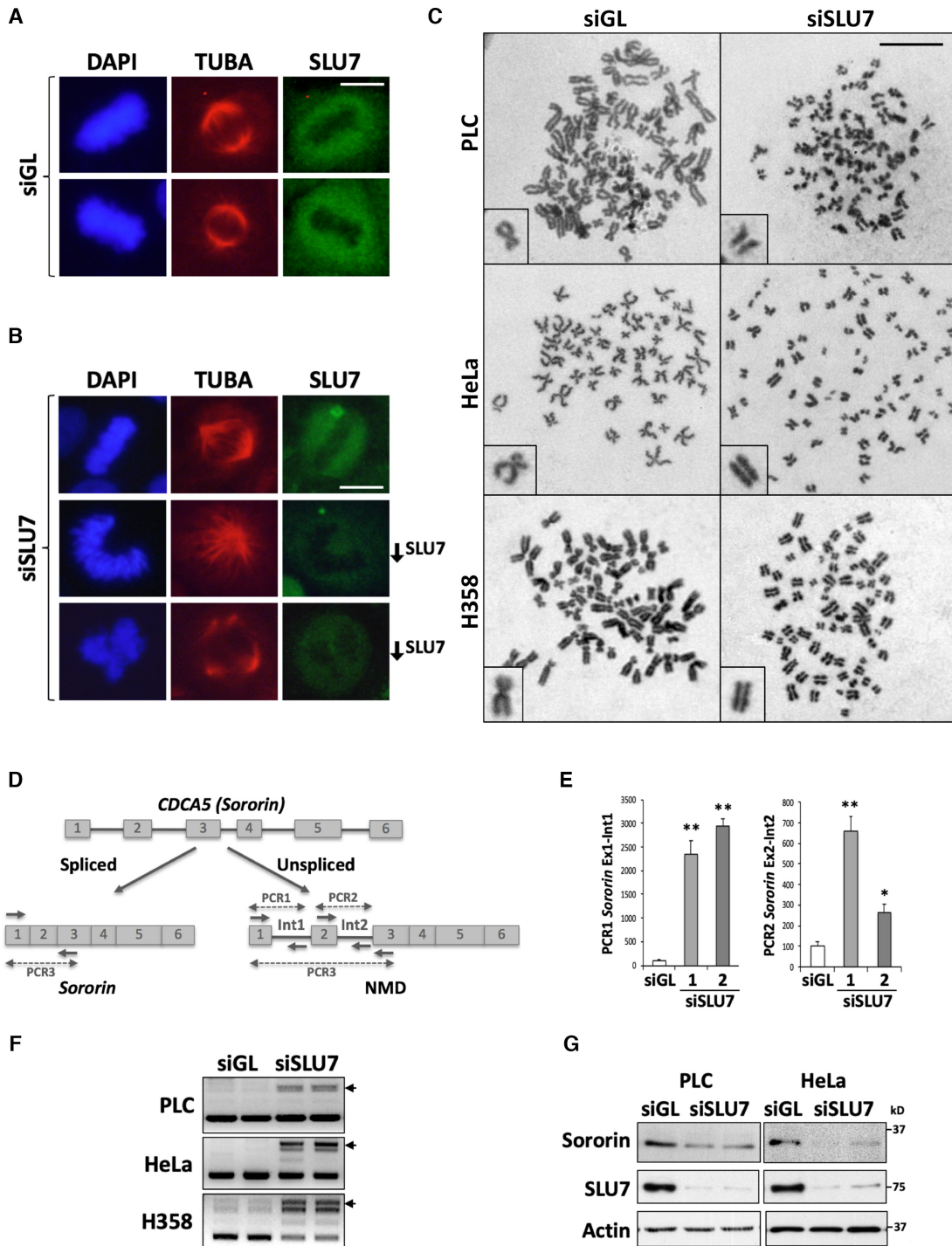


Figure 2. SLU7 is required for proper spindle assembly and SCC. (A) Metaphases were analyzed by immunofluorescence in PLC/PRF/5 cells 48 h after transfection with control siGL and 2 h after release of overnight treatment with nocodazole. Immunodetection of SLU7 expression and localization is shown in green, the mitotic spindle was visualized with anti- α -Tubulin (TUBA) antibody (red) and DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar: 10 μ m. (B) Cells transfected with siSLU7 were treated as in A. Cells with normal levels of SLU7 presented their chromosomes aligned in the metaphase plate and normal spindles as control siGL cells. Cells with reduced SLU7 levels (\downarrow SLU7) showed abnormal (monopolar or multipolar) spindle morphology. Scale bar: 10 μ m. (C) Representative images of metaphase chromosome spreads from PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 h after transfection with siGL or siSLU7. Scale bar: 10 μ m. (D) Schematic representation of the genomic locus of human *CDC45* (sororin) gene and the transcripts generated after the correct splicing or the aberrant retention of introns 1 and 2. The location of primers used for PCR1, PCR2 and PCR3 is indicated. (E) Real time quantification of the incorporation of intron 1 (PCR1) and intron 2 (PCR2) into *sororin* mRNA in PLC/PRF/5 cells 48 h after transfection with two different SLU7-specific siRNAs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (F) Analysis of *sororin* transcripts using PCR3 as described in D, in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 h after transfection with siSLU7. Arrows indicate the aberrant intron-incorporating isoforms. (G) Western blot of sororin and SLU7 in PLC/PRF/5 and HeLa cells 48 h after transfection with siSLU7. Actin expression is shown as loading control. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

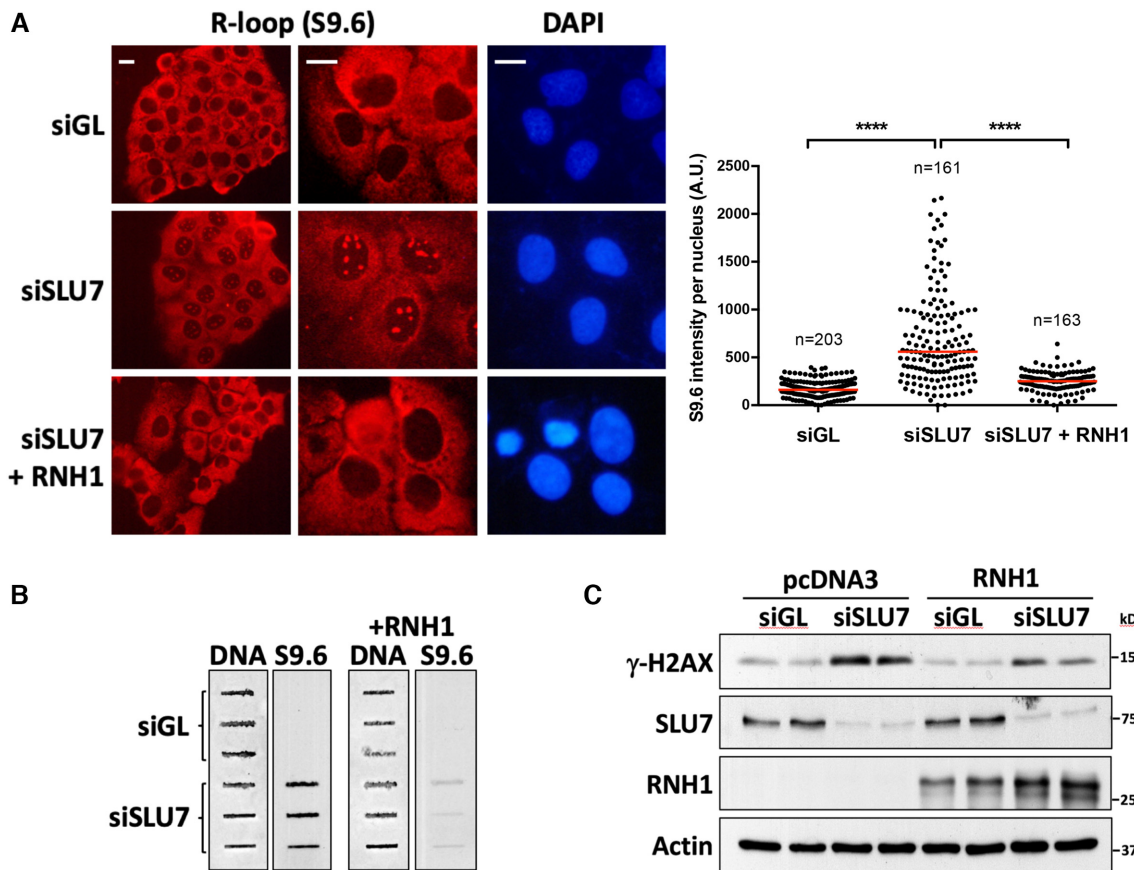


Figure 3. SLU7 protects from R-loop formation and DNA damage induction. (A) PLC/PRF/5 cells were probed for R-loops using the S9.6 antibody 48 h after siSLU7 transfection. Cells were transfected with a RNase H1 (RNH1) expressing plasmid to resolve R-loops as control. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. The right panel shows the quantification of RNA–DNA hybrids (R-loops) per nucleus with ImageJ software. The DAPI signal was used to create a mask of the nucleus. The nuclear S9.6 signal intensity was then determined. The number of nucleus analyzed per condition is indicated. The plot was represented using GraphPad Prism. Red bars represent the median. **** $P < 0.0001$ (Mann–Whitney U-test). (B) Slot-blot analysis of R-loops using S9.6 antibody in genomic DNA from PLC/PRF/5 cells 48 h after transfection with siGL or siSLU7. Right panels show the same analysis using genomic DNA after treatment with RNase H1 as control (+RNH1). DNA was stained with methylene blue to show equal loading. (C) Western blot analysis of γ -H2AX and SLU7 in PLC/PRF/5 cells 48 h after transfection with siGL or siSLU7, and a control plasmid (pcDNA3) or a plasmid expressing RNase H1 (RNH1). Actin expression is shown as loading control. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

replication stress and R-loops (40), was significantly increased upon SLU7 knockdown in PLC/PRF/5 cells, reduced upon RNase H1 transfection (Supplementary Figure S3F) and colocalized with R-loops (Supplementary Figure S3G). We next asked whether SLU7 knockdown also induced transcription-associated genomic instability in the non-tumorigenic cell line HepaRG. As shown in Supplementary Figure S3H and I we were able to detect R-loops formation, in parallel with an increase of γ -H2AX in siSLU7 transfected cells, thus confirming the relevance of SLU7 in maintaining genome integrity.

SLU7 controls *SRSF1* and *SRSF3* splicing and prevents the expression of truncated *SRSF3* (*SRSF3-TR*) proteins

As it has been recently shown for other spliceosome factors (41) the absence of SLU7 could be directly responsible for the formation of R-loops. However, we have already demonstrated that SLU7 regulates *SRSF3* splicing (11) and it is known that *SRSF3* in turn regulates the expression of

SRSF1 (42,43), which as mentioned before has been implicated in the protection against R-loop formation (37). Therefore, we evaluated the effect of SLU7 knockdown on *SRSF1* and *SRSF3* splicing (Figure 4A and Supplementary Figure S2B–F). As shown in Figure 4B, confirming our previous findings (11), SLU7 knockdown induced the incorporation of exon 4 into *SRSF3* pre-mRNA to generate *SRSF3* isoform 2 (*SRSF3-ISO2*) in HCC cells, including HepaRG (Supplementary Figure S3I). Interestingly, this effect was also observed in HeLa and H358 cells (Figure 4B) using two different siRNAs and a *SRSF3-ISO2*-specific PCR (Supplementary Figure S2B). These results prompted us to evaluate if SLU7 effect on *SRSF3* splicing was direct. To this end we performed an RNA-CLIP assay and we found that SLU7 binds *SRSF3* mRNA (Supplementary Figure S2C). Moreover, SLU7 knockdown significantly modified the splicing of *SRSF1* in the three cell lines tested, inducing the aberrant skipping of exon 4 in PLC/PRF/5 and H358 cells (Figure 4B and Supplementary Figure S2B, D and E) and the aberrant incorporation of intron 3 in HeLa

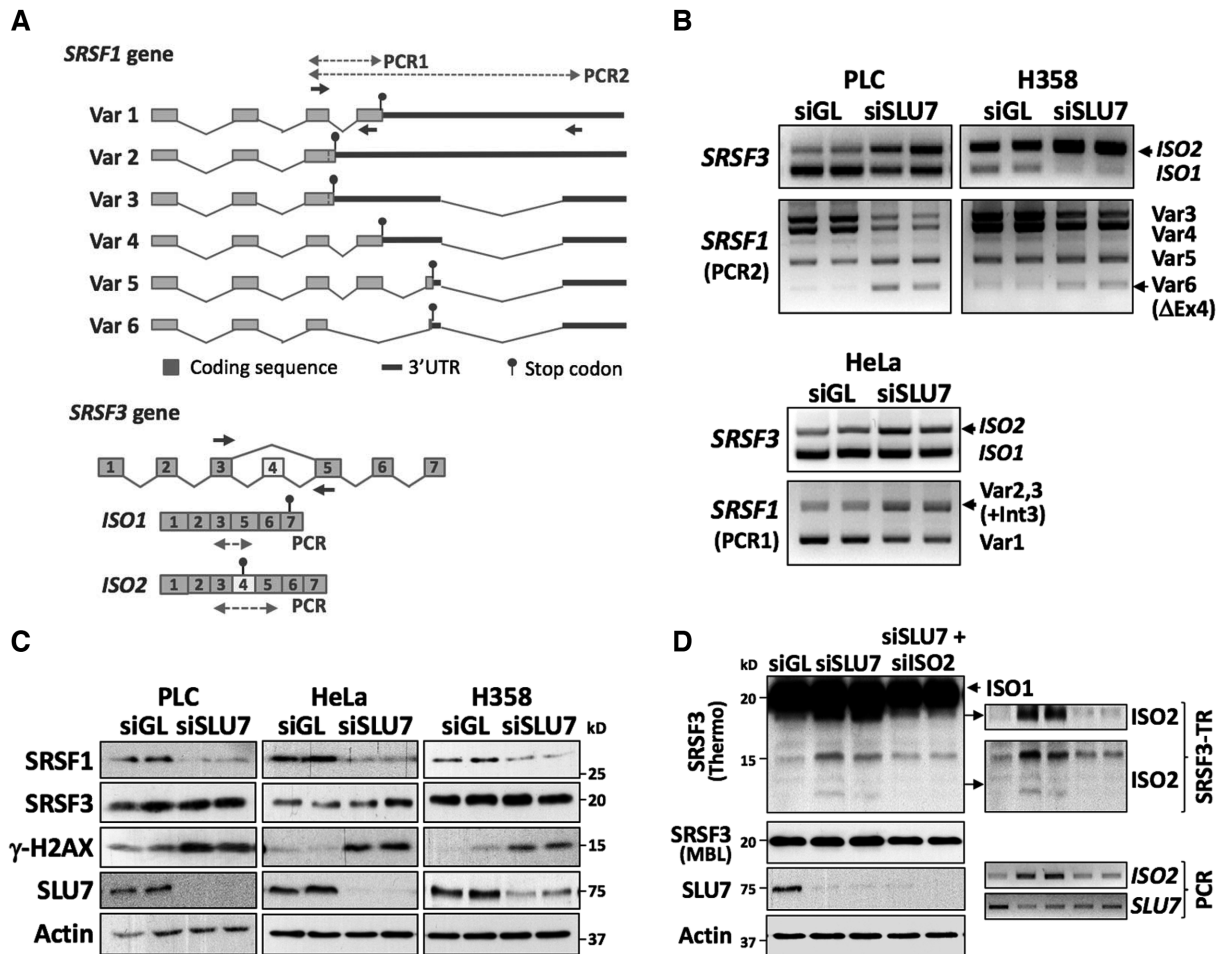


Figure 4. SLU7 controls *SRSF1* and *SRSF3* pre-mRNAs splicing and prevents the induction of *SRSF3*-TR forms. (A) Schematic representation of *SRSF1* and *SRSF3* genes and the different mRNAs generated by alternative splicing. The location of primers used for PCRs are indicated. (B) PCR detection of *SRSF3* and *SRSF1* isoforms 48 h after transfection with siGL or siSLU7 in the indicated cell lines. The aberrant isoforms are indicated by arrowheads. (C) Western blot analysis of *SRSF1*, *SRSF3* (antibody from MBL), γ -H2AX and SLU7 in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 h after transfection with siGL and siSLU7. Actin was used as loading control. (D) Western blot analysis of truncated *SRSF3* forms (antibody from Thermo) in H358 cells 48 h after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7+siISO2. Western blot analysis of SLU7 and Actin protein levels as loading control are shown. Upper right panels show different exposures of the same membrane probed with anti-*SRSF3* antibody to better identify the truncated *SRSF3* forms. Lower right panels show the RT-PCR analysis of *SRSF3*-ISO2 and *SLU7* mRNAs. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

cells (Figure 4B; Supplementary Figure S2B and F). Consequently, these splicing alterations significantly reduced the expression of *SRSF1* protein in the three cell lines (Figure 4C). However, *SRSF3* protein levels were not affected (Figure 4C). *SRSF3*-ISO2 mRNA incorporates a premature termination codon (PTC) and would be degraded by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) system. However, it has been shown that this isoform can be also translated into a truncated protein which lacks part of the RS domain (*SRSF3*-TR) (44,45). Therefore, we decided to re-evaluate *SRSF3* expression with another antibody induced against a peptide epitope (aa 84–104 from Thermo Fisher) that should be contained in all the isoforms. As shown in Figure 4D, we found that upon SLU7 knockdown several truncated *SRSF3* forms (*SRSF3*-TR) were detected. Interestingly, all *SRSF3*-TR forms would be expressed from *SRSF3*-ISO2 mRNA, as they were inhibited when upregulation of *SRSF3*-ISO2 mRNA was prevented by the co-

transfection of siSLU7 with a *SRSF3* exon 4 specific siRNA (siISO2) (Figure 4D and Supplementary Figure S4A). In all, our results demonstrate that SLU7 is essential to maintain the correct splicing of *SRSF1* and *SRSF3*, and to prevent the expression of truncated *SRSF3* proteins.

***SRSF3*-TR proteins induced upon SLU7 knockdown may function as *SRSF3* dominant negative and regulate *SRSF1* expression and R-loop formation**

In view of the above findings, we decided to evaluate the implication of *SRSF3*-ISO2 and *SRSF3*-TR in the alteration of *SRSF1* splicing and R-loop formation induced upon SLU7 knockdown. As shown in Figure 5A, prevention of *SRSF3*-ISO2 upregulation by co-transfection of siSLU7 with siISO2 in PLC/PRF/5 and HeLa cells (Supplementary Figure S4A), corrected the splicing alterations of *SRSF1* induced upon SLU7 knockdown. This effect was translated

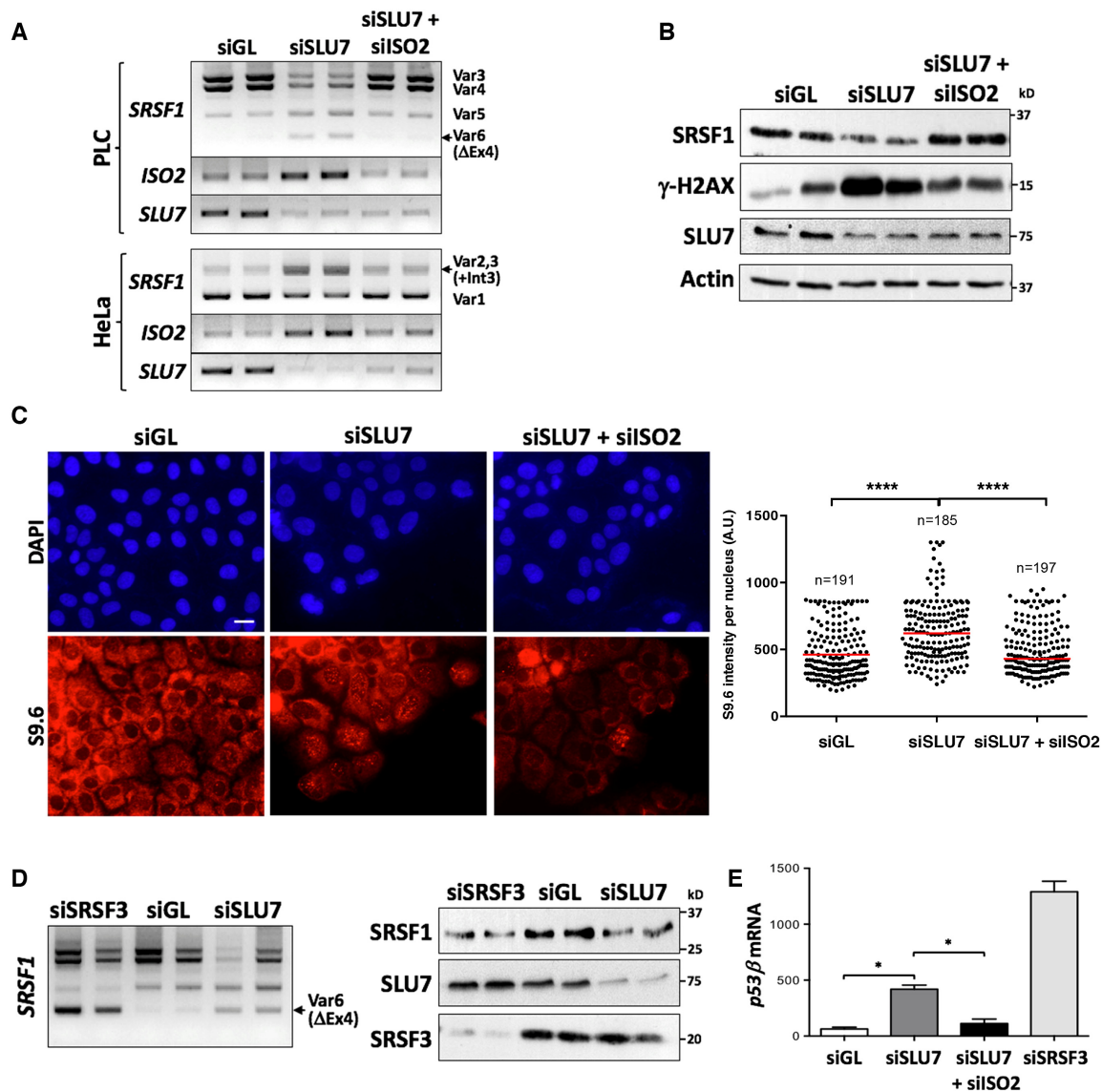


Figure 5. SRSF3-TR forms induced upon SLU7 knockdown behave as dominant-negative controlling *SRSF1* splicing and R-loops. (A) The generation of aberrant splice variants of *SRSF1* induced upon SLU7 knockdown (siSLU7) in PLC/PRF/5 and HeLa cells is prevented by co-transfection with siISO2 targeting the truncated forms of *SRSF3*. The expression of *SRSF3-ISO2* and *SLU7* is shown as control. (B) The downregulation of *SRSF1* protein and the induction of DNA damage (γ -H2AX) in PLC/PRF/5 cells after SLU7 knockdown are prevented by co-transfection with siISO2 (samples are the same as in panel A). Western blot analysis of *SLU7* and Actin are shown as control. (C) The induction of R-loops after SLU7 knockdown was significantly reduced after co-transfection with siISO2 in PLC/PRF/5 cells (R-loops were detected by immunofluorescence with the S9.6 antibody). Scale bar: 10 μ m. The right panel shows the quantification of RNA–DNA hybrids (R-loops) per nucleus with ImageJ software. The DAPI signal was used to create a mask of the nucleus. The nuclear S9.6 signal intensity was then determined. The number of nucleus analyzed per condition is indicated. The plot was represented using GraphPad Prism. Red bars represent the median. **** $P < 0.0001$ (Mann–Whitney U-test). (D) *SRSF3* (siSRSF3) knockdown in PLC/PRF/5 cells results in aberrant *SRSF1* splicing and reduced protein, reproducing the effects of SLU7 (siSLU7) knockdown. Western blot analyses of *SRSF1*, *SLU7* and *SRSF3* proteins are shown. (E) Real time PCR of *p53* isoform beta (*p53* β) in PLC/PRF/5 cells 48 h after transfection with siSLU7, siSLU7 + siISO2 or siSRSF3. * $P < 0.05$.

into the recovery of *SRSF1* protein expression and the inhibition of DNA damage induction (Figure 5B and Supplementary Figure S4B). In agreement with these results we found that preventing *SRSF3-ISO2* induction significantly reduced the accumulation of R-loops upon SLU7 knockdown (Figure 5C). Taken together these results suggest that, although SLU7 could play a direct role preventing the formation of R-loops, this effect could be also dependent on the correct expression of *SRSF1* and *SRSF3*.

As mentioned before, it has been shown that *SRSF3* depletion results in the inhibition of *SRSF1* expression (42,43). However, in our system *SRSF3* expression is not modified. Therefore, we hypothesized that after SLU7 knockdown, *SRSF3-TR* could act as a dominant negative regulator of *SRSF3*. To test this hypothesis, we first studied if the inhibition or knockdown of *SRSF3* had the same effect on *SRSF1* splicing than siSLU7. Both *SRSF3* and SLU7 knockdown reduced *SRSF1* protein expression and

altered *SRSF1* splicing increasing the skipping of exon 4 in PLC/PRF/5 cells (Figure 5D) or the inclusion of intron 3 in HeLa cells (Supplementary Figure S4C). SRSF3 knockdown also induced R-loops formation in PLC/PRF/5 cells (Supplementary Figure S4D). Moreover, the splicing target of SRSF3, *p53 β* , which is significantly induced upon SRSF3 knockdown (46) is also markedly induced after SLU7 knockdown, and this effect is blunted by the co-transfection of siISO2 (Figure 5E). All these results confirm that the truncated forms of SRSF3-TR elicited upon SLU7 knockdown could behave as dominant negative species toward SRSF3 activity.

SRSF3-TR proteins induced upon SLU7 knockdown regulate *sororin* splicing and SCC independently of SRSF3 inhibition

At this point it was important to analyze the role of *SRSF3-ISO2* and SRSF3-TR in the cellular phenotype induced upon SLU7 knockdown. As shown in Figure 6, we found that when the induction of *SRSF3-ISO2* was prevented (Supplementary Figure S4A) the cell-cycle arrest (Figure 6A), the defect in SCC (Figure 6B) and the apoptosis (Figure 6C) induced upon SLU7 knockdown were averted. Moreover, we also found that the aberrant splicing of *sororin* was also significantly corrected in the three cell lines tested (Figure 6D and E). However, and unexpectedly in this case the effect of SRSF3-TR proteins cannot be attributed to an inhibition of SRSF3 acting as dominant negative forms, because SRSF3 knockdown had no effect on *sororin* splicing (Figure 6F) in none of the three cell lines tested. These results suggest that the induction of *SRSF3-ISO2* could directly alter the splicing of *sororin*. To test this possibility, we prepared three different constructs to express the isoforms codified by *SRSF3-ISO2* (Supplementary Figure S4E and F): one ending at the end of exon 4, another construct ending at the PTC present in exon 4 and the same sequence fused to the V5 tag. We found that transfection of all three constructs into PLC/PRF/5 cells induced a significant increase in the incorporation of introns 1 and 2 in *sororin* transcripts (Figure 6G). In addition, overexpression of SRSF3-TR proteins upon *SRSF3-ISO2* transfection induced the formation of R-loops in PLC/PRF/5 (Supplementary Figure S4F). A bioinformatic analysis revealed two putative SRSF3 binding motifs (32,37) in *sororin* intron 1 (Supplementary Figure S4G). Therefore, we performed RNA-pull down assays using PLC/PRF/5 cells transfected with *SRSF3-ISO2* and two synthetic biotinylated RNA oligos containing motif 1 or motif 2. As shown in Figure 6H we found that *SRSF3-ISO2* binds the two motifs present in *sororin* intron 1. More importantly, we detected the binding to both oligos of the truncated SRSF3 proteins (SRSF3-TR) induced upon SLU7 knockdown in PLC/PRF/5 cells (Figure 6I). Interestingly, under these conditions the oligos were able to bind the aberrant SRSF3 isoforms induced upon SLU7 knockdown (see arrows in Figure 6I). This binding was prevented when the motif sequence in oligo 1 was mutated (Supplementary Figure S4H), thus confirming binding specificity. As these isoforms retain the RNA recognition motif (RRM) but have partially lost the RS domain implicated in the interaction with other proteins, the normal regulation of splicing by SRSF3 could be altered. In sum,

our results suggest that the truncated forms of SRSF3 can acquire new functions and therefore may participate in the induction of genome instability.

miR-17 rescues cell-cycle arrest and prevents the induction of truncated SRSF3 proteins upon SLU7 knockdown

As mentioned before, we previously demonstrated that miR-17 was able to rescue the death of transformed cells occurring upon SLU7 knockdown (14). We wondered if miR-17 would play a role in any of the events preceding cell death. We first demonstrated that miR-17 prevented the cell-cycle arrest at G2/M induced in SLU7-depleted PLC/PRF/5 (Figure 7A), HeLa and H358 (Supplementary Figure S5A) cells. As shown in Supplementary Figure S5B miR-17 also restored cell-cycle progression in SLU7-depleted PLC/PRF/5 cells after nocodazole release. In addition, normal SSC was observed after co-transfection of miR-17 with siSLU7 in PLC/PRF/5 (Figure 7B) and HeLa (Supplementary Figure S5C) cells. Importantly we found that this effect was parallel to the correction of *sororin* splicing (Figure 7C and Supplementary Figure S5D) and *sororin* expression (Figure 7D).

Bioinformatic analysis predicted a low score putative site for miR-17 in *SRSF3* exon 4 (Figure 7E). As mentioned before, exon 4 incorporates a PTC and it has been shown that PTC-containing mRNAs become substrates of microRNAs because the sequence downstream of the PTC acquires a 3'UTR identity (47). To verify this hypothesis, we cloned *SRSF3* exon 4 sequence (pEXON4) and this exon with the mutated seed sequence (pMut) fused to the 3' end of the luciferase ORF in the reporter plasmid pMIR (Figure 7E). We co-transfected PLC/PRF/5 and HeLa cells with pEXON4 or pMut plasmids and the synthetic miR-17 mimic or the mock oligo as negative control. As shown in Figure 7E, miR-17 significantly reduced luciferase activity of pEXON4 plasmid, with no effect on pMut plasmid. In agreement with this we found that the induction of *SRSF3-ISO2* mRNA observed in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells after SLU7 knockdown was significantly prevented by miR-17 transfection (Figure 7F and Supplementary Figure S5E). Accordingly, the induction of SRSF3-TR forms upon SLU7 knockdown was inhibited by miR-17 co-transfection (Figure 7G). These results demonstrate that *SRSF3-ISO2* mRNA is a target of miR-17. We therefore decided to study if miR-17 was also able to rescue the aberrations in *SRSF1* splicing and the accumulation of R-loops induced upon SLU7 knockdown. As shown in Figure 7H and I and in agreement with the involvement of *SRSF3-ISO2* in those effects, miR-17 significantly corrected *SRSF1* splicing and R-loops formation when co-transfected with siSLU7 in PLC/PRF/5 cells.

SLU7 knockdown induces genomic instability *in vivo*

Our findings so far demonstrate that SLU7 is a gatekeeper of genomic integrity preventing the formation of R-loops and the induction of DNA damage and securing the correct segregation of chromosomes during mitosis. In view of this, it was very relevant to analyze if SLU7 played this role also *in vivo*. Although hepatocytes are quiescent cells

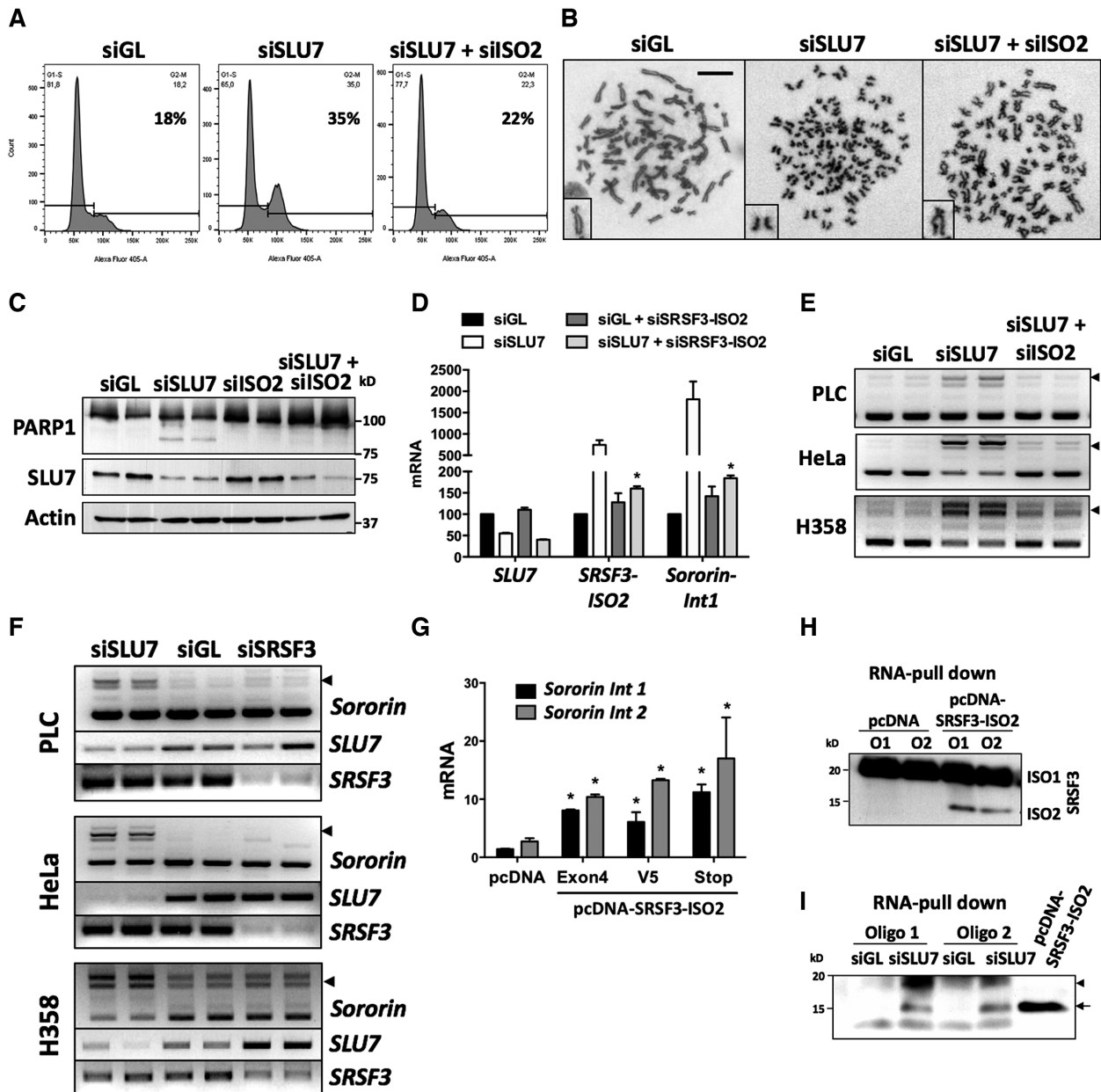


Figure 6. SLU7 knockdown-induced SRSF3-TR impair cell-cycle progression and SCC, promote apoptosis and modulate *sororin* splicing. (A–C) Cell-cycle arrest A, loss of SCC as detected by chromosome spreads B (scale bar: 10 μ m) and apoptosis as detected by the cleavage of PARP C induced in PLC/PRF/5 cells 48 h after SLU7 knockdown were prevented by co-transfection with siISO2. (D and E) The aberrant incorporation of intron 1 in *sororin* transcripts after SLU7 knockdown in PLC/PRF/5 cells, detected by real time PCR1 D or gel electrophoresis (PCR3) E was prevented after co-transfection with siISO2. The expression of *SLU7* and *SRSF3-ISO2* is also shown in D as control. (F) PCR detection (PCR3 in Figure 2D) of the aberrant splicing of *sororin* (arrowheads) in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 h after SLU7 (siSLU7) or SRSF3 (siSRSF3) knockdown. The expression of *SLU7* and *SRSF3* is shown as control. (G) PLC/PRF/5 cells were transfected with a control plasmid (pcDNA) or three constructs (Exon4, V5 and Stop) that overexpress *SRSF3-ISO2* mRNA (see Supplementary Figure S4E and F). The incorporation of intron 1 and intron 2 into the mRNA of *sororin* was analyzed by real time PCR1 and PCR2 (from Figure 2D). (H) Western blot analysis of SRSF3 after RNA-pull down using two biotinylated RNA oligos (O1 and O2) from *sororin* intron 1 containing two putative binding motifs for SRSF3. Extracts using in pull down assays were from PLC/PRF/5 cells transfected with the empty plasmid (pcDNA) or a plasmid expressing SRSF3-ISO2 (stop construct). (I) Western blot analysis of SRSF3 after RNA-pull down with the O1 and O2 biotinylated RNA oligos described in H using extracts from PLC/PRF/5 cells transfected with control siGL or siSLU7. The truncated isoform expressed from the pcDNA-SRSF3-ISO2 Stop construct is shown as control (arrow). The two truncated SRSF3 isoforms induced upon SLU7 knockdown (arrow and arrowhead) are able to bind both oligos. * $P < 0.05$. All experiments were performed at least three-times with biological duplicates per condition.

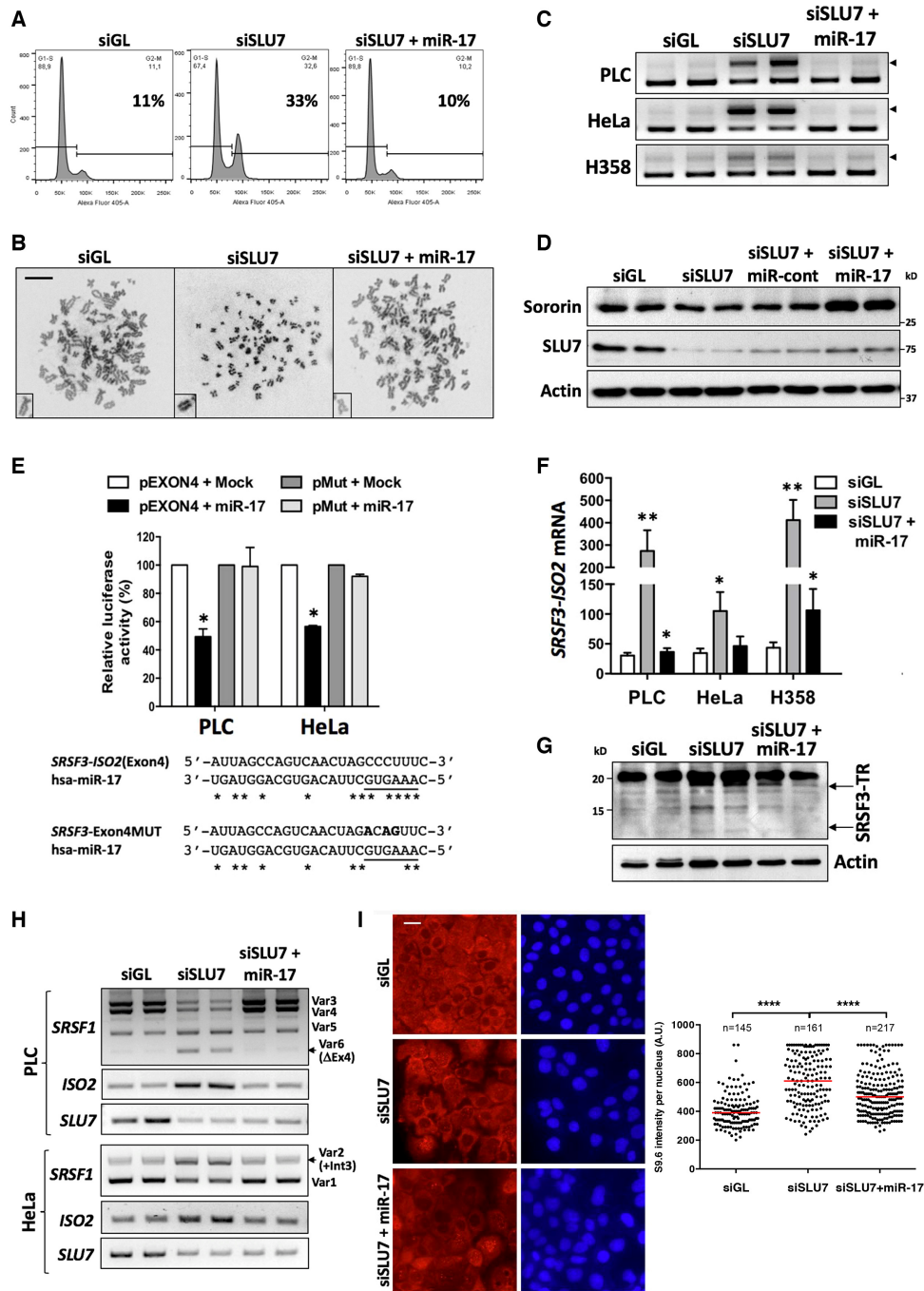


Figure 7. miR-17 rescues cell-cycle arrest and prevents the induction of SRSF3-TR proteins upon SLU7 knockdown. (A and B) Cell-cycle arrest A and loss of SCC detected by chromosome spreads B (scale bar: 10 μ m) induced in PLC/PRF/5 cells 48 h after SLU7 knockdown was prevented by co-transfection with miR-17. (C) The aberrant splicing of *sororin* induced in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 h after SLU7 knockdown was also prevented by co-transfection with miR-17. (D) Co-transfection of miR-17 with siSLU7 recovered sororin protein levels downregulated by siSLU7 in PLC/PRF/5 cells. (E) SRSF3 exon 4 was cloned as 3'UTR in the pMIR-REPORT luciferase plasmid (pEXON4). The same sequence with the mutations at the miR-17 recognition motif marked in bold was also cloned (pMut) as control. PLC/PRF/5 and HeLa cells were transfected with pEXON4 or pMut plasmids and miR-17 or a control miRNA (Mock). Luciferase activity was analyzed 48 h after transfection. * $P < 0.05$. (F) The expression of *SRSF3-ISO2* was measured by real time PCR in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 h after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (G) Western blot analysis of SRSF3 in H358 cells 48 h after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17. The truncated forms of SRSF3 are indicated by arrows. (H) The generation of aberrant splice variants of *SRSF1* induced upon SLU7 knockdown (siSLU7) in PLC/PRF/5 and HeLa cells is prevented by co-transfection with miR17. The expression of *SRSF3-ISO2* and *SLU7* is shown as control. (I) The induction of R-loops after SLU7 knockdown was significantly reduced after co-transfection with miR-17 in PLC/PRF/5 cells (R-loops were detected by immunofluorescence with the S9.6 antibody). Scale bar: 10 μ m. The right panel shows the quantification of RNA–DNA hybrids per nucleus with ImageJ software. The DAPI signal was used to create a mask of the nucleus. The nuclear S9.6 signal intensity was then determined. The number of nucleus analyzed per condition is indicated. The plot was represented using GraphPad Prism. Red bars represent the median. **** $P < 0.0001$ (Mann–Whitney U-test). All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

the liver has a unique capacity to regenerate after partial hepatectomy (PH). Our previous study demonstrated that SLU7 knockdown promotes the de-differentiation of hepatocytes and their entry into the cell cycle both in resting conditions and after PH (11). We decided to evaluate whether SLU7 is required for the correct progression through mitosis. We performed 2/3 PH in mice 21 days after knocking down SLU7 expression with an AAV encoding a SLU7-specific shRNA (AAV-shSLU7) (Supplementary Figure S6A). As shown in Figure 8A Ki67 immunostaining in sham-operated control samples (SH) confirmed the promotion of cell-cycle entrance of hepatocytes upon SLU7 knockdown. However, Ki67 immunostaining also showed that progression through mitosis after PH was significantly altered when SLU7 expression was silenced. We found that the accumulation of hepatocytes at anaphase observed in control AAV-Ren mice at the peak of mitosis, 48 h after PH (Figure 8A) was impaired in AAV-shSLU7 mice. In fact, AAV-shSLU7 mice showed an accumulation of hepatocytes arrested at prometaphase and metaphase at 48 h and even at 72 and 96 h after PH (Figure 8A). Importantly this effect was translated into a significant delay in the recovery of liver mass 96 h after PH in SLU7 knockdown mice (Figure 8B). We then analyzed sororin gene expression, finding it already induced 24 h after PH in the liver of both control AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice (Figure 8C). However, the peak induction of *sororin* mRNA observed in AAV-Ren mice 34 h after PH was completely absent in AAV-shSLU7 mice. Interestingly, we detected an aberrant incorporation of intron 1 in *sororin* mRNA only in AAV-shSLU7 mice 24 h after PH (Figure 8C and Supplementary Figure S6B). Importantly we found that the induction of sororin protein observed in control mice (AAV-Ren) 24 h after PH was absent when SLU7 expression was knocked down (AAV-shSLU7) (Figure 8D). This effect was parallel to the onset of DNA damage (γ -H2AX levels), the activation of the spindle assembling checkpoint (SAC) evidenced by the induction of MAD2, and the induction of the major cell-cycle inhibitor P21 (Figure 8D). Together, all these results confirm *in vivo* the relevance of maintaining a correct level of expression of SLU7 to secure the normal progression through mitosis and to prevent genomic instability.

Our previous studies demonstrated that SLU7 expression is reduced in the liver of cirrhotic patients and in HCCs (12). It has also been shown that the DNA damage sensor γ -H2AX is significantly increased not only in HCC but also in the preneoplastic cirrhotic liver (48) and that DNA damage induction is associated with the development of liver cancer (19,49). We wondered if SLU7 knockdown could be associated with the development of DNA damage and genome instability in the normal resting liver. As shown in Figure 8E SLU7 knockdown in the normal liver was paralleled by the induction of DNA damage as evidenced by an increase in γ -H2AX detected by western blot (Figure 8E) and immunohistochemistry (Supplementary Figure S6C). This was also accompanied by an increase in the expression of *SRSF3-ISO2* (Figure 8E), and importantly by the alteration of hepatocyte nuclear ploidy with a trend toward a reduction in the diploid fraction and a significant increase in the octoploid fraction of hepatocytes (Figure 8F and Supplementary Figure S6D).

To explore the clinical relevance of our findings, we investigated the presence of *SRSF3-ISO2* forms in the liver of patients with cirrhosis and HCC. As shown in Figure 8G, *SRSF3-ISO2* mRNA levels were significantly elevated in human cirrhotic liver tissues and HCCs. We also performed an RNA-pull down assay with the biotinylated RNA oligo containing the putative SRSF3 binding motif 1 in sororin intron 1 described above using pooled extracts from three control livers (CO), three cirrhotic livers (CI) and three HCCs. Consistent with the observed *SRSF3-ISO2* mRNA contents, we detected increased levels of SRSF3-TR forms in the cirrhotic liver and in HCC extracts (Figure 8H). These results show for the first time that aberrant forms of SRSF3 are expressed in diseased human liver and are able to bind putative SRSF3 binding sites, in this case in the first intron of sororin.

DISCUSSION

From a mechanistic point of view, the involvement of mRNA processing factors in the maintenance of genome integrity takes place at different levels, indirectly through the regulation of the transcription and splicing of DNA damage response (DDR) and mitotic genes (9,15), or more directly through the prevention of the co-transcriptional formation of R-loops (6,9). Moreover, it has been suggested that mitotic errors and DNA damage are mechanistically separate outcomes of perturbed mRNA splicing (50). Our results confirm this hypothesis, and now we identify the splicing regulator protein SLU7 as a key factor in the preservation of genome integrity. SLU7 is an evolutionary conserved mRNA binding protein, essential during the second catalytic step in the pre-mRNA splicing process (51). Herein we define the molecular mechanisms through which SLU7 plays a non-redundant role in protecting from the accumulation of genetic lesions during fundamental events in DNA metabolism.

DNA damage, which according to Pedersen *et al.* would precede mitotic aberrations (50), would be mainly associated with the development of R-loops. Cotranscriptional R-loops, formed by the rehybridization of the nascent RNA molecule on the DNA template, are considered a major source of DNA breaks and transcription-associated genome instability (TAGIN) (10). Several studies have identified a number of RNA-binding factors that protect nascent RNA and prevent its reaction with the DNA template (6,52). One of the earliest RNA processing factors identified in this context was SRSF1 (37). Therefore, the role of SLU7 in preventing TAGIN could be mediated through its direct interaction with nascent RNA or through the preservation of the splicing and expression of other RNA processing factors like SRSF1 as we report here, albeit the coexistence of both mechanisms cannot be excluded.

We also observed profound mitotic aberrations upon SLU7 knockdown, including impaired spindle assembly, SCC and cell-cycle arrest. A central role has been established for the spliceosome machinery in the coordinated regulation of SCC during mitotic progression (18). Here also, the expression of SRSF1 was found essential for bipolar spindle formation and normal mitosis (53). Therefore, the impaired expression of SRSF1 can explain in part the

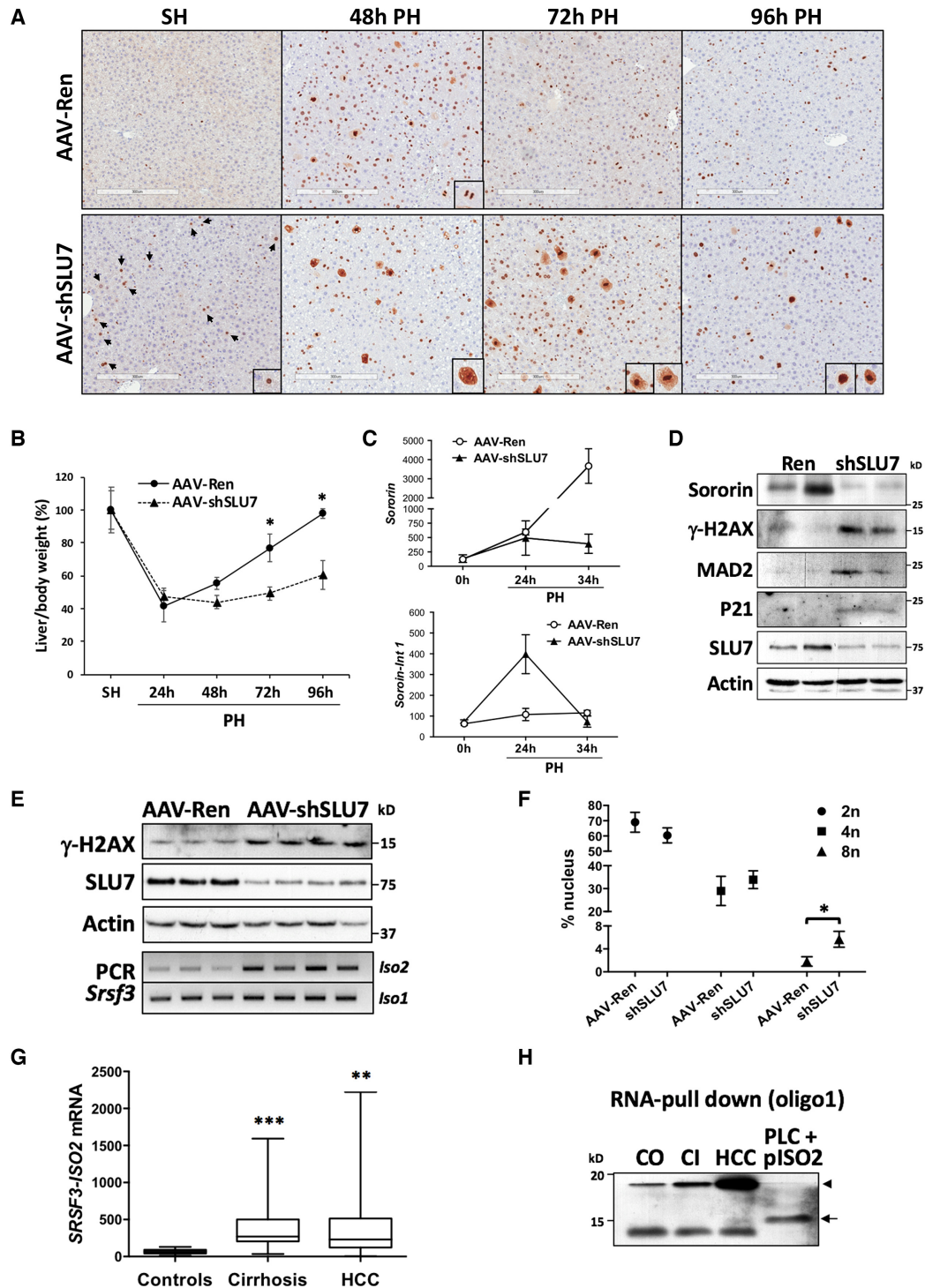


Figure 8. SLU7 knockdown induces genomic instability *in vivo*. (A) Ki67 immunostaining in the liver of mice 48, 72 and 96 h after 2/3 partial hepatectomy (PH) or control surgery (SH) 21 days after the injection of adenoassociated virus to inhibit SLU7 expression in the liver (AAV-shSLU7) or control virus (AAV-Ren). ($n = 5$ mice per group). (B) Liver to body weight ratio in AAV-shSLU7 and AAV-Ren mice 24, 48, 72 and 96 h after 2/3 partial hepatectomy (PH). ($n = 5$ mice per group). $*P < 0.05$. (C) Real time PCR quantification of *sororin* mRNA and intron 1-containing *sororin* transcripts in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice 24 and 34 h after PH. ($n = 5$ mice per group). $*P < 0.05$. (D) Western blot analysis of sororin, γ -H2AX, MAD2, P21, SLU7 and Actin, as loading control, in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice 24 h after PH. (E) Western blot analysis of γ -H2AX, SLU7 and Actin, as loading control, in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice. PCR analysis of *Srsf3* *Iso1* and *Iso2* transcripts by PCR is also shown. (F) Quantitative analysis of hepatocyte ploidy in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7. The percentage of 2n, 4n and 8n nuclei is indicated. ($n = 4$ mice per group). $*P < 0.05$. (G) Real time PCR quantification of *SRSF3-ISO2* expression in samples from control ($n = 10$), cirrhotic ($n = 24$) and HCC ($n = 22$) tissues. $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ versus controls. (H) Western blot analysis of SRSF3 after RNA-pull down with the biotinylated RNA oligo O1 from sororin intron 1 containing a putative binding motif for SRSF3. Pools of three liver tissue samples from controls (CO), cirrhotic patients (CI) and HCCs were used for pull down assays. Extracts from PLC/PRF/5 cells transfected with pcDNA-SRSF3-ISO2 were included as control.

mitotic alterations found upon SLU7 knockdown. However, further to this we delineated a molecular mechanism demonstrating that SLU7 is central for the correct splicing and expression of sororin, an essential protein in cohesin ring stabilization and SCC (18,54).

While elucidating the mechanisms through which SLU7 allows normal cell-cycle progression and protects from TAGIN we also broadened the existing knowledge on the intricate regulatory crosstalk among SRSF factors (55–57). More importantly, we demonstrated that SLU7 plays a unique and hierarchically high role in this intertwined regulatory network. SR proteins can modulate splice site selection in a concentration-dependent manner (44) so their expression is tightly controlled at different levels, including their mutual control. In the case of SRSF3 it has been demonstrated that an increase in SRSF3 expression induces the incorporation of exon 4 in its own mRNA, which has been proposed as an autoregulatory mechanism to avoid SRSF3 accumulation (56). Interestingly this effect is antagonized by SRSF1, which inhibits the incorporation of SRSF3 exon 4 (56). Here we demonstrate that the levels of SLU7 may significantly alter the expression of both SRSF1 and SRSF3. We found a marked induction of SRSF3-ISO2 transcript upon SLU7 knockdown, which participated in the alteration of SRSF1 splicing and reduced SRSF1 protein levels. Importantly, we were able to detect different SRSF3 truncated proteins (SRSF3-TR) coded by SRSF3-ISO2, which were responsible for the aberrant splicing and expression of SRSF1 and sororin. Our results demonstrate that SRSF3-TR proteins indeed play a role in the induction of DNA damage and genome instability and in the alteration of SCC. We found that these biological activities could be associated with a dominant negative effect of SRSF3-TR isoforms but also with an acquired specific function, as in the case of sororin splicing. Mechanistically, our findings demonstrate that SLU7 is essential to prevent an increase of SRSF3-TR proteins, acting at two different levels: by the regulation of SRSF3 splicing and through the expression of miR-17. In this latter respect, we demonstrate that miR-17 is able to target SRSF3-ISO2 and promote its degradation.

Our results establish that SLU7 plays a critical role in cell mitosis. In the case of hepatocytes, we previously found that an early and transient decrease in SLU7 expression is required for the hepatocytes to enter the cell cycle during liver regeneration after PH (11). Now we show that the quick recovery of SLU7 expression after PH is required to allow the correct progression through mitosis, the restoration of liver mass and the maintenance of genome stability. Importantly, our present findings demonstrate that persistent knockdown of SLU7 expression in the liver results in DNA injury and increased polyploidization, in a mechanistically significant association with enhanced SRSF3-ISO2 levels. The preservation of normal hepatic SRSF3 function appears critical for liver homeostasis, as hepatocyte-specific deletion of this gene results in spontaneous development of liver injury and HCC (58). Together, these findings suggest that the observed downregulation of SLU7 in the cirrhotic liver (12) could participate in the induction of DNA damage, aneuploidy and genome instability which in chronic liver injury precede HCC development (19,48,59,60). The

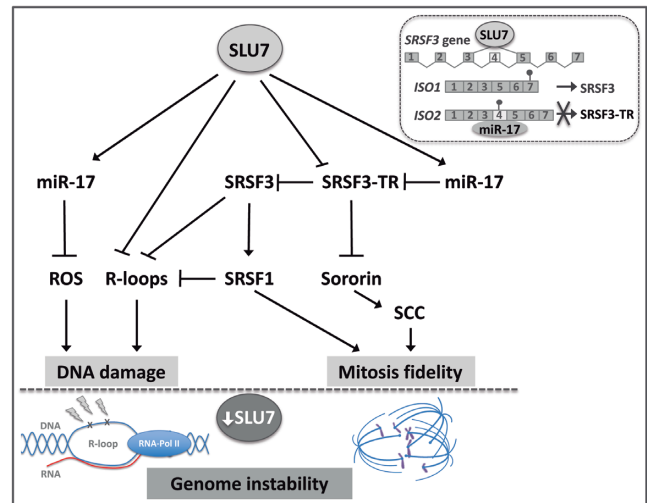


Figure 9. Schematic representation of the mechanisms regulated by SLU7 involved in the maintenance of genome integrity. See text for details.

detection of SRSF3-ISO2 and SRSF3-TR expression in human liver cirrhosis further supports this possibility.

In the case of transformed cells, the manipulation of splicing has emerged as a potential therapeutic strategy for cancer, including drugs that inhibit early spliceosome assembly or SR protein phosphorylation (61). Importantly, pre-clinical studies show that modulating the activity of the spliceosome in general is well tolerated in vivo. Our results confirm the splicing factor SLU7 as a new target for intervention. Transformed cells demonstrate an important dependency on SLU7 expression for their survival (14), which would be related to the multiple functions of SLU7. These include the regulation of splicing and expression of SR proteins such as SRSF1 and SRSF3 and the SCC protein sororin, the prevention of R-loop formation, and the generation of microRNAs such as miR-17. The selective killing of transformed cells upon SLU7 knockdown could be associated with the induction of replication stress and mitotic catastrophe (4,20) and could be exploited for therapy.

All in all, our results demonstrate a non-redundant and hierarchical role of SLU7 in the regulation of SR proteins splicing and expression, importantly preventing the expression of SRSF3-TR isoforms. As summarized in Figure 9, the downregulation of SLU7 levels could be associated with the induction of R-loops, oxidative stress, DNA damage, mitotic aberrations and genome instability. All these events are clearly involved in the process of hepatocarcinogenesis (19). However, the dependency of transformed cells on the expression of SLU7 for their progression through mitosis could represent an ‘Achilles heel’ to be exploited for therapeutic intervention.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr A. Aguilera (Spain) and Dr JM Peters (Austria) for kindly providing the RNase H1 expressing plas-

mid and sororin antibody, respectively. We thank Dr L. Guembe and Dr M Ariz (CIMA, University of Navarra, Pamplona, Spain) for technical support with immunohistochemical analysis. We particularly acknowledge the patients for their participation and the Biobank of the University of Navarra for its collaboration.

FUNDING

CIBERehd; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI13/00359, PI13/00385]; MINECO/AEI/FEDER,UE [SAF2016-75972-R]; HEPACARE Project from Fundación La Caixa; Ministerio de Educación FPI Fellowship, Cultura y Deporte; ADA-UNAV and CIMA Fellowships; AECC Post-doctoral Fellowship; Fundación Eugenio Rodríguez Pascual; Fundación Echebano; Fundación Mario Losantos; Fundación M Torres and Mrs Eduardo Ávila and Sergio Durá contribution. Funding for open access charge: MINECO/AEI/FEDER,UE [SAF2016-75972-R].

Conflict of interest statement. None declared.

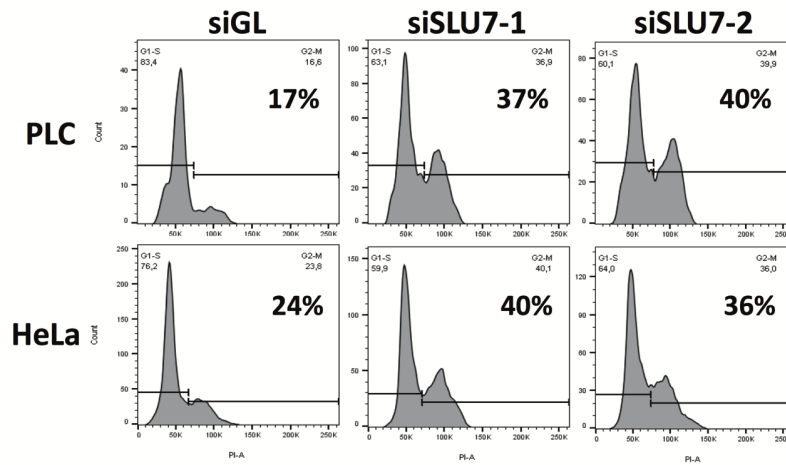
REFERENCES

- Aguilera, A. and Gómez-González, B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 204–217.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A. and Kinzler, K.W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*, **339**, 1546–1558.
- Gaillard, H., García-Muse, T. and Aguilera, A. (2015) Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 276–289.
- Kotsantis, P., Petermann, E. and Boulton, S.J. (2018) Mechanisms of Oncogene-Induced replication Stress: Jigsaw falling into place. *Cancer Discov.*, **8**, 537–555.
- Paulsen, R.D., Soni, D.V., Wollman, R., Hahn, A.T., Yee, M.-C., Guan, A., Hesley, J.A., Miller, S.C., Cromwell, E.F., Solow-Cordero, D.E. *et al.* (2009) A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol. Cell*, **35**, 228–239.
- Kim, N. and Jinks-Robertson, S. (2012) Transcription as a source of genome instability. *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 204–214.
- Brambati, A., Colosio, A., Zardoni, L., Galanti, L. and Liberi, G. (2015) Replication and transcription on a collision course: eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability. *Front. Genet.*, **6**, 166.
- Wickramasinghe, V.O. and Venkitaraman, A.R. (2016) RNA processing and genome stability: cause and consequence. *Mol. Cell*, **61**, 496–505.
- Gaillard, H. and Aguilera, A. (2016) Transcription as a threat to genome integrity. *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 291–317.
- Elizalde, M., Urtasun, R., Azkona, M., Latasa, M.U., Goñi, S., García-Irigoyen, O., Uriarte, I., Segura, V., Collantes, M., Di Scala, M. *et al.* (2014) Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J. Clin. Invest.*, **124**, 2909–2920.
- Castillo, J., Goñi, S., Latasa, M.U., Perugorria, M.J., Calvo, A., Muntané, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Prieto, J., Avila, M.A. *et al.* (2009) Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology*, **137**, 1805–1815.
- Berasain, C. and Avila, M.A. (2015) Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 3831–3851.
- Urtasun, R., Elizalde, M., Azkona, M., Latasa, M.U., García-Irigoyen, O., Uriarte, I., Fernandez-Barrena, M.G., Vicent, S., Alonso, M.M., Muntané, J. *et al.* (2016) Splicing regulator SLU7 preserves survival of hepatocellular carcinoma cells and other solid tumors via oncogenic miR-17-92 cluster expression. *Oncogene*, **35**, 4719–4729.
- Hofmann, J.C., Husedzinovic, A. and Gruss, O.J. (2010) The function of spliceosome components in open mitosis. *Nucleus*, **1**, 447–459.
- Neumann, B., Walter, T., Hériché, J.-K., Bulkescher, J., Erfle, H., Conrad, C., Rogers, P., Poser, I., Held, M., Liebel, U. *et al.* (2010) Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, **464**, 721–727.
- Karamysheva, Z., Diaz-Martínez, L.A., Warrington, R. and Yu, H. (2015) Graded requirement for the spliceosome in cell cycle progression. *Cell Cycle*, **14**, 1873–1883.
- Valcarcel, J. and Malumbres, M. (2014) Splicing together sister chromatids. *EMBO J.*, **33**, 2601–2603.
- Boege, Y., Malehmir, M., Healy, M.E., Bettermann, K., Lorentzen, A., Vucur, M., Ahuja, A.K., Böhm, F., Mertens, J.C., Shimizu, Y. *et al.* (2017) A dual role of Caspase-8 in triggering and sensing Proliferation-Associated DNA damage, a key determinant of liver cancer development. *Cancer Cell*, **32**, 342–359.
- Kotsantis, P., Jones, R.M., Higgs, M.R. and Petermann, E. (2015) Cancer therapy and replication stress: forks on the road to perdition. *Adv. Clin. Chem.*, **69**, 91–138.
- Oka, Y., Varmark, H., Vitting-Seerup, K., Beli, P., Waage, J., Hakobyan, A., Mistrik, M., Choudhary, C., Rohde, M., Bekker-Jensen, S. *et al.* (2014) UBL5 is essential for pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO Rep.*, **15**, 956–964.
- Hodroj, D., Recolin, B., Serhal, K., Martínez, S., Tsanov, N., Abou Merhi, R. and Maiorano, D. (2017) An ATR-dependent function for the Ddx19 RNA helicase in nuclear R-loop metabolism. *EMBO J.*, **36**, 1182–1198.
- Yu, K., Chédin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E. and Lieber, M.R. (2003) R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.*, **4**, 442–451.
- Sun, Q., Csorba, T., Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J. and Dean, C. (2013) R-loop stabilization represses antisense transcription at the Arabidopsis FLC locus. *Science*, **340**, 619–621.
- Hatchi, E., Skourti-Stathaki, K., Ventz, S., Pinello, L., Yen, A., Kamieniarz-Gdula, K., Dimitrov, S., Pathania, S., McKinney, K.M., Eaton, M.L. *et al.* (2015) BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Mol. Cell*, **57**, 636–647.
- Perugorria, M.J., Castillo, J., Latasa, M.U., Goñi, S., Segura, V., Sangro, B., Prieto, J., Avila, M.A. and Berasain, C. (2009) Wilms' tumor 1 gene expression in hepatocellular carcinoma promotes cell dedifferentiation and resistance to chemotherapy. *Cancer Res.*, **69**, 1358–1367.
- Castillo, J., Erroba, E., Perugorria, M.J., Santamaría, M., Lee, D.C., Prieto, J., Avila, M.A. and Berasain, C. (2006) Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.*, **66**, 6129–6138.
- Berasain, C., García-Trevijano, E.R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D.C., Prieto, J. and Avila, M.A. (2005) Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*, **128**, 424–432.
- Maillet, V., Boussetta, N., Leclerc, J., Fauveau, V., Foretz, M., Viollet, B., Couty, J.-P., Celton-Morizur, S., Perret, C. and Desdouets, C. (2018) LKB1 as a gatekeeper of hepatocyte proliferation and genomic integrity during liver regeneration. *Cell Rep.*, **22**, 1994–2005.
- Gentric, G., Maillet, V., Paradis, V., Couton, D., L'Hermitte, A., Panasyuk, G., Fromenty, B., Celton-Morizur, S. and Desdouets, C. (2015) Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.*, **125**, 981–992.
- Wickramasinghe, V.O., González-Porta, M., Perera, D., Bartolozzi, A.R., Sibley, C.R., Hallegger, M., Ule, J., Marioni, J.C. and Venkitaraman, A.R. (2015) Regulation of constitutive and alternative mRNA splicing across the human transcriptome by PRPF8 is determined by 5' splice site strength. *Genome Biol.*, **16**, 201.
- Uhlmann, F. (2001) Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 754–761.
- Sundaramoorthy, S., Vázquez-Novelle, M.D., Lekontsev, S., Howell, M. and Petronczki, M. (2014) Functional genomics identifies a requirement of pre-mRNA splicing factors for sister chromatid cohesion. *EMBO J.*, **33**, 2623–2642.
- van der Lelij, P., Stocsits, R.R., Ladurner, R., Petzold, G., Kreidl, E., Koch, B., Schmitz, J., Neumann, B., Ellenberg, J. and Peters, J.M. (2014) SNW1 enables sister chromatid cohesion by mediating the splicing of sororin and APC2 pre-mRNAs. *EMBO J.*, **33**, 2643–2658.

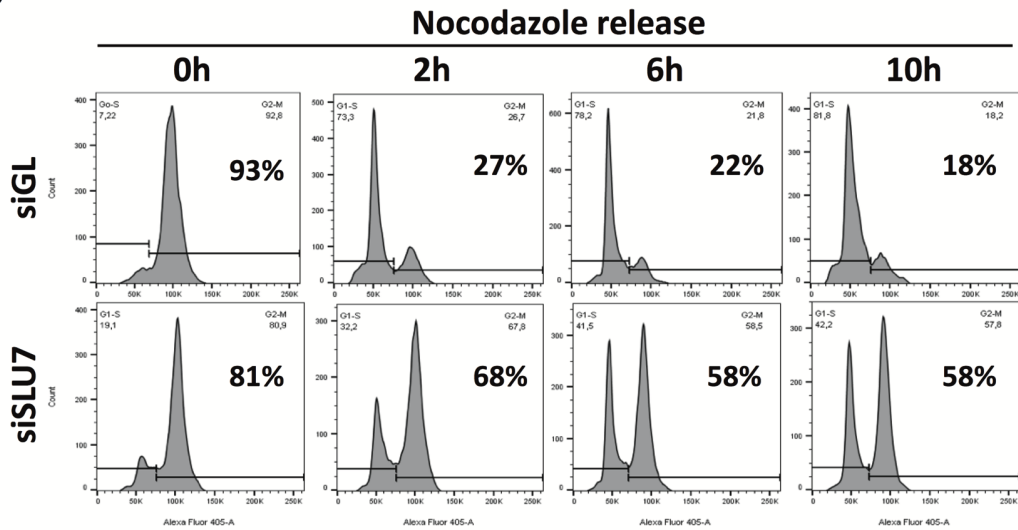
35. Watrin, E., Demidova, M., Watrin, T., Hu, Z. and Prigent, C. (2014) Sororin pre-mRNA splicing is required for proper sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO Rep.*, **15**, 948–955.
36. Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K. *et al.* (2010) Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell*, **143**, 737–749.
37. Li, X. and Manley, J.L. (2005) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*, **122**, 365–378.
38. Hamperl, S. and Cimprich, K.A. (2014) The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA Repair (Amst.)*, **19**, 84–94.
39. Chang, E.Y.-C. and Stirling, P.C. (2017) Replication fork protection factors controlling R-Loop bypass and suppression. *Genes*, **8**, 33.
40. Nguyen, H.D., Yadav, T., Giri, S., Saez, B., Graubert, T.A. and Zou, L. (2017) Functions of replication protein A as a sensor of R loops and a regulator of RNaseH1. *Mol. Cell*, **65**, 832–847.
41. Tanikawa, M., Sanjiv, K., Helleday, T., Herr, P. and Mortusewicz, O. (2016) The spliceosome U2 snRNP factors promote genome stability through distinct mechanisms; transcription of repair factors and R-loop processing. *Oncogenesis*, **5**, e280.
42. Ajiro, M., Jia, R., Yang, Y., Zhu, J. and Zheng, Z.-M. (2015) A genome landscape of SRSF3-regulated splicing events and gene expression in human osteosarcoma U2OS cells. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1854–1870.
43. Muñoz, U., Puche, J.E., Hannivoort, R., Lang, U.E., Cohen-Naftaly, M. and Friedman, S.L. (2012) Hepatocyte growth factor enhances alternative splicing of the Kruppel-like factor 6 (KLF6) tumor suppressor to promote growth through SRSF1. *Mol. Cancer Res.*, **10**, 1216–1227.
44. Jumaa, H., Guénet, J.L. and Nielsen, P.J. (1997) Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 3116–3124.
45. Kano, S., Nishida, K., Kurebe, H., Nishiyama, C., Kita, K., Akaike, Y., Kajita, K., Kurokawa, K., Masuda, K., Kuwano, Y. *et al.* (2014) Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **306**, C250–C262.
46. Tang, Y., Horikawa, I., Ajiro, M., Robles, A.I., Fujita, K., Mondal, A.M., Stauffer, J.K., Zheng, Z.-M. and Harris, C.C. (2013) Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53 β , an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene*, **32**, 2792–2798.
47. Zhao, Y., Lin, J., Xu, B., Hu, S., Zhang, X. and Wu, L. (2014) MicroRNA-mediated repression of nonsense mRNAs. *Elife*, **3**, e03032.
48. Matsuda, Y., Wakai, T., Kubota, M., Osawa, M., Takamura, M., Yamagiwa, S., Aoyagi, Y., Sanpei, A. and Fujimaki, S. (2013) DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. *Sci. World J.*, **2013**, 597095–597097.
49. Barash, H., Gross, E.R., Edrei, Y., Ella, E., Israel, A., Cohen, I., Corchia, N., Ben-Moshe, T., Pappo, O., Pikarsky, E. *et al.* (2010) Accelerated carcinogenesis following liver regeneration is associated with chronic inflammation-induced double-strand DNA breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 2207–2212.
50. Pedersen, R.S., Karemore, G., Gudjonsson, T., Rask, M.-B., Neumann, B., Hériché, J.-K., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Gerlich, D.W., Lukas, J. *et al.* (2016) Profiling DNA damage response following mitotic perturbations. *Nat. Commun.*, **7**, 13887.
51. Chua, K. and Reed, R. (1999) Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Genes Dev.*, **13**, 841–850.
52. Santos-Pereira, J.M., Herrero, A.B., Moreno, S. and Aguilera, A. (2014) Npl3, a new link between RNA-binding proteins and the maintenance of genome integrity. *Cell Cycle*, **13**, 1524–1529.
53. Maslon, M.M., Heras, S.R., Bellora, N., Eyras, E. and Caceres, J.F. (2014) The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis. *Elife*, **3**, e02028.
54. Ladurner, R., Kreidl, E., Ivanov, M.P., Ekker, H., Idarraga-Amado, M.H., Busslinger, G.A., Wutz, G., Cisneros, D.A. and Peters, J.M. (2016) Sororin actively maintains sister chromatid cohesion. *EMBO J.*, **35**, 635–653.
55. Ankö, M.-L., Müller-McNicoll, M., Brandl, H., Curk, T., Gorup, C., Henry, I., Ule, J. and Neugebauer, K.M. (2012) The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol.*, **13**, R17.
56. Jumaa, H. and Nielsen, P.J. (1997) The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J.*, **16**, 5077–5085.
57. Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Coutinho-Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., Huang, J., Yeo, G.W., Ares, M. and Fu, X.-D. (2013) Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Mol. Cell*, **50**, 223–235.
58. Sen, S., Langiewicz, M., Jumaa, H. and Webster, N. (2015) Deletion of serine/arginine-rich splicing factor 3 in hepatocytes predisposes to hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, **61**, 171–183.
59. Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Bréchet, C. and Desdouets, C. (2005) Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut*, **54**, 297–302.
60. Gordon, D.J., Resio, B. and Pellman, D. (2012) Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 189–203.
61. Lee, S.C.-W. and Abdel-Wahab, O. (2016) Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat. Med.*, **22**, 976–986.

Supplementary data
Supplementary Figures.

A



B



C

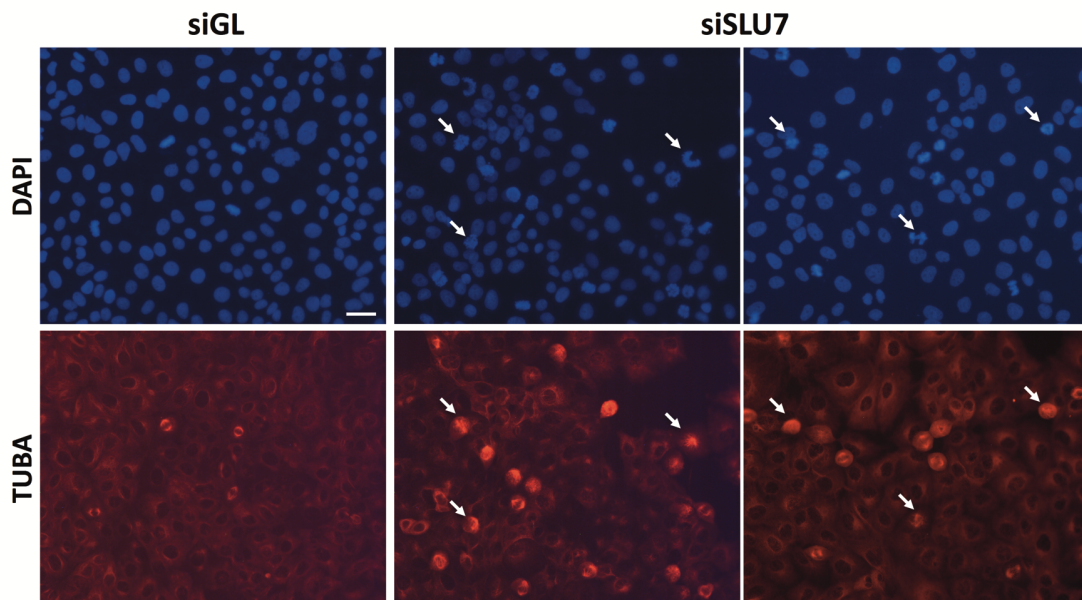


Figure S1. (A) Cell cycle analysis by FACS of PLC/PRF/5 and HeLa cells 48 hours after transfection with two different siRNAs specific for SLU7 and an irrelevant control siRNA siGL. The percentage of cells in G2/M is indicated. (B) Cell cycle analysis by FACS of PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siSLU7 or siGL and overnight treatment with nocodazole (0h) or 2, 6 and 10 hours after release from nocodazole arrest. The percentage of cells in G2/M is indicated. (C) Immunocytochemical staining of alpha-tubulin (TUBA) in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with the siRNA control siGL or siSLU7. DNA was stained with DAPI. Accumulation of cells in prometaphase and aberrant metaphases (pointed with arrows) are observed in siSLU7 cells. Scale bar: 10 μ m. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

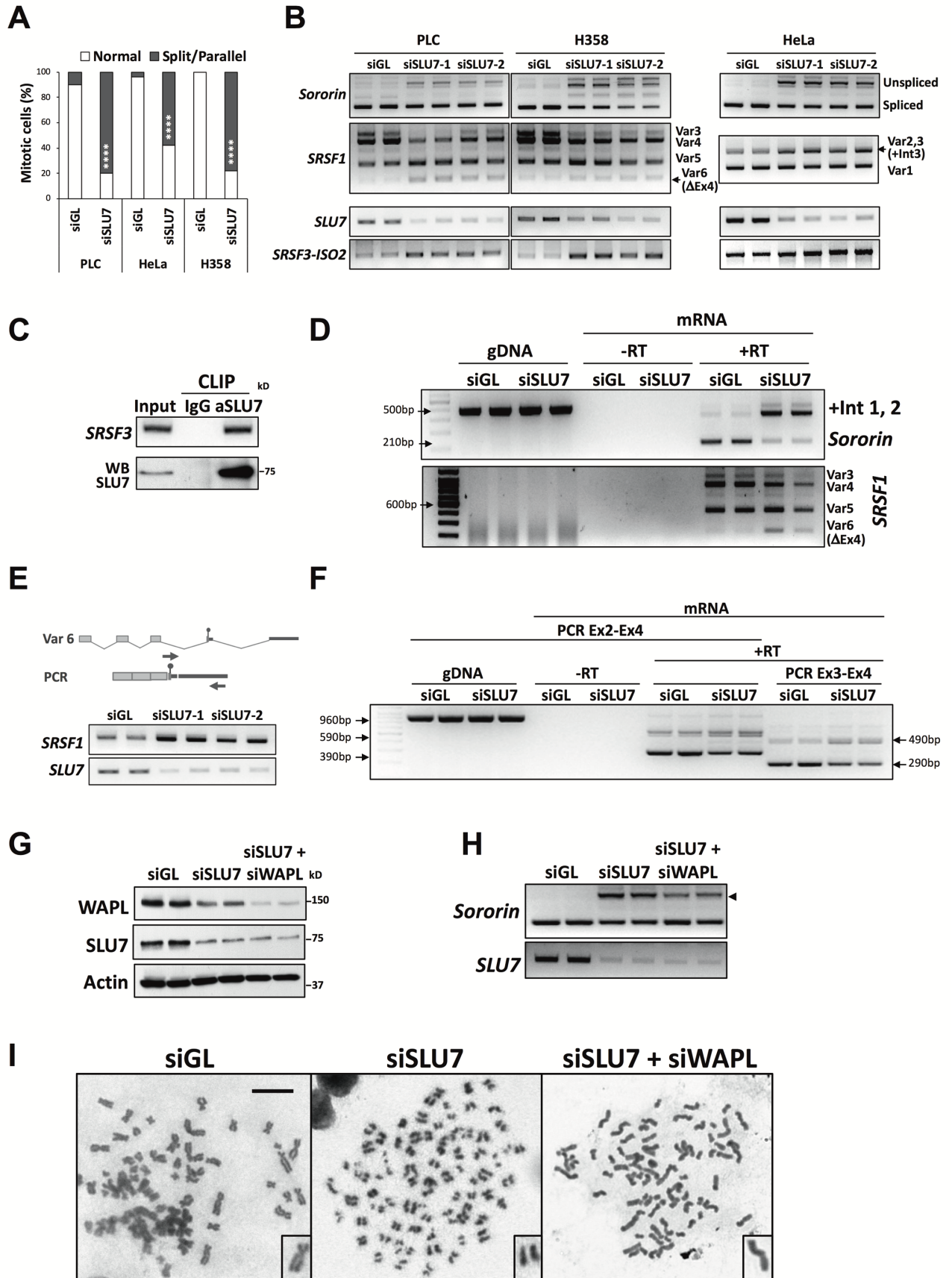


Figure S2. (A) Quantification of the percentage of mitoses with normal or split/parallel chromosomes in chromosome spreads prepared from metaphases of PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 hours after transfection with siGL or siSLU7. **** $P < 0.0001$. (B) PCR analysis of *sororin*, *SRSF1*, *SLU7* and *SRSF3-ISO2* expression in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 hours after transfection with control siRNA (siGL) or two different siRNAs specific for SLU7. (C) RNA-CLIP assay demonstrates the binding of SLU7 to endogenous SRSF3 mRNA in PLC/PRF/5 cells. Upper panel: PCR analyses of SRSF3 cDNA after RNA purification and retrotranscription from the input and in the CLIP fractions after immunoprecipitation with control IgG and anti-SLU7 antibody. Lower panel: Western blot for SLU7 in the input fraction and after CLIP with control IgG and anti-SLU7 antibody (aSLU7). (D) PCR analysis in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL or siSLU7 of *sororin* (PCR3 from Fig 2D) in the upper panel and *SRSF1* (PCR2 from Fig 4A) in the lower panel. PCRs were performed on genomic DNA (gDNA) and on mRNA treated twice with DNase and converted to cDNA by retro-transcription (+RT) or the same mRNA treated without adding the enzyme (-RT), to verify the absence of contaminating gDNA in the cDNA preparations. (E) Scheme of SRSF1 variant 6 from figure 2D and the processed mRNA. The position of the primers used to detect the expression of this isoform specifically is indicated. The lower panel confirm the induction of the variant 6 of SRSF1 defective in exon 4 in PLC/PRF/5 cells in parallel with the downregulation of SLU7 after transfection with two different siRNAs for SLU7. (F) Control PCRs performed to confirm the specific inclusion of intron 3 into the mRNA of *SRSF1* after SLU7 knockdown in HeLa cells. PCRs to amplify *SRSF1* were performed with primers located on exon2-exon4 or exon3-exon4 (PCR1 in Fig 2D). gDNA and mRNA samples from HeLa cells were treated as described in (C). (G) Western blot analysis of WAPL, SLU7 and Actin, as loading control, in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7+ siWAPL. (H) PCR analysis of *sororin* and *SLU7* expression in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 and siSLU7+ siWAPL. Arrowhead indicates the aberrant unspliced isoform. (I) Chromosome spreads of PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 and siSLU7+ siWAPL. Scale bar: 10 μm . All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

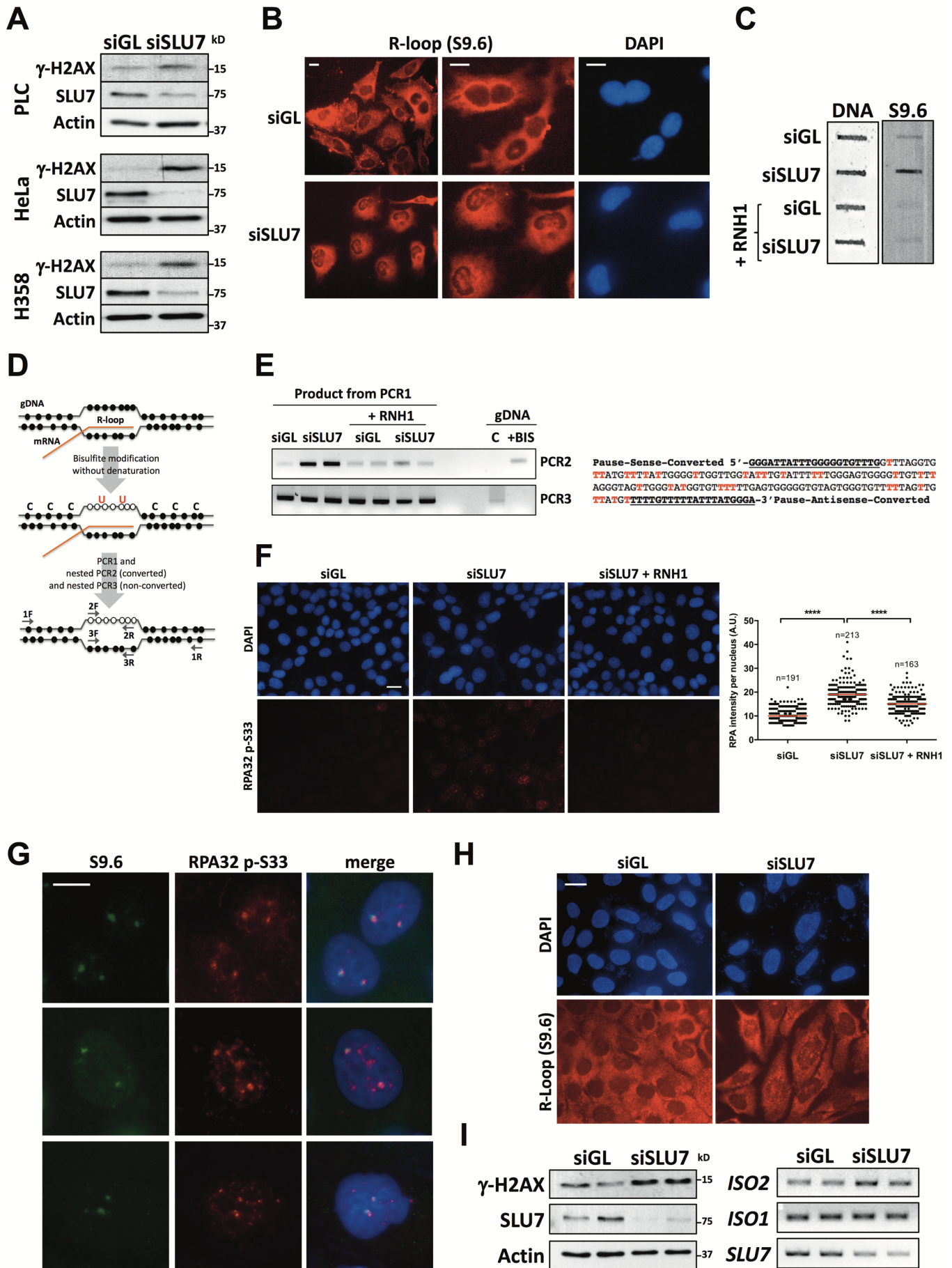


Figure S3. (A) Western blot analysis of γ H2AX, SLU7 and Actin, as loading control, in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 hours after transfection with siGL or siSLU7. (B) Immunofluorescence detection of R-loops with S9.6 antibody in HeLa cells 48 hours after transfection with siGL or siSLU7. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (C) Slot-blot detection of RNA-DNA hybrids (R-loops) in genomic DNA from HeLa cells 48 hours after transfection with siGL or siSLU7 using S9.6 antibody. Aliquots of genomic DNA were treated with RNase H1 as control. The DNA fixed in the membrane was stained with methylene blue as loading control. (D) Scheme of R-loops detection by non-denaturing bisulfite nested PCR (see Materials and Methods). Briefly, in non-denatured gDNA from siGL and siSLU7 PLC/PRF/5 cells, cytosines (C, black dots) can be converted to uracil (U, white dots) by bisulfite treatment only in the non-protected ssDNA in the R-loop. The position of the primers used to detect R-loop formation on the 3'UTR region of the beta-actin gene is indicated. PCR1 was performed using primers outside the R-loop. Nested PCR3 was performed using primers described to perform DRIP (Hatchi et al. Mol Cell 2015). We modified the sequence of those primers to detect the converted ssDNA in PCR2. (E) PCR2 confirmed the presence of R-loops in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siSLU7. gDNA (C) and gDNA converted after bisulfite treatment (+BIS) were used as controls. The right panel shows the sequence of the PCR product amplified with PCR2 in siSLU7 samples. In red are marked the C to T bisulfite conversions confirming the amplification of the non-protected DNA strand in the R-loop. (F) Immunofluorescence detection of RPA32 P-S33 in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 and siSLU7 + RNH1 plasmid. Scale bar: 10 μ m. The right panel shows the quantification of RPA32 P-S33 staining per nucleus with ImageJ software. The DAPI signal was used to create a mask of the nucleus. The number of nucleus analyzed per condition is indicated. The plot was represented using GraphPad Prism. Red bars represent the median. **** $P < 0.0001$ (Mann-Whitney U-test). (G) Colocalization by immunofluorescence of R-loops (S9.6 antibody) and phospho-RPA32 (RPA32 P-S33 antibody) in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siSLU7. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (H) Immunofluorescence detection of R-loops with S9.6 antibody in HepaRG cells 48 hours after transfection with siGL or siSLU7. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (I) Left panel: PCR detection of SRSF3 isoforms ISO2 and ISO1 and SLU7 in cells described in (H). Right panel: detection

by Western blot of γ -H2AX, SLU7 and Actin as loading control in cells described in (H). All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

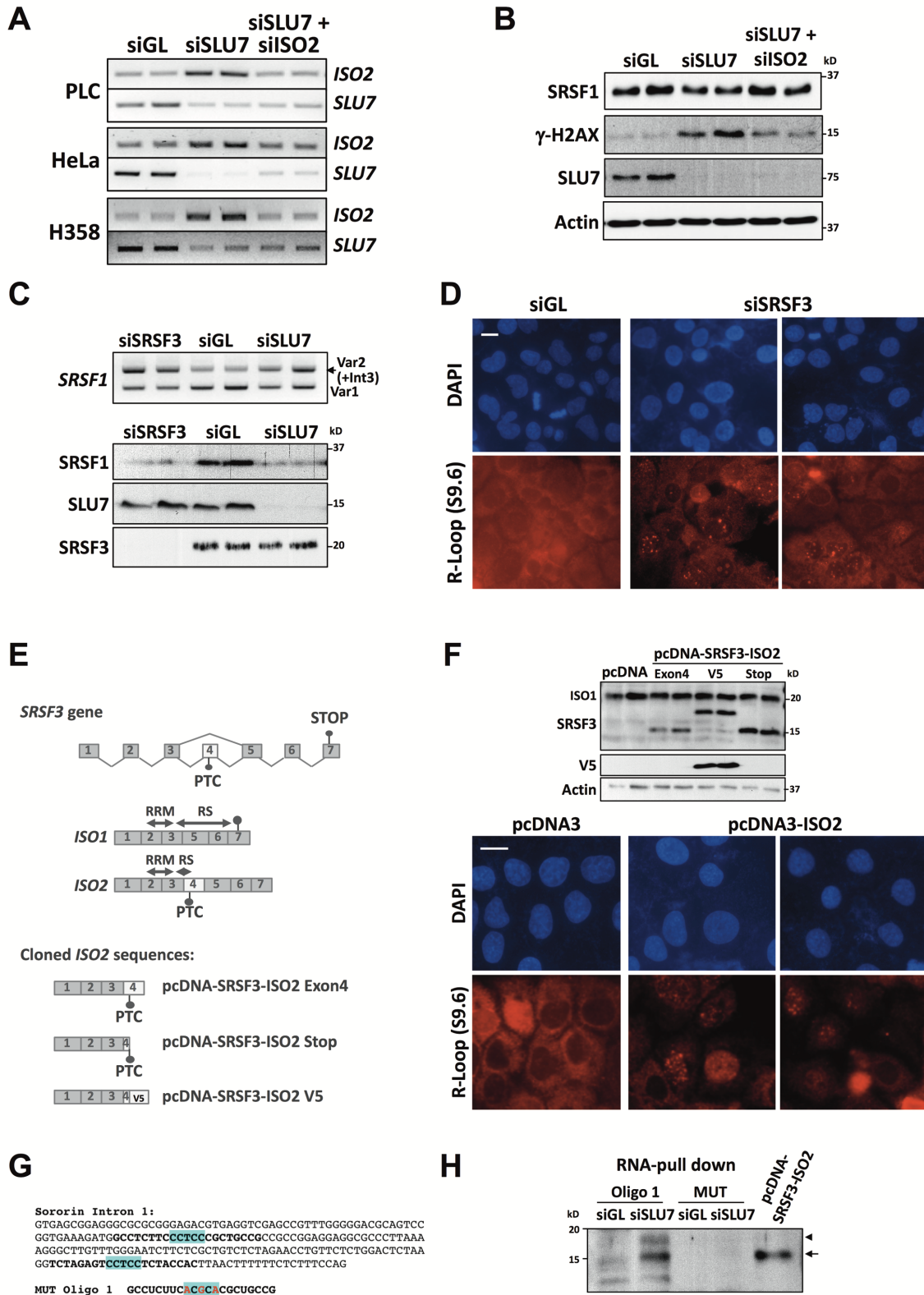


Figure S4. (A) Detection of *SRSF3-ISO2* and *SLU7* expression by PCR in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + siISO2. (B) Western blot analysis of SRSF1, γ -H2AX, SLU7 and Actin, as loading control, in HeLa cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + siISO2. (C) PCR detection of *SRSF1* variants in HeLa cells after SRSF3 or SLU7 knockdown. Western blot analysis of SRSF1, SLU7 and SRSF3 proteins are shown in the lower panels. (D) Immunofluorescence detection of R-loops with S9.6 antibody in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL or siSRSF3. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (E) Schematic representation of *SRSF3* gene, the protein isoforms and the pcDNA3 constructs generated. (F) PLC/PRF/5 cells were transfected with the control plasmid (pcDNA) and the three constructs represented in E (Exon4, V5 and Stop) to overexpress *SRSF3-ISO2* mRNA. SRSF3 proteins were detected by Western blot. In the lower panel representative images of the immunofluorescence detection of R-loops with S9.6 antibody in PLC/PRF/5 cells transfected with control pcDNA and pcDNA3-ISO2 are shown. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (G) Sequence of human *sororin* intron 1. The two predicted SRSF3 binding motifs are highlighted in blue and the sequence corresponding to the biotinylated RNA oligos used in the RNA-pull down assay is indicated in bold. The sequence of the mutated oligo 1 used as negative control is indicated. Red nucleotides indicate the changes in the binding motif. (H) Western blot analysis of SRSF3 after RNA-pull down with biotinylated RNA oligo O1 from *sororin* intron 1 and the corresponding mutated oligo 1 (MUT) described in (G), using extracts from PLC/PRF/5 cells transfected with control siGL or siSLU7. The truncated isoform expressed from the pcDNA-SRSF3-ISO2 Stop construct is shown as control (arrow). The two truncated SRSF3 isoforms induced upon SLU7 knockdown (arrow and arrowhead) are able to bind only oligo 1. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

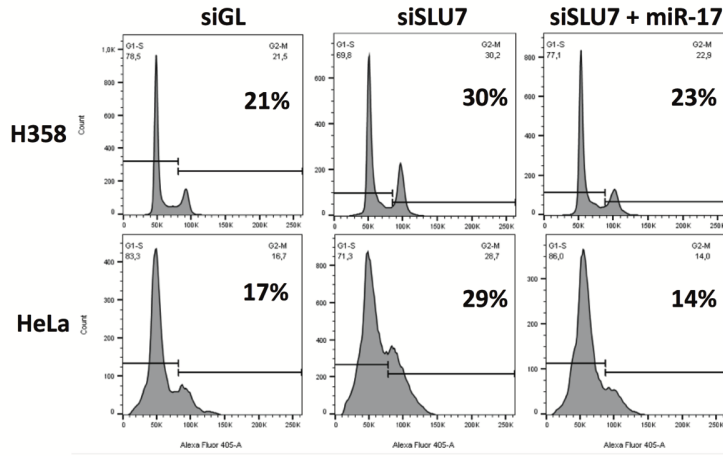
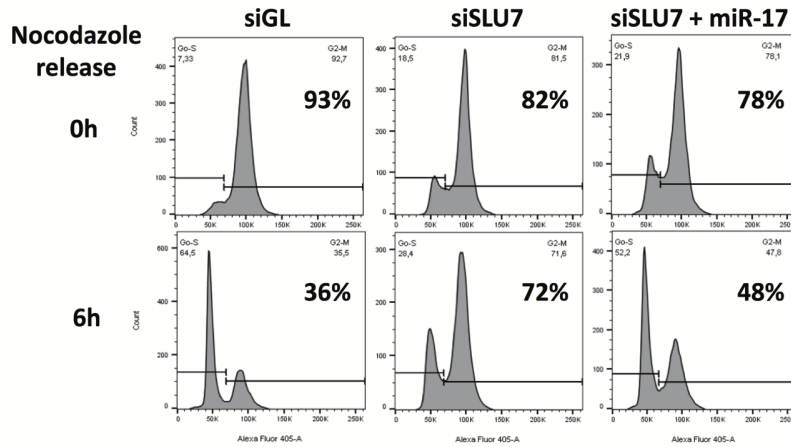
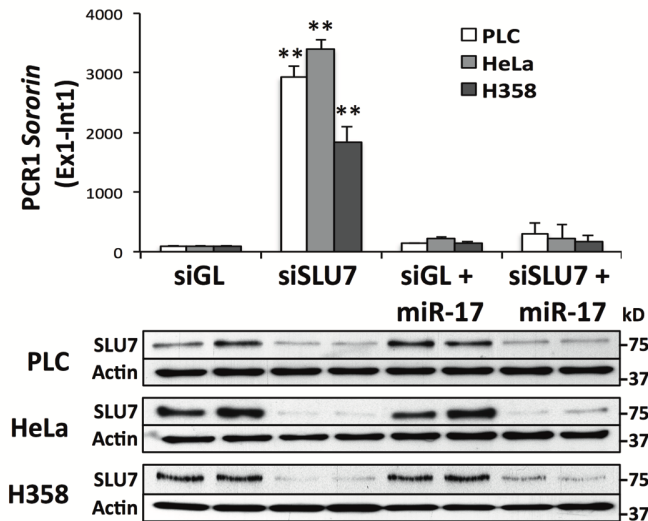
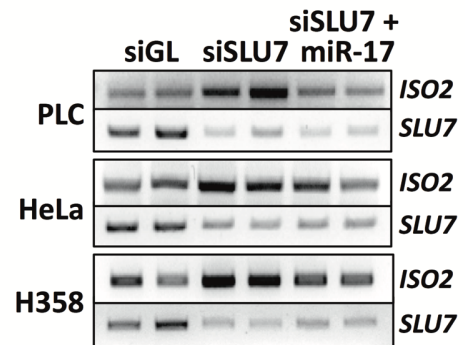
A**B****C****D****E**

Figure S5. (A) Cell cycle analysis by FACS of H358 and HeLa cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17. The percentage of cells in G2/M is indicated. (B) Cell cycle analysis by FACS of PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17 and overnight treatment with nocodazole (0h) or 6 hours after release from nocodazole arrest. The percentage of cells in G2/M is indicated. (C) Representative images from metaphase chromosome spreads of HeLa cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17. Scale bar: 10 μ m. (D) Real time PCR analysis of sororin intron 1 expression (PCR1) in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17. Western blot analysis of SLU7 and Actin, as loading control is shown. $**P < 0.01$. (E) PCR analysis of *SRSF3-ISO2* and *SLU7* expression in PLC/PRF/5, HeLa and H358 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siSLU7 + miR-17. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

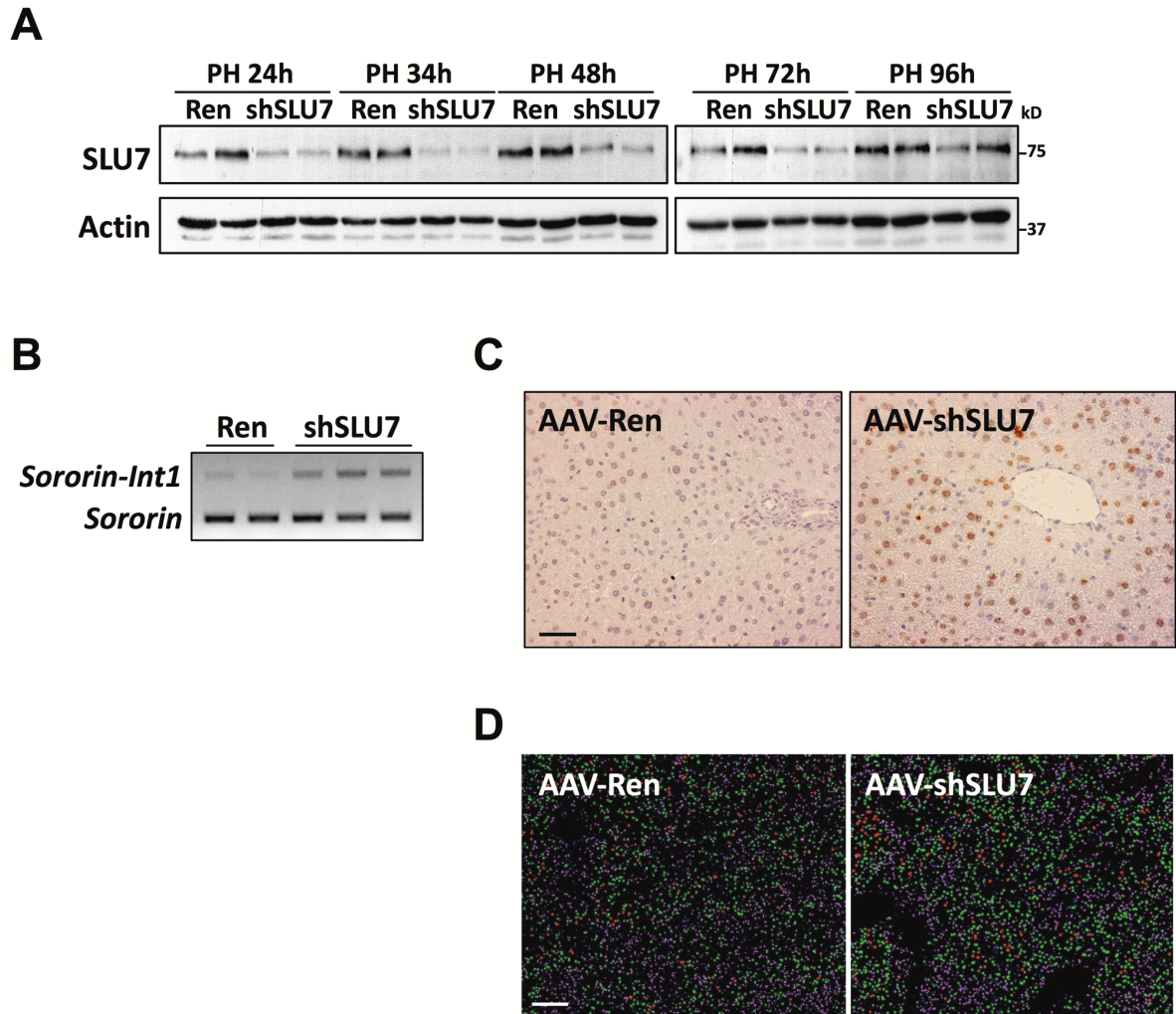


Figure S6. (A) Detection by Western blot of SLU7 and Actin as loading control in the liver of mice injected with AAV-Ren and AAV-shSLU7 viruses 24, 34, 48, 72 and 96 hours after partial hepatectomy (PH). (B) PCR analysis of *sororin* transcripts (PCR3 according to the scheme in Figure 2D) to evaluate the incorporation of intron 1 and 2 in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice 24 hours after PH. (C) Detection of γ -H2AX by immunohistochemistry in the livers of AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice. Scale bar: 30 μ m. (D) Ploidy detection in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7. 2n nuclei are purple, 4n nuclei are green and 8n nuclei are red. Scale bar: 150 μ m.

Jimenez M, Arechederra M, Ávila MA, Berasain C. Splicing alterations contributing to cancer hallmarks in the liver: central role of dedifferentiation and genome instability. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2018; 3:84. <http://doi.org/10.21037/tgh.2018.10.11>