



Universidad de Navarra

Facultades de Medicina y Ciencias

***Papel de SLU7 en la regulación epigenética de la
expresión génica: control de la estabilidad de DNMT1 y
la metilación del DNA***

MIRIAM RECALDE DOMÍNGUEZ DE VIDAURRETA

Tesis doctoral

2022



Universidad de Navarra

Facultades de Medicina y Ciencias

Papel de SLU7 en la regulación epigenética de la expresión génica: control de la estabilidad de DNMT1 y la metilación del DNA

Memoria presentada por D. / D^a Miriam Recalde Domínguez de Vidaurreta para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Navarra en el Programa de Doctorado de Medicina Aplicada y Biomedicina

El presente trabajo ha sido realizado bajo la Dirección de las siguientes Doctoras en el Departamento de Hepatología y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 01 de junio de 2022

Dra. Carmen Berasain Lasarte
(Catedrática Bioquímica)

Dra. María Arechederra Calderón

A mis padres y hermanos

A Héctor

AGRADECIMIENTOS

No me puedo creer que ya hayan pasado cuatro años desde que comencé esta aventura. El tiempo pasa volando, y más cuando estás rodeada de los mejores. No tengo palabras para agradecer a todas las personas que han hecho posible que haya llegado hasta aquí y me encuentre hoy escribiendo mi tesis cuatro años después.

En primer lugar quiero agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España por la financiación concedida para la realización de este proyecto y otorgarme la ayuda Predoctoral del Programa de Formación del Personal Investigador (FPI). Agradecer también a la Universidad de Navarra y al Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) la posibilidad de realizar la tesis doctoral.

A mis directoras de tesis, la Dra. Carmen Berasain y la Dra. María Arechederra por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y hacer posible este trabajo.

Carmen, gracias por confiar en mi desde ese primer día (allí por el 2017...) en el que contacté contigo para despejar mis dudas sobre la realización de la tesis doctoral ¡Y vaya si las he despejado! En su día te admiré como profesora de patología molecular y hoy lo hago también como investigadora. Gracias a ti he aprendido muchísimos conocimientos científicos, pero sobretodo he aprendido a trabajar de una manera rigurosa, exigente y perseverante, me has enseñado a razonar y a tener esa curiosidad que caracteriza a los científicos por aprender lo nuevo. En resumen, gracias por tu dedicación durante todo este tiempo, es un lujo encontrar siempre abierta la puerta de tu despacho.

María, me atrevo a decir que has sido la persona más importante, sin ti no habría llegado hasta aquí. Gracias por asentar mis bases desde el principio, por enseñarme, literalmente, TODO. Soy consciente de toda la dedicación y el esfuerzo que has puesto en mí y en el desarrollo de este trabajo. Gracias, no solo por enseñarme ciencia, si no también transmitirme ilusión y pasión por este trabajo. No te imaginas cuántísimo he disfrutado trabajando de tu mano. Para mi eres un referente. Y con todo esto me

quedo corta, lo cierto es que no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí durante estos años. Siempre te estaré agradecida.

Al resto de Marías del 4.02: Elizalde, Azkona y Gárate es una suerte trabajar con vosotras. Que una se levante con ganas de ir a trabajar cada mañana es gracias a tener un equipo como este, siempre dispuestas ayudar y además hacerlo de buen humor. Compañeras que dan apoyo, comprenden y están en las buenas y en las no tan buenas. Este trabajo tampoco habría sido posible sin vosotras. Estoy enormemente agradecida de haber coincidido con vosotras. El resto de chicas que han pasado por el 4.02 durante estos cuatro años: Maddalen, Idoia y Carla, gracias también a vosotras sobre todo por la alegría que trasmitís al teneros cerca. Me llevo un pedacito de cada una de las chicas del 4.02, espero que volvamos a coincidir.

Agradecer el buen ambiente que han traído al 4.02 Sergio, Sara, Eva y Josepmaría. Personas tan distintas y tan humanas. Los cafés con Sergio, la comprensión de Sara y la pasión por la ciencia de Eva. Gracias por estar ahí siempre que se os necesita. Sois unas grandes personas.

Me gustaría agradecer a todo el departamento de Hepatología. En primer lugar, al director del departamento, Dr. Matías Ávila, pilar fundamental para el desarrollo de este y todos los trabajos del departamento. Maite, gracias por ayudar y aportar consejos cada vez que te he necesitado. Agradecer a Uxue la accesibilidad que muestra siempre para todo. José Mari, gracias a ti se un poquito más a cerca de la bioinformática, gracias por toda la ayuda, paciencia y dedicación. Al resto del laboratorio, Iker, Roberto, Laura, Marina, Leti y Alex, a los recién llegados Amaia y Borja, al laboratorio 4.03, Antonio, Ana, Dani y Karol, gracias por vuestro compañerismo, de una manera u otra habéis contribuido al desarrollo de esta tesis.

Paula y Zuriñe es una suerte tener amigas como vosotras tan cerca. Momentos de café, cerveza o una simple conversación en el punto de encuentro son un apoyo incondicional. También me gustaría dedicar unas palabras a Maddalen e Izaskun a pesar de la distancia los desahogos vía whatsapp también funcionan. Dicen que los amigos que haces en la universidad son para toda la vida y yo así lo espero, estoy

enormemente agradecida de tener vuestra amistad desde hace 10 años y todo lo que nos queda.

Agradecer a las 12 personitas que nos aguantamos desde antes de empezar a andar. Las que están cuando hay que estar, en las buenas celebrando triunfos pero también en las malas apoyando y animando a seguir adelante. Instantes del fin de semana que sirven para cargar pilas, porque los momentos que hemos pasado juntas últimamente, los he valorado más que nunca. Gracias por aportarme tanta alegría y felicidad. Que suerte tengo de tener como cuadrilla a la 34.

Me gustaría también dar las gracias a toda mi familia que siempre está a mi lado. A mis tíos y primos ¡Gracias! A mis abuelos quienes siempre me han mostrado su apoyo y preocupación, alegrándose por cada logro conseguido. Infinitas gracias por la familia que habéis creado y por todo lo que he aprendido y sigo aprendiendo de vosotros.

A mi familia, a quien dedico esta tesis. Porque nada de esto habría sido posible sin vosotros. Mamá y papá, gracias por todo el esfuerzo que habéis hecho para que yo hoy haya llegado hasta aquí. Os habéis volcado en mi felicidad y lo habéis logrado. Recibir vuestro cariño y apoyo es esencial para la lucha diaria. Nos habéis educado en la bondad, el cariño y el esfuerzo y habéis conseguido formar a la mejor familia del mundo. A mis hermanos Iñigo y Joaquín, gracias por desear siempre lo mejor para mí. Por estar cerca y darme vuestra mejor versión. Sé que estáis orgullosos de mí, pero hoy soy yo la que está enormemente orgullosa de teneros como familia ¡Os quiero!

A ti Héctor, gracias por creer en mí y estar siempre a mi lado. Eres la persona más consciente de lo que ha supuesto para mí esta tesis doctoral. Has celebrado mis logros, me has animado e impulsado a seguir adelante en los momentos más duros, me has aguantado cuando ni yo misma lo hacía y me has enseñado a valorar lo realmente importante. Tú tienes la capacidad de sacarme una sonrisa y hacerme disfrutar del día a día. Gracias por compartir la vida conmigo. Esta tesis también está dedicada para ti.

De corazón GRACIAS a todos. Me siento muy afortunada de teneros cerca.

ABREVIATURAS

14-3-3: *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta*

5-caC: *5-Carboxylcytosine* (5-Carboxilcitosina)

5-fC: *5-Formylcytosine* (5-Formilcitosina)

5-hmC: *5-Hydroxyethylcytosine* (5-Hidroximetilcitosina)

5-mC: *5-Methylcytosine* (5-Metilcitosina)

AAE: ASI1-AIPP1-EDM2

AAV: *Adeno associated virus* (Virus adenoasociado)

Ac-K: *Acetyl-lysine* (Acetil-lisina)

ADP: *Adenosine di-phosphate* (Adenosina difosfato)

AFP: *α -fetoprotein*

AMPc: *Adenosine mono-phosphate cyclic* (Adenosin monofosfato-cíclico)

AREG: *Amphiregulin*

ARID1A: *AT-rich interaction domain 1A*

ATCC: *American type culture collection*

AZA: *5-Azacytidine* (5-Azacidina)

BAH: *Bromo-adjacent homology*

BCA: *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinconínico)

BIM: *BCL2 like 11*

BSA: *Bovine serum albumin* (Albúmina sérica bovina)

C13orf25: *Human chromosome 13 open reading frame 25*

CA150: *Transcription elongation regulator 1*

CARM1: *Coactivator associated arginine methyltransferase 1*

CBC: *Cap-binding complex*

CBP: *CREB binding protein*

CD45: *Protein tyrosine phosphatase receptor type C*

CDKs: *Cyclin dependent kinases*

cDNA: *Complementary DNA* (DNA complementario)

CGI: *CpG Island* (Isla CpG)

CHX: *Cycloheximide* (Cicloheximida)

CpGs: *Cytosine-guanine dinucleotides* (Dinucleótidos citosina-guanina)

CREB: *cAMP response element-binding protein*

CRM1: *Chromosomal region maintenance 1*

CTAs: *Cancer testis antigens*

CTCF: *Transcriptional repressor CTCF*

CYP4F3A: *Cytochrome P450 family 4 subfamily F member 3*

DAC: *5-Aza-2'-deoxycytidine* (5-Aza-2'-deoxicitidina)

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

DLG3: *Discs large MAGUK scaffold protein 3*

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

DMEM/F12: *Dubelcco's modified Eagle's medium/F12*

DMSO: *Dimethyl Sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DNAsa: *Deoxyribonucleases* (Deoxirribonucleasa)

DNMT1: *DNA methyltransferase 1*

DNMT2: *DNA methyltransferase 2*

DNMT3A: *DNA methyltransferase 3A*

DNMT3B: *DNA methyltransferase 3B*

DNMT3B4: *DNA methyltransferase 3B isoform 4*

DNMT3L: *DNA methyltransferase 3L*

DNMTs: *DNA methyltransferases*

dNTPs: *Deoxynucleotide triphosphates* (Deoxinucleótidos trifosfato)

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

DTT: *Dithiothreitol* (Ditiotreitól)

EDI: *Extra domain I*

EDTA: *Ethylene diaminetetraacetic acid* (Ácido etilendiaminotetraacético)

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

ELK1: *ETS transcription factor ELK1*

ERVs: *Endogenous retroviruses* (Retrovirus endógenos)

EWS-FLI1: *EWS RNA binding protein 1*

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

FGFR2: *Fibroblast growth factor receptor 2*

G3BP1: *Ras GTPase activating protein binding protein 1*

G9a (EHMT2): *Euchromatic histone lysine methyltransferase 2*

gDNA: *Genomic DNA (DNA genómico)*

GNMT: *Glycine-N-methyltransferase*

H3: *Histone 3*

HATs: *Histone acetyltransferases*

HCC: *Hepatocellular carcinoma (Hepatocarcinoma)*

HDAC1: *Histone deacetylase 1*

HDAC6: *Histone deacetylase 6*

HDACs: *Histone deacetylases*

HK2: *Hexokinase 2*

HMTs: *Histone methyltransferases*

HNF4 α : *Hepatocytes nuclear factor 4 α*

hnRNPs: *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*

HP: *Hepatectomía parcial*

HP1: *Heterochromatin protein 1*

IBM1: *Increase in bonsai methylation 1*

IF: *Inmunofluorescencia*

IP: *Inmunoprecipitación*

JNK: *C-Jun NH2-terminal kinase*

KAP1: *Transcription intermediary factor 1- β*

lncRNA: *Long non-coding RNA (RNA largo no codificante)*

LSD1: *Lysine-specific demethylase 1*

LSF: *Transcription factor CP2*

MAGE-A1: *MAGE family member A1*

MAGE-A7: *MAGE family member A7*

MAT2A: *Methionine adenosyltransferase 2A*

MeCP2: *Methyl-CpG binding protein 2*

MEM: *Minimal essential medium*

miRNA: *Micro-RNA (Micro-RNA)*

mRNA: *Messenger RNA (RNA mensajero)*

MSP: *Methylation specific PCR (PCR específica de metilación)*

ncRNA: *Non-coding RNA* (RNA no codificante)

NLS: *Nuclear localization signal* (Señal de localización nuclear)

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

p21: *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

P27: *Cyclin dependent kinase inhibitor 1B*

p38: *Mitogen-activated protein kinase 14*

p300: *E1A binding protein p300*

PCAF: *Lysine acetyltransferase 2B*

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

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

PGC-1: *PPAR γ coactivator 1 α*

PKC: *Protein kinase C*

PKM2: *Pyruvatekinase m2*

pre-mRNA: *Pre-messenger RNA* (Pre-ARN mensajero)

RASSF1A: *Ras-association domain family 1, isoform A*

RBP: *RNA-binding protein*

REST: *Silencing transcription factor*

RFTS: *Replication Foci–Targeting Sequence*

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RNA Pol: *RNA polymerase* (RNA polimerasa)

RNAse: *Ribonuclease* (Ribonucleasa)

RPMI: *Rosswell park memorial institute*

RRBS: *Reduced representation bisulfite sequencing* (Secuenciación por representación reducida tras tratamiento con bisulfito)

rRNA: *Ribosomal RNA* (RNA ribosómico)

RT-PCR: *Reverse transcription PCR* (Retrotranscripción y PCR)

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*

SAM: *S-adenosyl-L-methionine* (S-adenosil L-metionina)

SET7: *SET domain containing 7, histone lisyne methyltransferase*

SHAM: Control de cirugía

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

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

SIRT1: *Sirtuin 1*

SLU7: *Synergistic lethal with U5 snRNA*

snRNPs: *Small nuclear ribonucleoproteins*

SP1: *Sp1 transcription factor*

SRSF1: *Serine and arginine rich splicing factor 1*

SRSF3: *Serine and arginine rich splicing factor 3*

SRSFs: *Serine/arginine-rich splicing factors*

SUPT3H: *SPT3 homolog, SAGA and STAGA complex component*

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

TAT-SF1: *Cofactor required for Tat activation of HIV-1 transcription*

TCA: *Trichloroacetic acid* (Ácido tricloroacético)

TDG: *Thymine-DNA glycosylase* (Timina-ADN-glicosilasa)

TETs: *Ten-eleven translocation*

TFF3: *Trefoil factor*

TFs: *Transcription factors* (Factores de transcripción)

Tip60: *Tat interactive protein 60kDa*

TRIM47: *Tripartite motif containing 47*

tRNA: *Transfer RNA* (RNA de transferencia)

TSG: *Tumor suppressor gene* (Gen supresor de tumores)

UBE2I: *Ubiquitin-conjugating enzyme E2I*

UHRF1: *Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*

USP10: *Ubiquitin specific peptidase 10*

USP7: *Ubiquitin specific peptidase 7*

UV: Ultravioleta

WB: *Western blot*

WT1: *Wilms' tumor 1*

XAB2: *XPA binding protein 2*

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

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	19
1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	21
1.1. Mecanismos epigenéticos.....	22
1.2. Transcripción.....	25
1.3. Proceso de <i>splicing</i>	28
1.4. Interconexión entre los distintos mecanismos de regulación de la expresión génica	29
2. METILACIÓN DEL DNA Y DNA METILTRANSFERASA 1 (DNMT1).....	33
2.1. Complejo proteico responsable del mantenimiento de la metilación del DNA.....	36
2.2. Regulación de DNMT1.....	38
2.3. Regulación y papel de DNMT1 durante la proliferación celular.....	41
2.4. Papel de DNMT1 en cáncer.....	42
3. EL FACTOR DE SPLICING SLU7 (<i>SYNERGISTIC LETHAL WITH U5 SNRNA</i>).....	44
3.1. Papel de SLU7 en la fisiología hepática.....	46
3.2. Papel de SLU7 en la hepatocarcinogénesis.....	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. CULTIVO CELULAR.....	61
1.1. Líneas celulares.....	61
1.2. Tratamientos <i>In vitro</i>	62
1.3. Transfección transitoria de células.....	62
1.3.1. siRNAs (RNAs de interferencia pequeños o “ <i>small interfering RNAs</i> ”).....	62
1.3.2. Plásmidos.....	64
2. EXTRACCIÓN DE DNA.....	64
3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL DNA.....	65
3.1. Tratamiento con bisulfito.....	65
3.2. Secuenciación por Representación Reducida tras Tratamiento con Bisulfito (<i>Reduced Representation Bisulfite Sequencing</i> ; RRBS).....	66
3.3. PCR específica de metilación (<i>Methylation Specific PCR</i> ; MSP).....	67
3.4. Cuantificación global de la metilación del DNA por ELISA.....	68
3.5. Inmunofluorescencia.....	69
4. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).....	70

4.1.	Extracción de RNA	70
4.2.	Retrotranscripción (RT).....	70
5.	PCR CONVENCIONAL Y PCR A TIEMPO REAL	71
5.1.	PCR convencional	71
5.2.	PCR a tiempo real	72
6.	EXTRACCIÓN DE PROTEINAS.....	73
6.1.	Extracción de proteínas totales.....	73
6.2.	Fraccionamiento subcelular	73
6.3.	Extracción de histonas	74
6.4.	Cuantificación de proteínas	75
6.4.1.	Método del ácido bicinonínico (BCA).....	75
6.4.2.	Método de Bradford	75
7.	ENSAYOS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y SUS INTERACCIONES	76
7.1.	Inmunodetección de proteínas (<i>Western blot</i>).....	76
7.1.1.	Electroforesis y <i>Western blot</i>	76
7.1.2.	Inmunodetección.....	76
7.2.	Inmunoprecipitación.....	77
8.	ENSAYOS IN VIVO	78
8.1.	Producción de los virus adenoasociados (AAV)	78
8.2.	Silenciamiento de la expresión de SLU7 <i>in vivo</i>	79
8.3.	Modelo de regeneración hepática tras hepatectomía parcial (HP)	79
8.4.	Modelo de daño hepático agudo y crónico tras tratamiento con tetracloruro (CCl ₄).80	
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
	RESULTADOS.....	83
1.	SLU7 ES NECESARIO PARA LA CORRECTA METILACIÓN DEL DNA.....	85
1.1.	El silenciamiento de SLU7 provoca una hipometilación general del DNA.....	85
1.2.	Caracterización de la hipometilación global provocada por el silenciamiento de la expresión de SLU7.....	88
2.	SLU7 REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES CONTROLADOS POR METILACIÓN	94
2.1.	SLU7 regula la expresión de genes hipometilados tras su silenciamiento.	95
2.2.	El silenciamiento de SLU7 induce la expresión de genes supresores de tumores típicamente hipermetilados y silenciados en cáncer	98
2.3.	El silenciamiento de SLU7 induce la expresión de genes implicados en la inducción de la inmunidad innata y adaptativa y de genes regulados por impronta	99

3.	SLU7 ES NECESARIO PARA MANTENER LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEINA DNMT1 EN CELULAS PROLIFERANTES.....	102
3.1.	El silenciamiento de SLU7 reduce los niveles proteicos de DNMT1 en las células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5	102
3.2.	El silenciamiento de SLU7 no induce un <i>splicing</i> aberrante de DNMT1	104
3.3.	SLU7 regula la expresión de DNMT1 en todas las fases del ciclo celular	106
4.	SLU7 ES NECESARIO PARA MANTENER LA ESTABILIDAD PROTEICA DE DNMT1 EN CÉLULAS PROLIFERANTES DE DIFERENTES ORÍGENES.....	110
4.1.	SLU7 regula la estabilidad de la proteína DNMT1 en células tumorales de distintos orígenes.....	110
4.2.	SLU7 es necesario para impedir la degradación proteica de DNMT1	114
5.	IDENTIFICACIÓN DE SLU7 COMO UN NUEVO MIEMBRO ESENCIAL PARA LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EPIGENÉTICO DNMT1/UHRF1/G9a	116
5.1.	SLU7 interacciona con DNMT1.....	117
5.2.	SLU7 interacciona en la cromatina con todos los miembros del complejo de metilación del DNA: DNMT1/UHRF1/G9a.....	117
5.3.	SLU7 regula los niveles proteicos de G9a y UHRF1	118
6.	EL SILENCIAMIENTO DE SLU7 INDUCE LA ACETILACIÓN DE DNMT1	121
6.1.	El silenciamiento de SLU7 reduce los niveles de la isoforma de DNMT1 truncada en su extremo aminoterminal	122
6.2.	La reducción de la expresión de SLU7 aumenta los niveles de acetilación de la proteína DNMT1	124
6.3.	SLU7 es necesario para la interacción entre las proteínas DNMT1 y HDAC1	125
7.	SLU7 ES NECESARIO PARA LA ESTABILIDAD DE DNMT1 <i>IN VIVO</i>	129
7.1.	SLU7 es necesario para mantener los niveles proteicos adecuados de DNMT1 tras una hepatectomía parcial.....	130
7.2.	SLU7 es necesario para mantener los niveles proteicos de DNMT1 en modelos de daño hepático inducido por CCl ₄	132
7.3.	SLU7, DNMT1 y HDAC1 interaccionan <i>in vivo</i>	134
	DISCUSIÓN.....	135
	CONCLUSIONES.....	145
	BIBLIOGRAFÍA.....	149
	ANEXOS.....	169

INTRODUCCIÓN

1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica es el proceso por el cual la información codificada en el DNA (ácido desoxirribonucleico) se transforma en productos funcionales, bien sean proteínas o moléculas de RNA (ácido ribonucleico) no codificante (ncRNA) incluidos los RNA de transferencia (tRNA) y ribosómico (rRNA) o múltiples tipos de RNAs reguladores como por ejemplo, los microRNAs (miRNAs), los RNAs pequeños de interferencia (siRNA) o los RNA no codificantes largos (lncRNAs) (Figura 1).

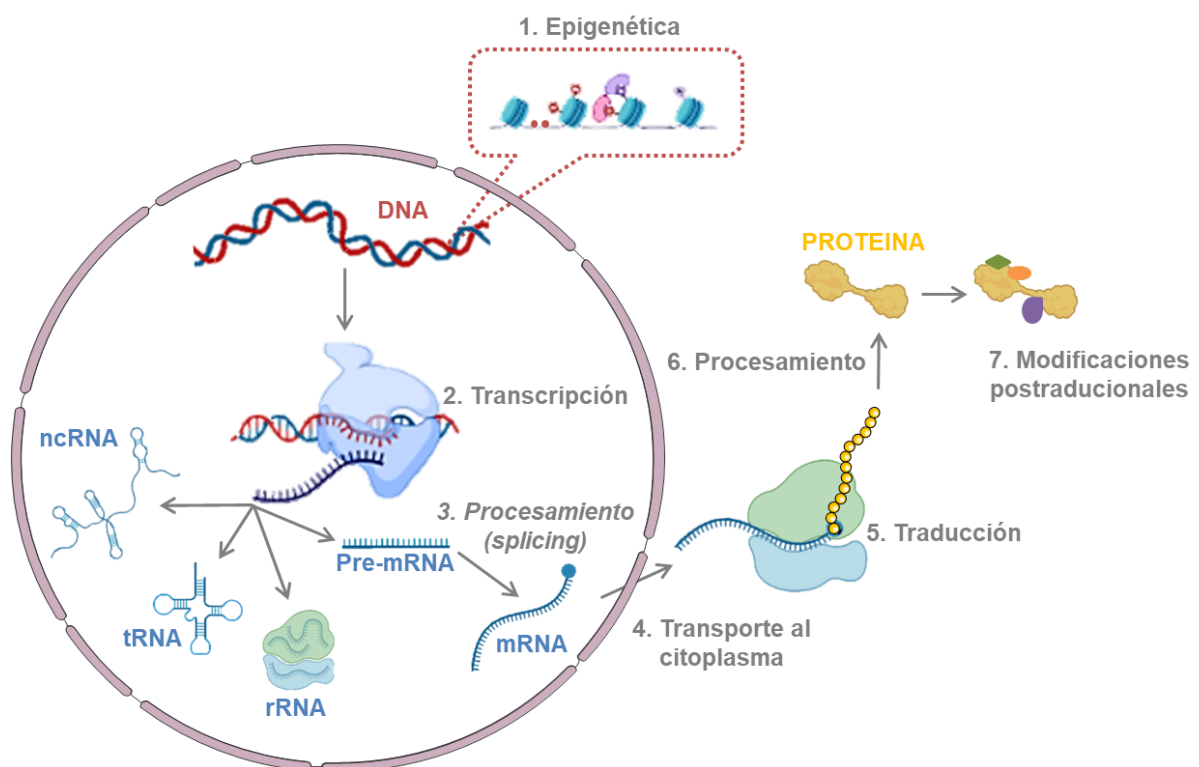


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes mecanismos encargados de regular la expresión génica. El primer nivel de regulación de la expresión génica es la accesibilidad a la cromatina, la cual viene determinada por las marcas epigenéticas (1). Modificaciones reversibles que, sin alterar la secuencia del gen, determinan la estructura y accesibilidad de la cromatina, dando lugar a la activación o represión de la transcripción¹. La transcripción (2) tanto de genes codificantes como no codificantes comienza con el reclutamiento de la RNA polimerasa (RNA Pol) y el resto de la maquinaria transcripcional en la región promotora del gen^{2,3}. A continuación tiene lugar el procesamiento del pre-RNA mensajero (pre-mRNA) y el proceso de *splicing*, que incluye el *splicing* alternativo (3), de tal manera que del mismo pre-mRNA se pueden producir distintos mRNAs. El mRNA es transportado al citoplasma (4), traducido (5) a una secuencia de aminoácidos en el ribosoma y procesado (6) dando lugar a la proteína. La cual, una vez generada puede someterse a una variedad de modificaciones postraduccionales (7) capaces de determinar su función, localización y su vida media.

La adecuada expresión espacio-temporal de los genes es un proceso dinámico y estrictamente controlado. De hecho, existen múltiples niveles de regulación de la expresión génica en los que participan distintos eventos moleculares interconectados: modulación de la accesibilidad a la cromatina, transcripción, corte y empalme (*splicing*), transporte y estabilidad del RNA mensajero (mRNA) y traducción, procesamiento, modificaciones postraduccionales y regulación de la estabilidad de las proteínas (Figura 1)⁴.

Todas las células de un organismo multicelular contienen el mismo material genético, sin embargo, gracias a la expresión génica diferencial y a su correcta regulación, cada célula, en cada momento, expresa un subconjunto específico de genes que definirán su identidad y su función.

A continuación se describen con más detalle los tres mecanismos iniciales implicadas en la regulación de la expresión de genes, tanto codificantes como no codificantes.

1.1. Mecanismos epigenéticos

El término "epigenética" fue introducido inicialmente por Conrad Waddington en 1939, definiéndolo como la rama de la biología que estudia las interacciones entre los genes y sus productos⁵. Actualmente, la epigenética hace referencia a los cambios heredables en los patrones de expresión génica que se producen sin alteraciones en la secuencia del DNA⁶. Los principales mecanismos epigenéticos incluyen las modificaciones químicas en el DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los RNAs no codificantes^{7,8} (Figura 2). Dichas modificaciones epigenéticas son reversibles y determinan en cada momento la estructura de la cromatina y la accesibilidad al DNA, induciendo la activación o represión de la transcripción^{1,9}. Las enzimas que establecen las modificaciones epigenéticas son comúnmente conocidas como escritoras o "*writers*", las enzimas encargadas de eliminar estas marcas son conocidas como borradores o "*erasers*" y las proteínas que son capaces de reconocer o leer estas marcas epigenéticas se denominan lectoras o "*readers*"¹⁰.

El conjunto de modificaciones epigenéticas establecen el epigenoma celular, que en contraposición al genoma, característico de cada individuo, se modifica continuamente, adaptándose y respondiendo a las señales del ambiente. Estos mecanismos epigenéticos están también implicados en la regulación de procesos como la inactivación del cromosoma X o la impronta genómica^{11,12}.

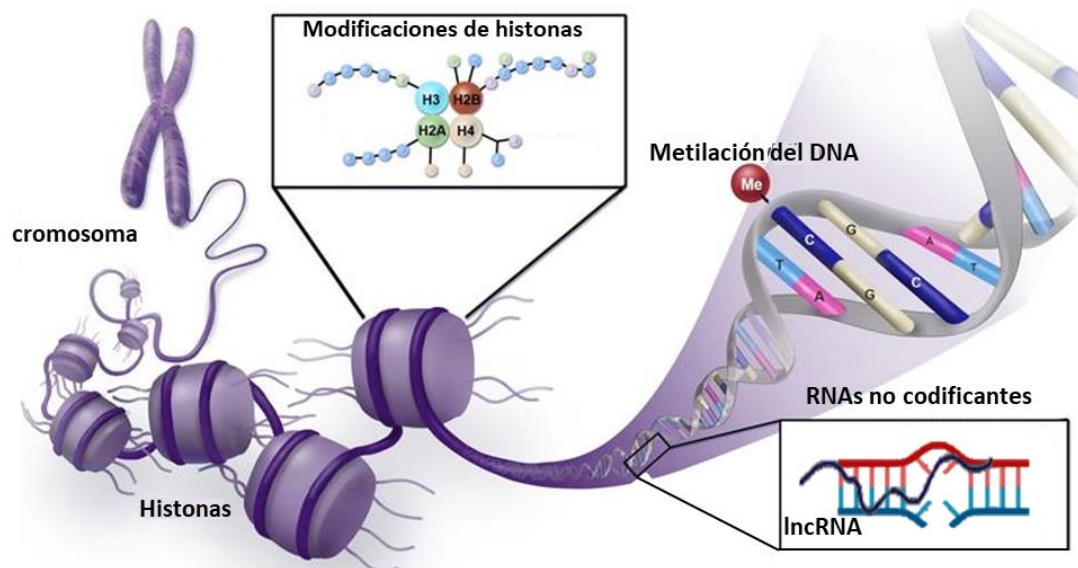


Figura 2. Regulación epigenética. Imagen representativa de las diferentes modificaciones epigenéticas. Adaptación de [www.Epigenetic Mechanisms: Emerging Therapeutic Targets for Blood Disorders - Hematology.Org](http://www.EpigeneticMechanisms:EmergingTherapeuticTargetsforBloodDisorders-Hematology.Org).

Las modificaciones epigenéticas incluyen:

Las **modificaciones de las histonas**. Dentro del cromosoma, el DNA se encuentra enrollado alrededor de un octámero de histonas compuesto por H2A, H2B, H3 y H4, formando la unidad de repetición de la cromatina, el nucleosoma¹³. Las colas N-terminales de las histonas son objeto de diversas modificaciones postraduccionales, incluyendo la fosforilación en residuos de serina, la metilación en arginina y la acetilación, metilación (mono, di y tri), ubiquitinación, sumoilación y ADP (adenosina difosfato)-ribosilación en residuos de lisina. Estas modificaciones de las histonas están implicadas tanto en el silenciamiento como en la activación de la expresión génica^{9,14}.

En concreto, las modificaciones en la histona 3 (H3) son las mejor caracterizadas. De manera general, la acetilación de histonas induce la activación de la transcripción, ya que neutraliza la carga positiva de las lisinas resultando en una reducción de la afinidad entre las histonas y el DNA y por tanto favoreciendo la apertura de la cromatina. Las enzimas encargadas de llevar a cabo la acetilación de histonas se denominan histona acetil transferasas (HATs). Por el contrario, la desacetilación de histonas por parte de las histona deacetilasas (HDACs) induce la inhibición de la transcripción, ya que genera una estructura compacta de la cromatina^{15,16}. Por otro lado, la metilación de histonas induce tanto activación como represión de la transcripción. La homeostasis de la metilación de las histonas se mantiene gracias a la actividad antagonista de las enzimas encargadas de metilar y desmetilar las histonas, histona metil transferasas (HMTs) e histona demetilasas, respectivamente^{15,16}.

Los **RNAs no codificantes**, es decir, moléculas de RNA que no se traducen a proteína y que pueden interactuar tanto con las histonas, como con el DNA¹⁷, representan un relevante grupo de modificadores epigenéticos. Así por ejemplo, la carga negativa de los ncRNAs neutraliza la carga positiva de las colas de las histonas al interactuar con ellas, generando una estructura abierta de la cromatina y favoreciendo la transcripción¹⁸. Además, los ncRNAs, especialmente los lncRNAs, pueden interactuar directamente con el DNA, dando como resultado la formación de estructuras híbridas que se han asociado tanto a la activación¹⁹ como a la inhibición de la transcripción²⁰.

Por último, dentro de **las modificaciones químicas en el DNA**, en mamíferos destaca la metilación del DNA²¹, que consiste en la transferencia de un grupo metilo (-CH₃) al carbono 5' de la citosina en los dinucleótidos citosina-guanina (CpG). A lo largo del genoma existen regiones enriquecidas en dinucleótidos CpGs denominadas islas CpGs (CGIs) que normalmente se localizan en los promotores de los genes. La metilación de los promotores se asocia con una inhibición de la transcripción dado que supone una compactación del DNA²². Las enzimas encargadas de catalizar la reacción de metilación del DNA son las DNA metiltransferasas (DNMTs) y las enzimas encargadas de desmetilar el DNA son las proteínas *ten-eleven translocation* (TETs)²². La

metilación del DNA y el papel de las DNMTs serán tratados más en detalle en el apartado 2.

Otras modificaciones químicas en el DNA son la 5-hidroximetilación, 5-formilación y 5-carboxilación en residuos de citosina (5-hmC, 5-fC y 5-caC respectivamente) las cuales se producen a partir de sucesivas reacciones de oxidación de la molécula 5-mC por parte de las enzimas TETs²³⁻²⁵. Las modificaciones 5-fC y 5-caC son simples productos intermedios de la desmetilación del DNA que finalmente son restauradas a citosinas no modificadas a través de un proceso de 2 pasos que involucra la acción secuencial de la timina-DNA-glicosilasa (TDG) junto con la reparación por escisión de base^{26,27}. Por el contrario, la molécula 5-hmC puede permanecer como una base estable en el DNA y jugar un papel en la regulación de la expresión génica modificando, por ejemplo, qué factores de transcripción se unen al DNA^{26,28}.

Alteraciones en las marcas epigenéticas y/o en la expresión de los diferentes factores epigenéticos inciden en el epigenoma y la dotación transcripcional de la célula y se asocian al desarrollo de enfermedades²⁹.

1.2. Transcripción

El proceso de transcripción consiste en la síntesis de una molécula de RNA a partir de la hebra molde de DNA. En eucariotas esta reacción está catalizada por el conjunto de enzimas RNA polimerasas cada una especializada en catalizar la síntesis de un RNA determinado. La RNA Pol I sintetiza los tres rRNAs más grandes, la RNA Pol II transcribe los genes que codifican proteínas y la mayoría de los ncRNA reguladores, y la RNA Pol III sintetiza principalmente el tRNA y el rRNA 5S. Las RNA Pol son enzimas con múltiples subunidades que se asocian a su vez con otras proteínas reguladoras de manera intermitente^{2,30}.

La transcripción es un proceso muy controlado que puede iniciarse por señales intra- o inter-celulares². Como ya se ha señalado, el primer nivel de regulación de la transcripción son las marcas epigenéticas, que determinan la apertura de la cromatina y la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a las regiones promotoras en el

DNA^{1,9}. Además, proteínas reguladoras conocidas como activadores transcripcionales se unen a secuencias específicas en el DNA y ayudan a atraer a la RNA Pol II al punto de inicio de la transcripción³, donde se une a los factores de transcripción (TFs) generales y al complejo de proteínas denominado Mediator³. Los TFs generales son proteínas que reconocen y se unen a secuencias específicas del DNA. En concreto, el primer paso es el reconocimiento de la “caja TATA” en la secuencia de DNA por parte del factor de transcripción TFIID, un segundo factor de transcripción TFIIB se une a TFIID sirviendo de anclaje para la RNA Pol II, la cual es guiada al DNA por TFIIE, TFIIIF y TFIIH. La unión de estos factores hace que TFIIH se active y actúe como quinasa fosforilando a la RNA Pol II, de manera que esta se activa e inicia la transcripción (Figura 3)². La transcripción continúa hasta que se encuentra con una secuencia específica de nucleótidos que contiene una señal de terminación. Unido a todo ello, existe una amplia colección de proteínas que a través de diferentes motivos moleculares son capaces de unirse a secuencias específicas del DNA, cerca de una región promotora, afectando en positivo o en negativo a la unión de la RNA Pol II, actuando como factores de transcripción y por tanto controlando la expresión génica.

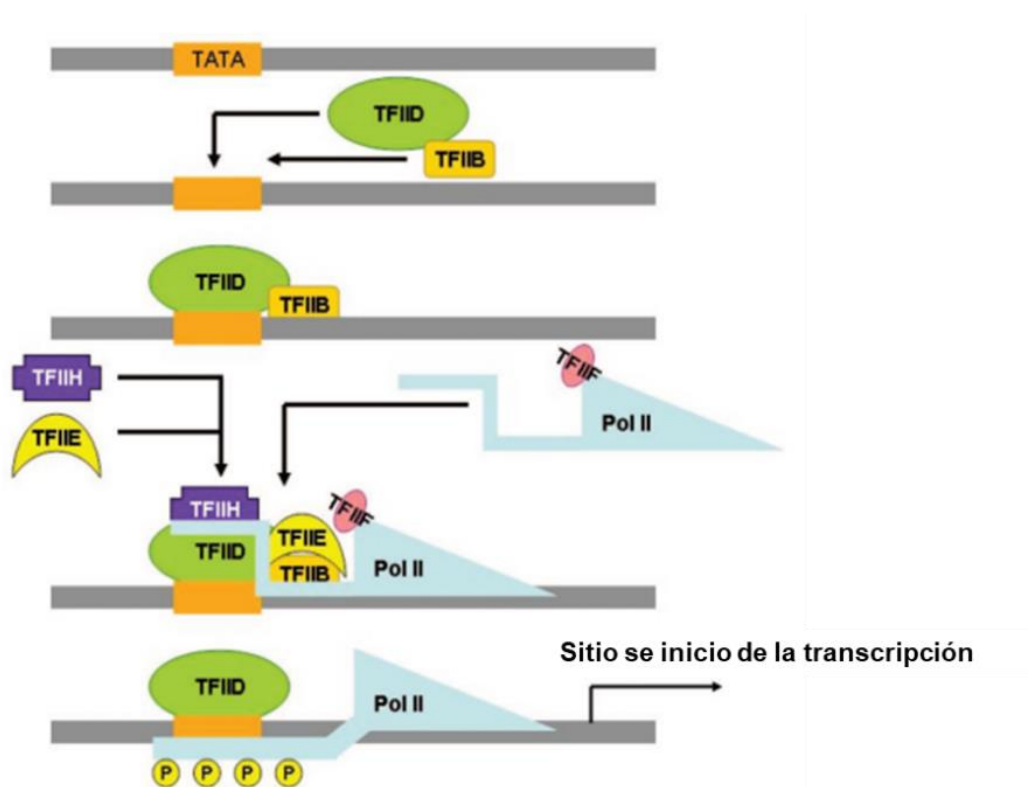


Figura 3. Unión de los factores de transcripción generales. Esquema representativo de la unión secuencial de los factores de transcripción generales en la transcripción. Adaptación de Deutschman C.S. *Crit. Care Med* (2005).

Los mRNA sintetizados por la RNA Pol II en eucariotas incorporan en el extremo 5' una "tapa" o "cap" que consta de un nucleótido de guanina metilado a través de la actividad de tres enzimas, que se unen a la cola fosforilada de la RNA Pol II³¹. Esta tapa juega a su vez un papel regulador, al unirse al complejo proteico llamado CBC (*cap-binding complex*) que ayuda a que el mRNA se procese y exporte correctamente al citoplasma, participando también en el proceso de la traducción³¹.

Todos estos factores implicados de forma directa en la transcripción pueden a su vez estar regulados por interacciones con otras proteínas o por diferentes modificaciones postraduccionales, estableciéndose una compleja red de control².

Mutaciones que afecten a las distintas secuencias de unión en el DNA, o alteraciones en la expresión de alguno de esos factores de transcripción o proteínas

reguladoras, tienen como consecuencia cambios en los patrones de expresión génica y por ende en el comportamiento celular, estando implicados en el desarrollo de múltiples patologías, incluido el cáncer^{2,32}.

1.3. Proceso de *splicing*

Las secuencias codificantes de proteínas o exones de los genes de eucariotas suelen estar interrumpidas por secuencias intermedias no codificantes, los intrones. El proceso de corte y empalme o *splicing* consiste en la eliminación de los intrones del pre-mRNA, y la ligación de los exones para la formación del mRNA maduro³³. Este proceso es mediado por el espliceosoma, un complejo macromolecular formado por distintas snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*, snRNPs U1, U2 y tri-snRNP U4-U5-U6) y factores auxiliares (Figura 4)³⁴.

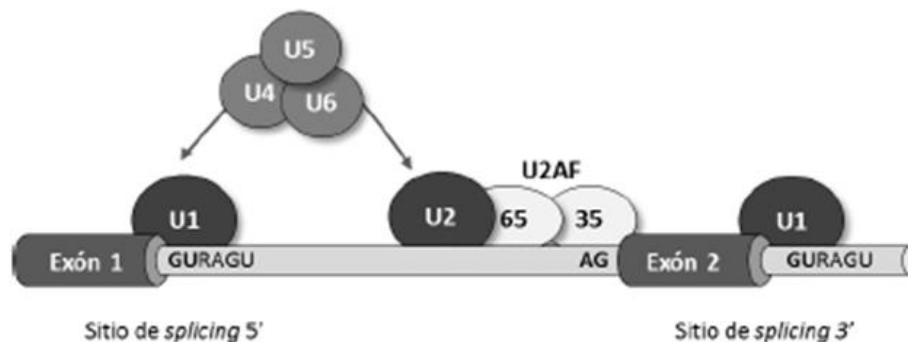


Figura 4. Representación de los sitios de *splicing*, y de las distintas snRNPs que forman parte de los complejos del espliceosoma. Entre los elementos necesarios para el proceso de *splicing* encontramos los sitios de *splicing* 5' y 3'. La proteína U1 se une al sitio de *splicing* 5'. El factor auxiliar U2AF consta de dos subunidades que se unen al sitio de *splicing* 3'. A continuación, tiene lugar el ensamblaje de los snRNPs U4, U5 y U6 necesario para la eliminación del intrón y la ligación de los exones. Adaptación de Berasain C y col. *World J Gastroenterol* (2010).

El proceso de *splicing* está dirigido por secuencias consenso en el DNA (sitios de *splicing*) presentes en las uniones exón/intrón (Figura 4). En los límites de los intrones encontramos los sitios de *splicing* 5' donadores que comienzan con los nucleótidos GU y los sitios de *splicing* 3' aceptores que terminan con los nucleótidos AG. El proceso enzimático del *splicing* consiste en dos reacciones de transesterificación consecutivas

reguladas por la ribonucleoproteína U1 snRNP en primer lugar y por la ribonucleoproteína U2 snRNP y el factor auxiliar U2AF en segundo lugar. A continuación se produce la interacción de las ribonucleoproteínas U4, U6 y U5 generando el sitio catalítico donde tiene lugar la escisión del intrón y la ligación de los exones³⁵. 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 espliceosoma que participa en la correcta selección del sitio 3' de *splicing* durante la segunda reacción de transesterificación^{34,36-38}.

Para un proceso de *splicing* correcto y específico es fundamental el adecuado ensamblaje del complejo ribonucleoproteico del espliceosoma al pre-mRNA y la correcta identificación de los sitios de *splicing*. Además, existen secuencias reguladoras tanto potenciadoras como silenciadoras del *splicing* localizadas en los intrones y exones del pre-mRNA, que son reconocidas por proteínas específicas RBPs (*RNA-binding proteins*), entre ellas las hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) y los factores de *splicing* SRSFs (*serine/arginine-rich splicing factors*). La colaboración y unión entre las distintas proteínas y secuencias reguladoras guía la asociación o disociación del complejo del espliceosoma a sitios concretos de *splicing*^{33,39}.

Así, la selección alternativa de los sitios de *splicing* (*splicing* alternativo) da lugar a cambios en la secuencia del mRNA maduro, de manera que a partir de un mismo gen pueden generarse múltiples variantes de mRNA, que contienen diferentes exones y que codifican diferentes isoformas proteicas con distinta especificidad funcional^{33,40,41}.

Una vez más, las alteraciones en las secuencias de *splicing* o en la expresión de alguno de los componentes del espliceosoma y/o de los factores de *splicing* repercuten en la identidad y función celular participando en procesos patológicos.

1.4. Interconexión entre los distintos mecanismos de regulación de la expresión génica

Como venimos comentando, las diferentes marcas epigenéticas a lo largo del genoma regulan la transcripción, modulando la estructura de la cromatina e influyendo

en la interacción del complejo de la RNA Pol II con los promotores⁴² y/o en la unión de los distintos factores de transcripción⁴³ y/o los activadores o represores de la transcripción a las secuencias consenso del DNA en el punto de inicio de la transcripción⁴⁴.

Comúnmente, la metilación de las CGIs que se encuentran en los promotores de los genes se asocia con una inhibición de su transcripción¹². Por el contrario, las modificaciones de histonas pueden tanto favorecer como inhibir la transcripción. De manera general, en las regiones transcripcionalmente activas es frecuente encontrar acetilación de histonas y la marca de metilación H3K4me3 y por el contrario, la desacetilación de histonas y las marcas de metilación H3K9me3 y H3K27me3 se corresponde frecuentemente a modificaciones represoras de la transcripción¹⁴.

La idea de que la epigenética dicta la transcripción está bien definida. No obstante, también se ha demostrado el escenario contrario, donde la unión de distintos factores de transcripción a sus sitios sustrato influye en las marcas epigenéticas de dicha región⁴⁵⁻⁴⁸. Estos factores de transcripción no tienen actividad enzimática en sí para metilar el DNA o modificar histonas, sino que son capaces de reclutar a factores epigenéticos, haciendo que estos modulen la accesibilidad a la cromatina. Como por ejemplo, el factor de transcripción RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) capaz de interactuar con la histona deacetilasa HDAC6 en el promotor de p21 (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) induciendo la desacetilación de histonas en esta región⁴⁹, o el factor de transcripción KAP1 (*transcription intermediary factor 1β*) quien recluta e interactúa con las DNMTs para llevar a cabo la metilación *de novo* en su sitio sustrato⁴⁸. De la misma manera, se ha demostrado que la unión de los factores de transcripción CTCF (*transcriptional repressor CTCF*)⁵⁰ o REST (*silencing transcription factor*)⁵¹ a sus sitios sustrato influye en el patrón de metilación de dicha región⁴⁶.

Por otro lado, las diferentes marcas epigenéticas también pueden influir en el *splicing*, ya que este proceso tiene lugar de manera coordinada con la transcripción cuando el pre-mRNA permanece todavía unido a la cromatina^{52,53}. De hecho, se ha descrito como modificaciones específicas de histonas interfieren en el reclutamiento de factores de *splicing* en regiones específicas^{52,54}. Por ejemplo, se ha demostrado que

la histona acetiltransferasa SUPT3H (*SPT3 homolog, SAGA and STAGA complex component*) y la histona metiltransferasa CARM1 (*coactivator associated arginine methyltransferase 1*) interaccionan con las ribonucleoproteínas U2 y U1 snRNPs respectivamente facilitando el correcto ensamblaje del espliciosoma⁵³. Asimismo, la posición de las diferentes marcas de histonas puede definir el proceso de *splicing*. Es el caso de FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*), quien sufre *splicing* alternativo de manera específica de tejido en función de la localización de las marcas de histonas^{52,53}.

En la misma línea, se ha demostrado que la metilación del DNA regula el *splicing* alternativo^{55,56}. De hecho, el 22% del *splicing* alternativo de los exones está regulado por la metilación del DNA⁵⁶. Esto es debido a dos mecanismos: el primero implica la unión de la proteína HP1 (*heterochromatin protein 1*) al DNA, quien recluta a factores de *splicing* en los exones alternativos, como el caso del reclutamiento de SRSF3 en el exón EDI (*extra domain I*) de la fibronectina⁵⁷ y el segundo implica el tiempo de elongación de la RNA Pol II, bien por la unión del factor de transcripción CTCF o por la unión de MeCP2 (*methyl-CpG binding protein 2*). CTCF se une a exones alternativos no metilados, aumentando el tiempo de elongación de la RNA Pol II y promoviendo la inclusión de los mismos, es el caso del *splicing* alternativo del exón 5 de CD45 (*protein tyrosine phosphatase receptor type C*)⁵⁸. Por el contrario, MeCP2 se une a exones alternativos metilados y recluta a HDACs, que llevan a cabo la desacetilación de histonas, aumentando el tiempo de elongación de la RNA Pol II y promoviendo la inclusión de estos exones metilados⁵⁶.

Al contrario, estudios recientes han descrito diferentes procesos de *splicing* alternativo capaces de influir en la regulación epigenética^{59,60}. Es el caso de la histona demetilasa IBM1 (*increase in bonsai methylation 1*)⁶¹ y el remodelador de la cromatina ARID1A (*AT-rich interaction domain 1A*)⁶², ambos modificadores epigenéticos necesitan de proteínas implicadas en el *splicing* alternativo, AAE (*ASI1-AIPP1-EDM2*) y la proteína de fusión EWS-FLI1 (*EWS RNA binding protein 1*) respectivamente para generar su transcrito canónico y ejercer su función.

Otra evidencia de la complejidad en el proceso de regulación de la expresión génica es la actuación coordinada y acoplada de la transcripción y el *splicing*. Tanto el

propio promotor⁶³, como los factores de transcripción⁶⁴ pueden reclutar a distintos factores de *splicing*, modulando dicho proceso^{65,66}. Además, distintos estudios indican que la elongación transcripcional y el *splicing* pueden estar influenciados recíprocamente, de manera que tiempos largos de elongación favorecen la inclusión de exones alternativos, mientras que tiempos cortos de elongación favorecen la exclusión de los mismos^{66,67}. A su vez, la interacción entre diferentes snRNPs con el factor de transcripción de la elongación TAT-SF1 (*cofactor required for tat activation of HIV-1 transcription*) pueden estimular la elongación de la RNA Pol II⁶⁷. Además, distintos factores de *splicing* son capaces de interactuar con factores de transcripción y regular las diferentes etapas de este proceso; es el caso de la interacción entre U1 snRNP y el factor de transcripción general TFIIH regulando el inicio de la transcripción⁶⁸. Adicionalmente, la presencia de factores y cofactores de transcripción como CA150 (*transcription elongation regulator 1*), XAB2 (*XPA binding protein 2*) y TAT-SF1 en el espliceosoma⁶⁹, así como la existencia de proteínas con doble actividad en el *splicing* y la transcripción como PGC-1 (*PPARγ coactivator 1α*), pueden explicar los vínculos entre ambos procesos⁶⁶.

No obstante, la regulación de la expresión génica es un proceso de mayor complejidad y no sólo está determinado por la acción combinada de los distintos factores epigenéticos, factores de transcripción y factores de *splicing*. Así, estos moduladores de la expresión génica pueden estar a su vez regulados a nivel epigenético, transcripcional y por *splicing*. Concretamente, el 70% de los genes que codifican para modificadores epigenéticos, expresan más de un transcrito⁷⁰ algunos de ellos con cambios en la secuencia que pueden generar finalmente isoformas proteicas con nuevas funciones o incluso con función de dominante negativa frente a la proteína canónica⁷⁰. Es el ejemplo de las variantes de *splicing* de *DNMT3B* (*DNA methyltransferase 3B*), específicamente la isoforma DNMT3B4 forma complejo con las DNMT3A (*DNA methyltransferase 3A*), y DNMT3B activas y reduce su unión al DNA, de manera que inhibe significativamente la metilación *de novo*⁷¹.

El conjunto de estos resultados pone de manifiesto la complejidad y la conexión entre los distintos niveles de regulación de la expresión génica necesarios para

asegurar la adecuada expresión espacio-temporal de los genes y por tanto garantizar la identidad, función y viabilidad celular.

2. METILACIÓN DEL DNA Y DNA METILTRANSFERASA 1 (DNMT1)

La metilación del DNA fue descubierta en 1948 por Hotchkiss⁷². Como se ha mencionado anteriormente, se trata de una modificación covalente en el DNA, concretamente la adición de un grupo metilo (-CH₃) de la S-adenosil L-Metionina (SAM) al carbono 5 en los residuos de citosinas (5-metilcitosina, 5-mC) en los dinucleótidos CpG.

Los dinucleótidos CpG no se encuentran distribuidos de manera homogénea a lo largo del genoma, sino que existen regiones del DNA con una alta densidad de CpGs denominadas islas CpGs (CGIs). Mientras que la mayor parte de las CpGs se encuentran metiladas, aquellas localizadas dentro de las CGIs se encuentran libres de metilación^{73,74}. En el genoma humano existen aproximadamente 38.000 CGIs y una gran parte de ellas (37%) se localizan en los promotores de los genes. De hecho, aproximadamente el 60% de los genes conocidos tienen una CGI cerca del sitio de inicio de la transcripción⁷³.

Como hemos mencionado anteriormente, el estado de metilación de las CpGs regula por ejemplo, la interacción del complejo de la RNA Pol II con los promotores⁴², la unión de factores de transcripción^{43,44}, o los mecanismos de *splicing* alternativo^{55,56}. En definitiva, interviene en la regulación de la expresión génica y el mantenimiento de la estabilidad genómica. En concreto, cuando las CpGs de la región promotora de los genes están metiladas se reprime la transcripción. Sin embargo, la metilación de las CpGs que se encuentran en CGIs dentro del cuerpo de los genes se asocia con una inducción de la transcripción. (Figura 5)⁷⁵.

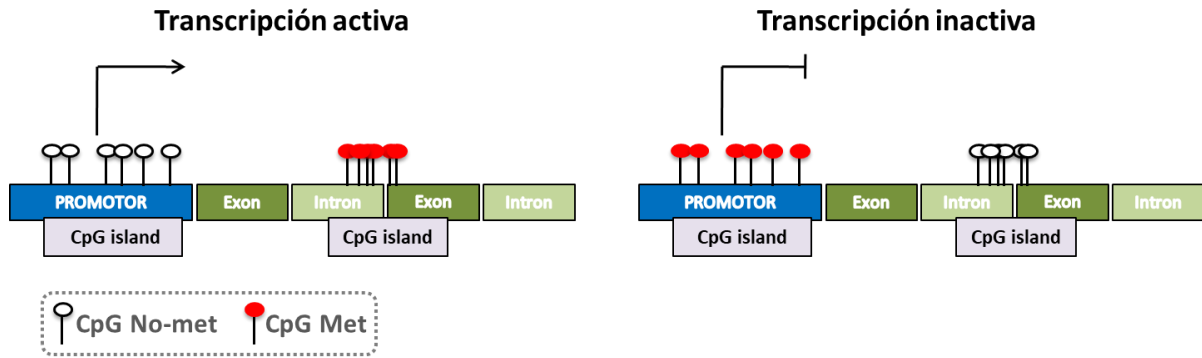


Figura 5. Representación esquemática del efecto de la metilación del DNA sobre la transcripción, en función de la localización de las islas CpG.

Así, la metilación del DNA determina el patrón de expresión génica, controlando también la impronta genómica⁷⁶, la inactivación del cromosoma X¹¹ y el silenciamiento de los retrovirus endógenos⁷⁷ entre otros. De manera que la metilación del DNA juega un papel esencial en el control de la diferenciación y la función celular^{12,78,79}.

Como se ha indicado más arriba, en las células de mamíferos la metilación del DNA está catalizada por una familia de enzimas conocidas como DNMTs. Todas ellas utilizan el residuo SAM como donador de grupos metilo. La desmetilación del DNA se produce en varias reacciones consecutivas catalizadas por tres enzimas, TET1, TET2 y TET3.

La primera DNMT descubierta en mamíferos fue DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*)⁸⁰, la cual se codifica en el cromosoma 19. Se han descrito diferentes transcritos. El transcrito canónico contiene 5274 pares de bases y 41 exones y corresponde a una proteína de 1632 aminoácidos de aproximadamente 200 kDa. Esta enzima tiene preferencia por metilar el DNA hemimetilado, siendo por tanto la enzima responsable de copiar el patrón de metilación del DNA de la hebra parental a las hebras hijas tras cada ciclo de replicación del DNA^{81,82}. Por el contrario, DNMT3A y DNMT3B, tienen mayor afinidad por metilar los dinucleótidos CpG no metilados, por lo que son responsables del establecimiento de un nuevo patrón de metilación durante el desarrollo, es decir, de la metilación *de novo*⁸³. Además de estas tres DNMTs, existen otros dos miembros en esta familia: DNMT2 (*DNA methyltransferase 2*), la cual no

metila el DNA, sino la citosina 38 en el tRNA del ácido aspártico⁸⁴ y la DNMT3L (*DNA methyltransferase 3L*), la cual no tiene actividad catalítica en sí, pero aumenta la actividad de las DNMTs *de novo*⁸⁵.

Estructuralmente las DNMTs contienen un dominio catalítico C-terminal conservado entre todas ellas compuesto por 500 aminoácidos y donde se encuentra el centro activo de la enzima. Por otro lado, contienen una región N-terminal, cuyo tamaño y dominios varía entre las distintas DNMTs. La región N-terminal de DNMT1 contiene un dominio de unión a DMAP1 (*DNMT1-associated protein 1 binding domain*), un dominio de unión a PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), una señal de localización nuclear (NLS), un dominio RFTS (*replication foci-targeting sequence*), un dominio de zinc CXXC rico en cisteínas, y dos dominios BAH (*bromo-adjacent homology*)⁸⁶ (Figura 6).

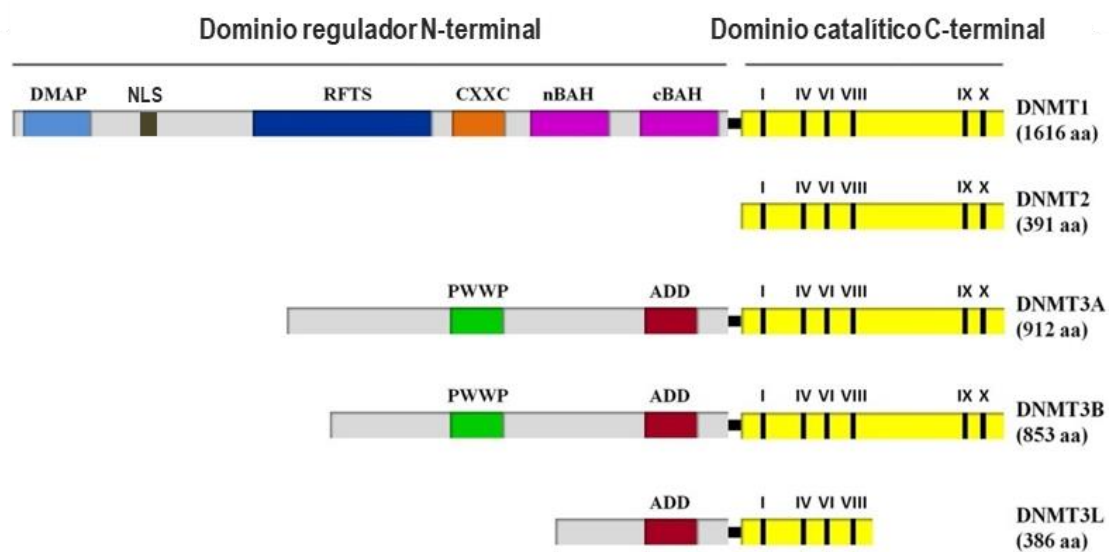


Figura 6. Representación esquemática de los distintos dominios de las DNA metiltransferasas en humano. Adaptación de Maresca A y col. *Front. Genet* (2015).

El dominio NLS determina su localización nuclear dentro de la célula. El dominio de unión a DMAP1 participa en las interacciones con distintas proteínas. El dominio de unión a PCNA, el dominio RFTS y los dominios BAH están implicados en la orientación de DNMT1 a los focos de replicación durante la fase S del ciclo celular⁸⁷⁻⁸⁹. Además, el dominio RFTS junto con el dominio CXXC participan en el efecto auto inhibitorio de DNMT1, permitiendo su actividad únicamente sobre el DNA hemimetilado como explicaremos más adelante⁹⁰. Por otro lado, DNMT3A y DNMT3B están muy relacionadas y son muy semejantes entre sí. En su región N-terminal contienen un dominio PWWP (prolina-triptófano-triptófano-prolina) de unión al DNA y un dominio ADD, rico en cisteínas, encargado de interactuar con otras proteínas⁹¹.

2.1. Complejo proteico responsable del mantenimiento de la metilación del DNA

Aunque la enzima encargada de catalizar la transferencia del grupo metilo a las CpGs hemimetiladas en la hebra recién sintetizada durante la replicación es DNMT1, el proceso de metilación del DNA depende de la asociación coordinada de un conjunto de proteínas. Entre ellas destaca UHRF1 (*ubiquitin-like PHD and RING finger domain 1*), encargada del reclutamiento de DNMT1 a la horquilla de replicación durante la fase S del ciclo celular⁹²⁻⁹⁵. En concreto, UHRF1 a través de su dominio SRA reconoce y se une a las CpGs hemimetiladas⁹². A continuación, mediante su dominio RING, UHRF1 ubiquitina a la H3 y esta marca es reconocida por DNMT1, dirigiendo su reclutamiento a los sitios de replicación. De acuerdo con ello, se ha demostrado que DNMT1 y UHRF1 interactúan^{92,96} a través del dominio UBL⁹⁴.

Además, simultáneamente a la metilación del DNA, tiene lugar la metilación de la H3 en el residuo de lisina 9 (H3K9) catalizada por G9a (*euchromatic histone lysine methyltransferase 2; EHMT2*)⁹⁷. En concreto, G9a cataliza la mono- y di-metilación de H3K9⁹⁸. Al igual que la metilación del DNA, la metilación de H3K9 es una marca epigenética fuertemente asociada con la represión de la transcripción⁹⁹. Además de su unión al DNA hemimetilado, UHRF1 también se une preferentemente a la H3K9 metilada¹⁰⁰, a través de su dominio PHD y de su dominio tudor¹⁰¹, reclutando a G9a a

la horquilla de replicación¹⁰². Así, se ha descrito cómo UHRF1, a través de su dominio RING interactúa con el dominio N-terminal de G9a a nivel de la cromatina¹⁰².

De esta manera, DNMT1, UHRF1 y G9a colocalizan en el núcleo e interactúan a nivel de la cromatina en un complejo con el cofactor de la DNA polimerasa PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) en la horquilla de replicación^{97,103}, definiendo así el complejo canónico encargado de mantener la metilación del DNA y de la H3K9 y reprimiendo por tanto la transcripción génica^{97,104} (Figura 7).

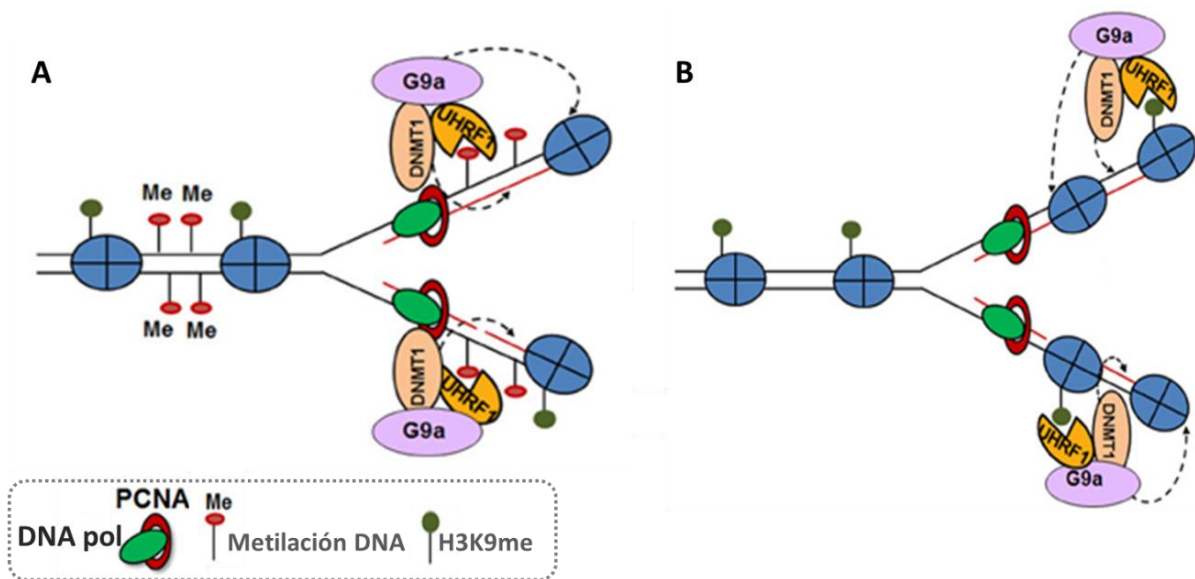


Figura 7. Imagen representativa del proceso de mantenimiento de la metilación del DNA y de la lisina 9 de la H3 (H3K9) tras la síntesis del DNA. Tras la replicación del DNA, UHRF1 reconoce las CpGs hemimetiladas **(A)** y/o la marca H3K9me_{2/3} **(B)** y recluta a DNMT1 y G9a para que establezcan el patrón de metilación de la hebra de DNA recién sintetizada y de H3K9. Adaptación de Cheedipudi S y col. *Front. Genet* (2014).

Es importante destacar que los miembros del complejo cooperan entre sí estimulando sus correspondientes actividades enzimáticas, de manera que la formación del complejo tiene consecuencias funcionales⁹⁷. Así, se ha demostrado que el silenciamiento de DNMT1 reduce en aproximadamente un 50% la actividad de G9a⁹⁷. De hecho, se ha descrito que la reactivación de los genes supresores de tumores que tiene lugar cuando se trata a las células tumorales con inhibidores de DNMT1 se produce tanto por desmetilación del DNA como por disminución de los niveles de

H3K9me2^{105,106}. De la misma manera, la inhibición tanto de G9a como de UHRF1 reducen la metilación del DNA^{92,97}. Esta inhibición de G9a en células tumorales es suficiente para inducir la reactivación de genes supresores de tumores, sin embargo el efecto se ve potenciado cuando en paralelo se inhibe DNMT1¹⁰⁷.

2.2. Regulación de DNMT1

El continuo cambio en la fisiología celular y el significativo papel del mantenimiento de la metilación del DNA en la regulación de la expresión génica requieren una regulación exhaustiva de la enzima DNMT1. En las células de mamíferos existen diversos mecanismos intrínsecos y extrínsecos que regulan la expresión, actividad y estabilidad de DNMT1, como son las cascadas de señalización, la regulación transcripcional, las modificaciones postraduccionales, las interacciones con otras proteínas y los mecanismos de control auto inhibitorios¹⁰⁸.

Dentro de las cascadas de señalización capaces de regular la expresión de *DNMT1*, podemos destacar las rutas de RAS/AP-1, Rb/E2F o p53/SP1¹⁰⁹. Por ejemplo, la vía de señalización RAS/AP-1 regula la activación transcripcional y estabilización del mRNA de *DNMT1* durante la fase S del ciclo celular¹¹⁰. La vía de señalización de Rb/E2F induce la expresión de *DNMT1* durante la fase S y la inhibe en el resto de fases del ciclo¹¹¹. Por otro lado, en ausencia de estímulos, p53 se encuentra unido al promotor de *DNMT1* inhibiendo su expresión; cuando existe daño en el DNA, la activación de la vía de señalización de p53 reduce su unión a *DNMT1* dando lugar a un aumento de su expresión¹¹². Otras vías de señalización que regulan la expresión de *DNMT1* son ERK/MAPK¹¹³, TGFβ/SMAD2¹¹⁴, APC/β-catenina/TCF¹¹⁵ o hedgehog/GLI1¹¹⁶. Por otro lado, la vía PI3K/PKB está implicada en la modulación de la estabilidad de la proteína DNMT1 inhibiendo su degradación por el proteasoma¹¹⁷.

La expresión de *DNMT1* puede además ser regulada post-transcripcionalmente por varias familias de miRNAs. Se han descrito miRNAs capaces de unirse directamente al extremo 3' UTR o a la región codificante, o capaces de interactuar con factores de transcripción que controlan la expresión de *DNMT1*¹⁰⁹. Algunos ejemplos son miR-

148a¹¹⁸, miR-152¹¹⁹, miR-185¹²⁰ o miR-126¹²¹. También se han descrito ncRNAs que regulan post-traduccionalmente la proteína DNMT1^{122,123} y su actividad¹²⁴ al interactuar con ella. Por ejemplo, ncRNAs codificados por el gen *CEBPA* regulan la expresión de este, al interactuar con DNMT1 impidiendo la metilación de su promotor¹²⁴.

Sin embargo, la manera más dinámica y rápida de regular los niveles de DNMT1 son las modificaciones postraduccionales reversibles que puede sufrir la proteína, que incluyen la metilación, la fosforilación, la acetilación, la sumoilación y la ubiquitinización (Figura 8)¹²⁵.

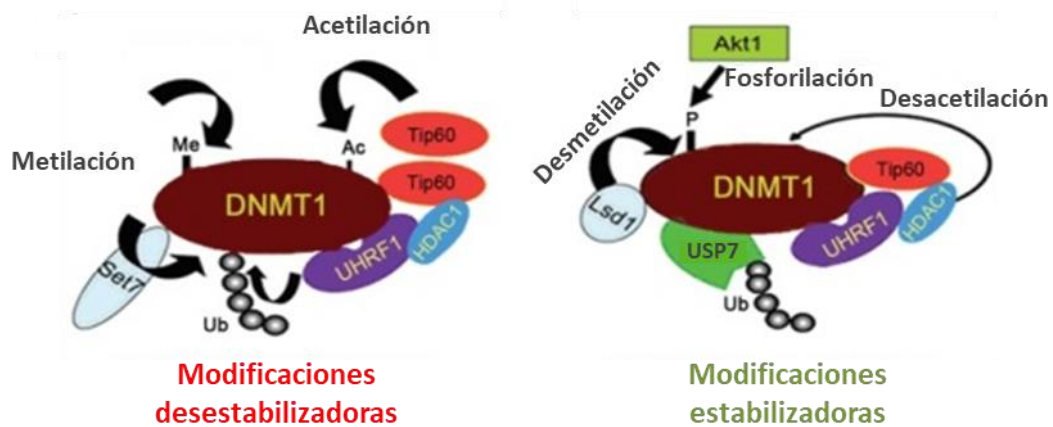


Figura 8. Esquema de los modificadores y las modificaciones postraduccionales más representativas que regulan la estabilidad de la proteína DNMT1. Adaptación de Scott A y col. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (2014).

La metilación es la marca covalente que más rápidamente lleva a DNMT1 a degradación, se han descrito dos lisinas susceptibles de ser metiladas K142 y K1094¹⁰⁸. La histona metiltransferasa *SET7* (*SET domain containing 7, histone lysine methyltransferase*) se une a DNMT1 y la metila, marcándola así para su posterior degradación¹²⁶, siendo la histona demetilasa *LSD1* (*lysine-specific demethylase 1*) la enzima encargada de desmetilar DNMT1¹²⁷. Se ha descrito que la metilación de la K142 ocurre de manera excluyente a la fosforilación del aminoácido contiguo S143. Esta fosforilación, llevada a cabo por la proteína quinasa *AKT1*, estabiliza a DNMT1¹²⁸. Además se han descrito diversas fosforilaciones en otros residuos de serina mediadas

por las quinasas AKT, PKC (*protein kinase C*) y varias CDKs (*cyclin dependent kinases*) capaces de estabilizar la proteína DNMT1¹⁰⁸. Respecto a la acetilación, existen diversos residuos de lisina susceptibles de ser acetilados por distintas acetil transferasas como son Tip60 (*tat interactive protein 60kDa*), p300 (*E1A binding protein p300*) o PCAF (*lysine acetyltransferase 2B*), lo que induce la unión de UHRF1 a DNMT1, que la ubiquitina marcándola para su degradación por el proteasoma¹²⁹. Por el contrario, DNMT1 puede ser desacetilada por las histonas deacetilasas HDAC1 (*histone deacetylase 1*) o SIRT1 (*sirtuin 1*)¹³⁰, lo que promueve que sea desubiquitinada y por tanto estabilizada por USP7 (*ubiquitin specific peptidase 1*)^{131,132}. Por último, la modificación más recientemente conocida es la sumoilación que tiene lugar en varios residuos de lisina y es mediada por UBE2I (*ubiquitin-conjugating enzyme 2I*) aumentando la actividad catalítica de DNMT1¹³³. Todas estas modificaciones postraduccionales deben estar perfectamente reguladas para mantener los niveles adecuados de DNMT1.

Conjuntamente, DNMT1 interacciona con distintas proteínas capaces de, además de regular su estabilidad, estimular o inhibir su actividad, o modificar su localización subcelular^{108,134}. Algunos ejemplos son proteínas que participan en la replicación y reorganización de la cromatina¹³⁵, proteínas de unión al DNA¹³⁶, reguladores del ciclo celular¹³⁷, supresores de tumores¹³⁸, factores de transcripción¹³⁹, entre otros. Por ejemplo, se ha descrito que la unión de la proteína 14-3-3 (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta*) a DNMT1 fosforilada resulta en la inhibición de su actividad¹⁴⁰ o que su unión con PCNA facilita que DNMT1 sea reclutada a la horquilla de replicación del DNA durante la fase S del ciclo celular⁸⁹.

Por otro lado, con el fin de impedir cualquier metilación *de novo* no programada, DNMT1 tiene un mecanismo de control auto inhibitorio de su actividad donde entra en juego tanto el dominio regulador de DNMT1 (N-terminal) como el dominio catalítico (C-terminal)¹⁰⁸. En concreto, se ha descrito que su dominio RFTS es el responsable de permitir la unión del dominio catalítico de DNMT1 con el DNA hemimetilado, ya que en las regiones totalmente metiladas y no metiladas, este dominio se une al sitio activo de la enzima bloqueándolo¹⁴¹⁻¹⁴³. A pesar de que el dominio RFTS es el dominio

autoinhibidor por excelencia¹⁴², el dominio CXXC también participa en este control, uniéndose a regiones de DNA no metilado, evitando de este modo que lo haga el dominio catalítico^{141,142,144}.

2.3. Regulación y papel de DNMT1 durante la proliferación celular

Se ha descrito una expresión diferencial de DNMT1 a lo largo del ciclo celular. Cuando la célula está en periodo de reposo, fase G0, los niveles de DNMT1 son mínimos, y se restauran cuando la célula entra en el ciclo celular para su replicación¹⁴⁵. Al comienzo de la fase G1 (fase de crecimiento), cuando tiene lugar una rápida activación transcripcional y traduccional de proteínas y enzimas necesarias para la fase de síntesis, se observan bajos niveles de DNMT1¹⁴⁶. Conforme avanza la fase G1 se produce una inducción de su transcripción, alcanzándose su pico máximo de expresión durante la fase S o fase de síntesis, cuando es reclutada por UHRF1 a la horquilla de replicación junto con los otros miembros del complejo de mantenimiento de la metilación del DNA y tiene lugar la metilación de la hebra hija recién sintetizada. Una vez realizada su función, los niveles de DNMT1 vuelven a disminuir durante la fase G2/M^{146,147}.

El relevante papel de DNMT1 durante el ciclo celular se confirma al ser esencial para la proliferación y viabilidad celular durante el desarrollo de varios modelos de ratón así como de células cancerígenas humanas^{148,149}. De acuerdo con ello, se ha demostrado que DNMT1 es fundamental para la correcta histogénesis y regeneración hepática¹⁵⁰. Concretamente, se ha demostrado que DNMT1 es necesaria para que los hepatocitos puedan regenerar tras sufrir hepatectomía parcial y exposición a CCl₄¹⁵⁰. Por el contrario, en un escenario de homeostasis, el silenciamiento de DNMT1 en los hepatocitos adultos y quiescentes, no desencadena ningún fenotipo destacable¹⁵⁰. Así, tras la inducción de daño, los hepatocitos en los que se ha eliminado DNMT1, no son capaces de proliferar y regenerar el hígado. Sin embargo, las células progenitoras hepáticas, en las que DNMT1 no ha sido eliminada, proliferan y recuperan la masa hepática. Asimismo, estos autores demuestran que el silenciamiento de DNMT1 en estas células progenitoras hepáticas, también provoca daño en el DNA, parada del ciclo

celular, senescencia y muerte celular, confirmando el importante papel de DNMT1 en la proliferación celular.

2.4. Papel de DNMT1 en cáncer

El cáncer se asocia tanto a alteraciones genéticas como epigenéticas¹⁵¹. Una de las modificaciones epigenéticas que se encuentra con más frecuencia en los distintos tipos de tumores es la metilación aberrante del DNA. En concreto se produce una hipometilación global del DNA acompañada por una hipermetilación en CGIs, sobre todo las situadas en los promotores de genes supresores de tumores, representando uno de los principales mecanismos moleculares de las células tumorales para el silenciamiento de estos genes (Figura 9)¹⁵².

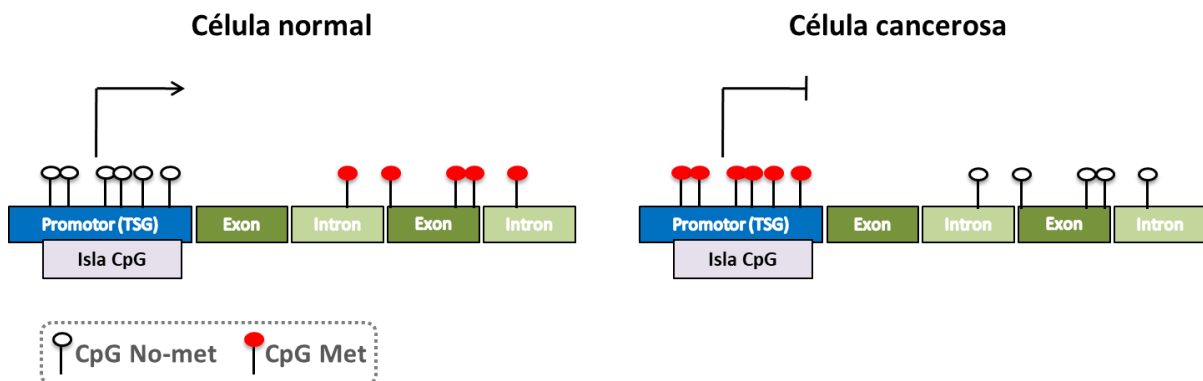


Figura 9. Representación esquemática del cambio en el patrón de la metilación del DNA observado en los genes supresores de tumores (TSG) durante el proceso de carcinogénesis.

Asimismo, en cáncer se ha descrito la hipermetilación de CGIs localizadas en el cuerpo de los genes, concretamente de oncogenes, lo cual está asociado con su activación transcripcional¹⁵³. Además, la hipermetilación en regiones concretas del genoma también precede a la aparición de inestabilidad cromosómica durante la carcinogénesis¹⁵².

Por otro lado, en células tumorales encontramos una hipometilación global que se corresponde con un aumento de la expresión de los genes afectados^{154,155}. Dentro de las regiones que sufren hipometilación en cáncer encontramos secuencias satélite, secuencias repetidas (como LINE, SINE, IAP y Alu), secuencias víricas latentes incorporadas en el genoma, genes específicos de tejido (como *cancer testis antigens*, CTAs), oncogenes y otros genes implicados en la proliferación, la señalización, movilidad e invasión celular¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. De manera que, la hipometilación global promueve el desarrollo del tumor por la activación de oncogenes y la inducción de inestabilidad genómica¹⁵⁷. Así, por ejemplo, en el hepatocarcinoma (HCC) se han descrito mutaciones y reordenamientos en regiones de la cromatina que se encuentran hipometiladas¹⁵⁸.

Varios estudios han revelado cómo los patrones de metilación del DNA son diferentes en los distintos tipos de tumores. Dependiendo de la histología del tumor, presentan unos perfiles de metilación u otros¹⁵⁹. A pesar de esta variación entre tumores, existe un subconjunto de CGIs que se encuentran frecuentemente metiladas en múltiples tipos tumorales¹⁶⁰.

Estas alteraciones en la metilación del DNA están acompañadas por la expresión aberrante de las enzimas epigenéticas implicadas. Se ha descrito un incremento de la expresión tanto de DNMT1¹⁶¹⁻¹⁶⁵ como de DNMT3A y DNMT3B^{161,166} en los distintos tumores, así como la expresión de G9a^{164,165,167} y UHRF1^{164,165,168}. La expresión de estos modificadores epigenéticos aumenta a lo largo de la progresión de la enfermedad de forma que su elevada expresión se asocia con un mal pronóstico^{8,169-171}.

Cabe destacar que estas alteraciones en la expresión de las DNMTs y la metilación aberrante no solamente ocurren en el cáncer, sino que ya ocurren en condiciones patológicas premalignas. Un claro ejemplo es el proceso de hepatocarcinogénesis¹⁷²⁻¹⁷⁵. La transformación maligna de los hepatocitos ocurre en más del 80 % de los casos sobre un hígado crónicamente dañado, en presencia de inflamación, fibrosis y regeneración. Numerosos estudios han demostrado el papel de alteraciones de la metilación y/o de DNMT1 en la activación de las células estrelladas hepáticas y la inducción de fibrosis^{176,177}, en la pérdida de identidad y función de los hepatocitos en

la enfermedad hepática alcohólica¹⁷⁸ o en la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores ya en el hígado cirrótico¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Todo ello pone de manifiesto el importante papel de las alteraciones epigenéticas, y en concreto de las alteraciones en la metilación del DNA, en el desarrollo del hepatocarcinoma^{182,183}.

3. EL FACTOR DE SPLICING SLU7 (SYNERGISTIC LETHAL WITH U5 SNRNA)

El factor de *splicing* SLU7, originalmente descrito en levaduras, desempeña un papel fundamental durante el proceso de *splicing* asegurando la correcta selección del sitio de *splicing* 3' durante la segunda reacción catalítica de transesterificación^{36-38,184-188}.

En humanos, *SLU7* se localiza en el cromosoma 5. Se han descrito diferentes transcritos de mRNA. El transcrito más largo contiene 3480 pares de bases y 16 exones, y codifica una proteína de 586 aminoácidos de aproximadamente 75 kDa. Estructuralmente presenta cuatro dominios funcionales: una señal de localización nuclear (NLS), un motivo *zinc-knuckle*, una región rica en lisinas y cuatro dominios ricos en leucinas (Figura 10). El motivo *zinc-knuckle* se localiza dentro del dominio NLS, formando una estructura funcional única que permite la entrada y el mantenimiento de SLU7 dentro del núcleo celular, previniendo su vuelta al citoplasma por la vía CRM1 (*chromosomal region maintenance 1*). Esta posible translocación al citoplasma vía CRM1 es mediada por los cuatro dominios ricos en leucinas. Por último, el dominio rico en lisinas, que se encuentra en el extremo C-terminal, permite su asociación con ácidos nucleicos y otras proteínas¹⁸⁹. Además, de acuerdo con estudios de criomicroscopía electrónica, se han identificado dos regiones principales en la proteína de SLU7 (los aminoácidos 62-196 y 265-371) capaces de interactuar con proteínas del espliceosoma¹⁹⁰.

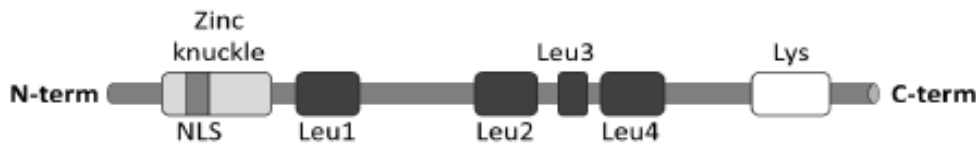


Figura 10. Estructura de la proteína SLU7 en humanos. La proteína SLU7 está compuesta por cuatro dominios funcionales: señal de localización nuclear (NLS), *zinc-knuckle*, cuatro repeticiones de leucinas (*Leu 1-4*) y un dominio rico en lisinas (*Lys*). Adaptado de *Shomron N et al. J Cell Sci (2005)*.

De manera transcripcional, se ha descrito que los factores de transcripción ELK-1 (*ETS transcription factor ELK1*) y SP1 (*Sp1 transcription factor*) se unen al promotor de *SLU7* regulando su expresión de manera inversa y dosis dependiente, concretamente SP1 induce y ELK-1 inhibe la expresión de *SLU7*¹⁹¹. De acuerdo con ello, y como se describe más adelante, nuestro grupo ha demostrado que *SLU7* se expresa a alto nivel en el hígado sano, pero esta expresión disminuye durante el proceso de hepatocarcinogénesis siendo mínima en el hepatocarcinoma¹⁹².

Nuestros datos muestran que la expresión de *SLU7* en el hígado también se reduce en las fases más tempranas de la regeneración hepática, para permitir la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular¹⁹³, aunque la recuperación de su expresión es necesaria para permitir la correcta progresión de la mitosis en los hepatocitos evitando la parada del ciclo celular y la inestabilidad genómica¹⁹⁴.

Por otra parte, datos de nuestro laboratorio también muestran que la expresión de *SLU7* presenta una regulación circadiana por la ingesta, de manera que la insulina disminuye los niveles de *SLU7*¹⁹³. Además, hemos demostrado una expresión diferencial de *SLU7* en el hígado durante el desarrollo embrionario, de forma que su expresión se induce en el hígado del ratón tras el nacimiento¹⁹³.

En cuanto a su localización subcelular, *SLU7* se localiza normalmente en el núcleo¹⁸⁹, sin embargo, distintas señales de estrés celular pueden alterar su localización y promover su transporte al citoplasma a través de la activación de la vía de señalización JNK (*C-Jun NH2-terminal kinase*) y, en menor medida de p38 (*Mitogen-*

activated protein kinase 14)¹⁹⁵. También se ha descrito que tras la inducción de estrés del retículo endoplásmico con tapsigargina, SLU7 se transloca al citoplasma y se concentra en vesículas que recuerdan a los gránulos de estrés¹⁹⁶.

3.1. Papel de SLU7 en la fisiología hepática

Para mantener la homeostasis de los tejidos es necesario un equilibrio preciso entre diferenciación y proliferación. El mantenimiento de este equilibrio es especialmente importante en el hígado, un órgano altamente diferenciado con funciones metabólicas sistémicas y dotado con un gran potencial regenerativo. El hígado desempeña una serie de funciones únicas y esenciales para la preservación de la homeostasis del organismo, como por ejemplo, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la desintoxicación de xenobióticos y la síntesis de proteínas séricas. La mayoría de estas funciones las realiza el hepatocito, una célula quiescente y altamente diferenciada que expresa un conjunto de genes muy específicos^{197,198}.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha demostrado la importancia de conservar una expresión adecuada de SLU7 para asegurar y mantener el correcto patrón de expresión génica responsable de la identidad del hepatocito y por tanto de la integridad funcional hepática¹⁹³. En este contexto, SLU7 puede actuar regulando la expresión génica a varios niveles y a través de diferentes mecanismos, que incluyen el control de procesos de *splicing*, la regulación de la transcripción y la regulación de la estabilidad de proteínas. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que SLU7 es esencial para la correcta expresión en el hígado de reguladores fundamentales de la identidad hepática, como son el factor de *splicing* SRSF3¹⁹⁹ y el factor de transcripción HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*)²⁰⁰ así como para la correcta actividad del complejo transcripcional inducido por el AMPc (*adenosine mono-phosphate cyclic*) que regula la expresión de genes esenciales en el metabolismo hepático^{193,201}. Más específicamente, SLU7 es necesario para mantener el correcto *splicing* y expresión de SRSF3^{193,194}, evitando la inducción de una isoforma aberrante que incorpora el exón 4 con un codón de terminación temprana, de manera que activa la maquinaria NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) para su degradación y/o resulta en la acumulación de

isoformas truncadas de la proteína SRSF3^{193,194}. Nuestros datos además demuestran que SLU7 regula directamente la transcripción de genes metabólicos activados por el AMPc interaccionando con la RNA Pol II, el factor de transcripción P-CREB (*cAMP response element-binding protein*) y el cofactor CBP (*CREB binding protein*) en sus promotores¹⁹³. Más recientemente hemos demostrado que SLU7 es fundamental para mantener la estabilidad de la proteína HNF4α1 impidiendo su degradación por estrés oxidativo y la subsiguiente activación del promotor fetal P2^{193,202}. Todo ello demuestra que SLU7 es necesario para mantener el transcriptoma del hepatocito adulto y funcional e impedir la inducción de isoformas fetales que, por ejemplo, activan la glicolisis y la proliferación de los hepatocitos¹⁹³. Así, nuestros resultados demuestran que SLU7 es fundamental para definir y mantener el fenotipo maduro y quiescente del hígado regulando a diferentes niveles la expresión génica.

3.2. Papel de SLU7 en la hepatocarcinogénesis

Como se ha señalado anteriormente, el hígado es un órgano altamente especializado y diferenciado con funciones fundamentales para la homeostasis del organismo. Esta posición central en el metabolismo sistémico hace que el hígado esté expuesto de manera destacada a estímulos nocivos derivados de tóxicos ambientales, alcohol, virus y hábitos dietéticos como la acumulación de grasa, que constituyen las principales causas de enfermedad hepática²⁰³. Para hacer frente a estos insultos, el hígado desarrolla respuestas reparadoras orientadas a recuperar la homeostasis basadas en la producción de matriz extracelular cicatrizante y en la notable y muy controlada capacidad regenerativa por la proliferación de los hepatocitos^{204–206}. Sin embargo, la persistencia de los insultos, con la inducción sostenida de la muerte de los hepatocitos y de inflamación, puede conducir al desarrollo de fibrosis y de cirrosis hepática, con acumulación de matriz extracelular y la presencia de nódulos hepatocelulares de regeneración²⁰⁷. Estas condiciones, se consideran preneoplásicas, puesto que más del 80 % de los HCCs se desarrollan sobre hígados con un daño crónico en un proceso conocido como hepatocarcinogénesis^{208,209}. Es importante resaltar que a lo largo de este proceso tiene lugar la pérdida progresiva de la función hepática,

debido no sólo a la muerte de los hepatocitos, sino a una disminución gradual de la expresión de genes hepatoespecíficos o desdiferenciación de los hepatocitos remanentes²¹⁰⁻²¹³. Estos cambios suelen ir acompañados de un aumento de la proliferación celular y de la reactivación de genes característicos del hepatocito fetal^{212,214,215}. Todo este escenario favorece la fijación de mutaciones y el desarrollo del HCC²⁰⁸. Durante los últimos años nuestro grupo ha demostrado que SLU7 desempeña un importante papel en este proceso.

Como se ha mencionado, hemos demostrado que la alta expresión de SLU7 en el hígado sano se ve disminuida a lo largo de la progresión de la enfermedad hepática debido a la inducción, en respuesta a las señales inflamatorias, de la expresión del factor de crecimiento anfiregulina (AREG)²¹⁶⁻²¹⁸. En concreto demostramos que la rápida inducción de la expresión del factor de crecimiento AREG en el hígado dañado activa el receptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*), que fosforila JNK y activa ELK-1 para inhibir la expresión de SLU7¹⁹².

Nuestros datos sugieren que esta expresión reducida de SLU7 en el hígado dañado puede estar contribuyendo al desarrollo y la progresión del daño hepático²⁰² por ejemplo, a través de la inducción de estrés oxidativo²⁰². Así, hemos demostrado que SLU7 es necesario para asegurar la formación de los gránulos de estrés citoplasmáticos y mantener la expresión de dos de sus componentes principales como son G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*) y USP10 (*ubiquitin-specific peptidase 10*), que con sus propiedades antioxidantes protegen a las células frente al estrés oxidativo²⁰².

A su vez, la caída de la expresión de SLU7 durante la progresión de la enfermedad hepática contribuiría a la desdiferenciación hepatocelular, a la pérdida de las funciones hepáticas y por tanto a la progresión del daño, debido, como se ha mencionado más arriba, a su papel fundamental en el mantenimiento del transcriptoma hepático¹⁹³. De acuerdo con ello, la disminución de SLU7 provoca la inhibición de la expresión de genes característicos del hepatocito adulto y la inducción de la expresión de isoformas propias del hígado fetal, como los marcadores oncofetales H19 y AFP (*α-fetoprotein*), el factor de transcripción WT1 (*Wilms' tumor 1*), las isoenzimas CYP4F3A (*cytochrome*

P450 family 4 subfamily F member 3) y *MAT2A (methionine adenosyltransferase 2A)* o la isoforma A del receptor de la insulina generada por *splicing* alternativo del exón 11¹⁹³.

Muchos de estos eventos pueden estar asociados al importante papel de SLU7 en el mantenimiento de la estabilidad de la proteína HNF4 α ¹⁷⁸, factor de transcripción implicado en el desarrollo embrionario del hígado y en el mantenimiento del fenotipo característico de los hepatocitos adultos²⁰⁰. Nuestros datos muestran que el estrés oxidativo inducido al disminuir la expresión de SLU7, mediado por la caída de expresión de USP10, es el responsable de la degradación de HNF4 α ¹⁷⁸. Así, la disminución de los niveles de SLU7 durante el desarrollo de la enfermedad sería responsable de la inhibición de la expresión de los genes diana de HNF4 α contribuyendo al desarrollo de daño hepático y a la pérdida de identidad y función del hígado²⁰².

Además, la caída de la expresión de SLU7 en el hígado dañado podría tener un papel oncogénico más directo a través de varios mecanismos. Por un lado, la inhibición de la expresión de SLU7 se relaciona con la inducción de la glicólisis y de las isoformas metabólicas PKM2 (*pyruvatekinase m2*) y HK2 (*hexokinase 2*) directamente relacionadas con la transformación maligna de los hepatocitos^{219,220}. Asimismo, el silenciamiento de SLU7 resulta en la alteración del *splicing* alternativo de *TP73*, generándose una forma oncogénica carente del exón 2 ($\Delta Ex2p73$)^{192,221}. Esta isoforma aberrante de TP73 carece del dominio de transactivación y puede actuar como dominante negativo tanto de P53 y como de TP73²²², encontrándose inducida en el hígado cirrótico de los pacientes y en el HCC¹⁹².

Por otro lado, hemos demostrado que la disminución de la expresión de SLU7 podría contribuir a la inestabilidad genómica asociada a la transcripción (TAGIN), por ejemplo, mediante la formación de *R-loops* (híbridos DNA-RNA) y la inducción de daño en el DNA¹⁹⁴. Este efecto podría deberse a la ausencia directa de SLU7 o a su papel regulando el *splicing* y la expresión de otros factores de *splicing* como SRSF1, directamente implicado en la prevención de la formación de *R-loops*¹⁹⁴. La disminución en la expresión de SLU7 puede contribuir también a la inestabilidad genómica a través

de la inducción de defectos mitóticos, puesto que la generación de isoformas aberrantes de SRSF3 inhibe el correcto *splicing* del mRNA de la Sororina, resultando en la inhibición de la expresión de esta proteína, esencial para asegurar la correcta cohesión de las cromátidas hermanas en la placa mitótica durante la división celular¹⁹⁴. En resumen, la disminución de la expresión de SLU7 facilita la formación de *R-loops* y la inducción de daño en el DNA asociado también a la inducción de estrés oxidativo y resulta en defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas y en el reparto de éstas durante la mitosis¹⁹⁴.

El conjunto de nuestros resultados demuestra que la pérdida de la expresión de SLU7 observada en el inicio de la patología hepática contribuye a la dediferenciación y pérdida de función característica del proceso de hepatocarcinogénesis, así como a la inducción de la proliferación, el daño en el DNA y la inestabilidad genómica, favoreciendo el proceso de transformación maligna.

Quizás asociado al importante estrés mitótico que puede suponer la pérdida de SLU7 en un contexto de alta proliferación, nuestros resultados muestran que las células transformadas de muy diferente origen, incluidas las de HCC, dependen de SLU7 para su viabilidad²²³.

Este efecto estaría también relacionado con la regulación mediada por SLU7 del *splicing* del mRNA *C13orf25* (*human chromosome 13 open reading frame 25*) necesario para dar lugar a la expresión del *cluster* de microRNAs oncogénicos miR17-92 localizado en el intrón 3²²³. En las células transformadas SLU7 se une directamente al mRNA de *C13orf25* y favorece la inclusión del intrón 3, de tal manera que se genera el transcrito codificante para los miRNAs del clúster miR17-92²²³. De esta forma, la eliminación de la expresión remanente de SLU7 en células tumorales desencadena la disminución de la expresión del clúster oncogénico y, por tanto, la inducción de la expresión de sus genes diana, incluidos el gen pro-apoptótico BIM (*BCL2 like 11*) y el inhibidor del ciclo celular P21²²³, lo que contribuye a la muerte por apoptosis de las células transformadas²²³.

El conjunto de resultados demuestra el importante papel de SLU7 en la fisiopatología hepática. Siendo esencial para mantener el patrón de expresión génica

necesario para asegurar la diferenciación, la quiescencia y la función metabólica del hígado¹⁹³. Además, SLU7 es necesario para asegurar una respuesta correcta frente al estrés oxidativo²⁰² y para preservar la integridad del genoma evitando la acumulación de *R-loops*, daño en el DNA y errores en la segregación cromosómica¹⁹⁴. En consecuencia, la disminución de la expresión de SLU7 en situaciones patológicas¹⁹² contribuye al desarrollo del daño y la hepatocarcinogénesis. Así mismo, nuestros datos muestran que SLU7 es esencial para la viabilidad de las células transformadas, ya que su eliminación en células tumorales induce estrés mitótico y la consiguiente muerte celular²²³.

Es importante señalar, que nuestros datos muestran que SLU7 participa en todas estas funciones controlando la expresión génica a diferentes niveles como son la transcripción, el *splicing* y la estabilidad de proteínas (Figura 11).

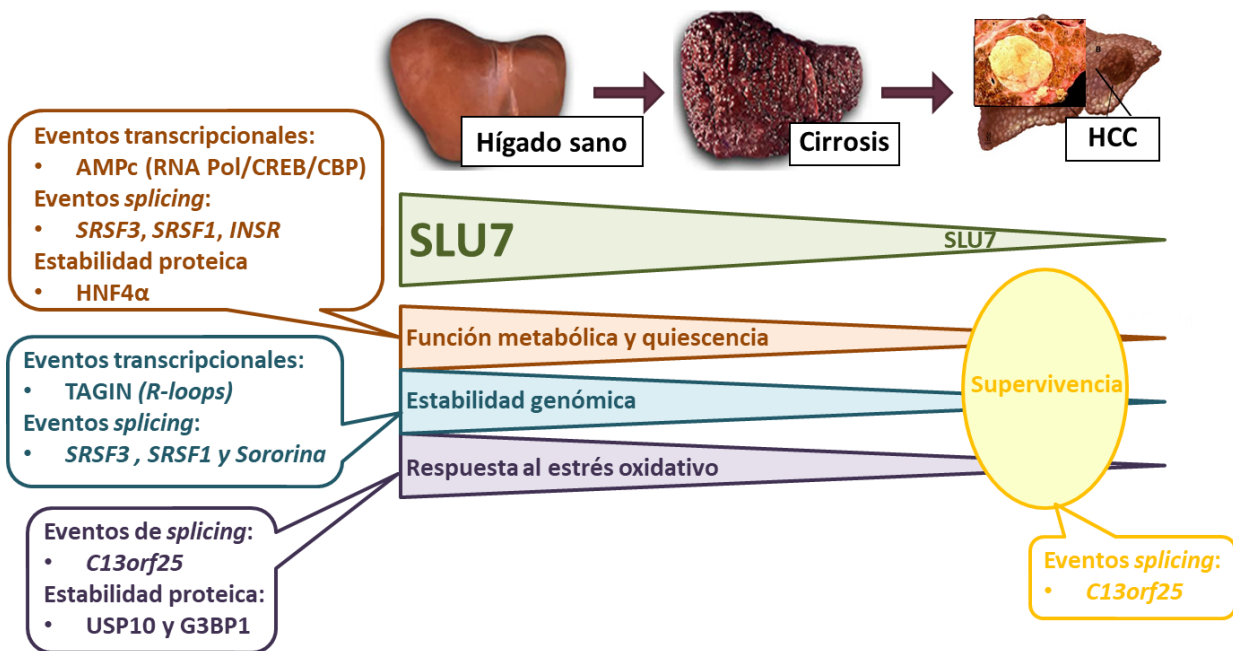


Figura 11. Esquema resumen de las funciones en las que está implicado SLU7 en la fisiopatología hepática actuando como regulador de la expresión génica a varios niveles.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Múltiples eventos moleculares, estrictamente regulados e interconectados, participan en la correcta expresión espacio-temporal de los genes, entre ellos, las modificaciones epigenéticas, la transcripción, el procesamiento del mRNA, la traducción o la estabilidad proteica.

Estudios previos de nuestro laboratorio han identificado al factor de *splicing* SLU7 como esencial para asegurar el adecuado patrón de expresión génica responsable de la correcta diferenciación, quiescencia y función metabólica del hígado¹⁹³. Asimismo, demostramos que SLU7 es necesario para el mantenimiento de la integridad genómica y la correcta progresión del ciclo celular¹⁹⁴, siendo así un factor fundamental para la supervivencia de las células de hepatocarcinoma y de células cancerosas de otros orígenes²²³. En estos escenarios, SLU7 actúa regulando la expresión génica a varios niveles, en concreto hemos demostrado que participa en la regulación de la transcripción, en procesos de *splicing*, y en la regulación de la estabilidad de proteínas^{193,194,223}.

El primer nivel de regulación de la expresión génica viene determinado por la epigenética, modificaciones reversibles que, sin alterar la secuencia de DNA, determinan la accesibilidad a la cromatina^{1,9}. Una de las modificaciones epigenéticas más estudiada es la metilación del DNA. El patrón de metilación del DNA se hereda fielmente de la molécula de DNA madre a las hijas durante la fase S del ciclo celular tras cada división celular gracias a la enzima DNMT1^{82,224–226}. Además de determinar el patrón de expresión génica, la metilación del DNA desempeña un papel relevante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma^{156,227,228}, y participa en el *splicing*^{55,56}, siendo DNMT1 esencial para la proliferación y supervivencia celular¹⁴⁸. Es por ello que los niveles de DNMT1 están controlados por múltiples mecanismos, principalmente interacciones alostéricas y modificaciones postraduccionales^{108,123}.

En conjunto, nuestros resultados previos demuestran que SLU7 controla la expresión génica a diferentes niveles. Además, observamos un paralelismo entre las funciones controladas por SLU7 y la enzima responsable del mantenimiento de la metilación del DNA, DNMT1. Por ello, nuestra hipótesis de trabajo es la existencia de

una relación entre SLU7 y DNMT1, que suponga la participación de SLU7 en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético, en concreto a nivel de la metilación del DNA. De esta forma nuestra hipótesis plantea que SLU7 es un factor pleiotrópico que regula la expresión génica a muy distintos niveles, siendo esencial para la identidad hepática y la proliferación celular.

OBJETIVOS

1. Estudiar el papel de SLU7 en la regulación de la metilación del DNA tanto en células sanas como en células transformadas.
2. Estudiar el papel de SLU7 en la regulación de la expresión y la función de DNMT1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

1.1. Líneas celulares

Todas las líneas celulares humanas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*), excepto la línea celular HCT116 *DNMT1*^{-/-} que fue cedida por el Dr. Rob M. Ewing (Southampton, UK)²²⁹. Cada línea celular fue mantenida en el medio de cultivo apropiado, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS; 10270-106), 1 % de glutamina y 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomina; 10378-016). En concreto, las líneas celulares de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 y HepG2, la línea celular de carcinoma cervical humano HeLa, la línea celular de melanoma humano A375 y la línea derivada de riñón embrionario humano HEK293T fueron mantenidas en medio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*; 41966-029). Las líneas celulares de cáncer de pulmón H358 y A549 se mantuvieron en medio RPMI (*Rosswell Park Memorial Institute*; 61870-010). La línea celular de cáncer de colon HCT116 y la línea mutante HCT116 *DNMT1*^{-/-} se mantuvieron en medio McCoy's 5A (16600-082). La línea celular de cáncer de mama MCF7 se mantuvo en medio MEM (*Minimal Essential Medium*; 11095-080). Por último, la línea celular de glioblastoma U87 se mantuvo en medio DMEM/F12 (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium/F12*; 11320-033). Cuando las células llegaban al 90 % de confluencia eran sembradas a menor densidad para su mantenimiento y/o expansión o para realizar los experimentos planificados. Para ello, las células eran lavadas con tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS; 14190-094) y levantadas con tripsina (*Trypsin-EDTA* 0,05 %; 25300-054). Para llevar a cabo los experimentos, se sembraron 150.000 células PLC/PRF/5 y HeLa, 170.000 células A549, HCT116 y U87, 180.000 células A375, 200.000 células MCF7 y HCT116 *DNMT1*^{-/-} y 250.000 células HepG2, HEK293T y H358 por pocillo en placas de 6 pocillos (9,6 cm²) o 1x10⁶ – 1,5x10⁶ células en placas de 100 mm (56,7 cm²) en los correspondientes medios de cultivos. Las células se mantuvieron en un incubador (Thermo Forma *Steri-Cycle CO₂ Incubator*) a 37 °C y 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda.

Los medios de cultivo, el FBS, la glutamina, los antibióticos, el DPBS y la tripsina proceden de Gibco (Waltham, MA, EEUU). El material de cultivo de Costar/Corning (Corning, NY, EEUU) y Sarstedt (Newton, NC, EEUU).

1.2. Tratamientos *In vitro*

Cuando aparece indicado, las células fueron tratadas antes de procesar el extracto celular con el inhibidor del proteasoma MG-132 (474790; Calbiochem, CA, EEUU) a una concentración de 10 μ M durante las últimas 20 horas o a una concentración de 20 μ M durante las últimas 12 horas del ensayo; con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX) (C-7698; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 10 μ g/ml durante las últimas 8 y 12 horas del ensayo; con los inhibidores del ciclo celular lovastatina (PHR1285; Sigma- Aldrich) a una concentración de 20 μ M durante 60 horas sincronizando las células en la fase G1 del ciclo celular, afidicolina (A078; Sigma- Aldrich) a una concentración de 2 μ g/ml durante 60 horas sincronizando las células en la fase S del ciclo celular y nocodazol (M1404; Sigma- Aldrich) a una concentración de 330 nM durante 12 o 60 horas sincronizando las células en la fase G2/M del ciclo celular; o con el agente desmetilante 5'-aza-2-deoxicitidina (DAC) (A3656; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) a una concentración de 10 μ M durante 7 días, reponiéndose la droga cada día.

La concentración y el tiempo de tratamiento aparecen además indicados en cada experimento. En todos los casos, las células control fueron tratadas con el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO).

1.3. Transfección transitoria de células

1.3.1. siRNAs (RNAs de interferencia pequeños o “*small interfering RNAs*”)

Para el silenciamiento de las líneas celulares humanas, utilizamos como reactivo de transfección Lipofectamina RNAiMax (13778075; Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y siRNAs específicos sintetizados por Sigma-Aldrich. El siRNA control se denomina siGL.

Para silenciar SLU7 de manera rutinaria se utilizó un siRNA al que denominamos siSLU7-2. El siSLU7-1 solamente se utilizó para corroborar la especificidad de los resultados obtenidos en las células silenciadas con el siSLU7-2. Para silenciar G9a y UHRF1 se utilizó una mezcla de 4 y 3 siRNAs independientes respectivamente. Las secuencias concretas de cada siRNA son las siguientes:

Gen	siRNA	Secuencia
Luciferasa	siGL	CGTACGCGGAATACTTCGA
SLU7	siSLU7-1	GGATGAAGATAAATATGCA
SLU7	siSLU7(-2)	GAATCCAGATGAAGTGAGT
DNMT1	siDNMT1	GCACCTCATTTGCCGAATA
DNMT3B	siDNMT3B	CCATTCGAGTCCTGTCATT
HDAC1	siHDAC1	CTAATGAGCTTCCATACAA
G9a	siG9a-A	GGACCUUCAUCUGCGAGUA
G9a	siG9a-B	GAACAUCGAUCGCAACAUC
G9a	siG9a-C	GGAGGUAGCCCGUUACAUG
G9a	siG9a-D	GGAGAGGUGUACUGCAUAG
UHRF1	siUHRF1-B	TCTCAACTGCTTTGCTCCCATCAAT
UHRF1	siUHRF1-C	GCCAGGTGGTCATGCTCAACTACAA
UHRF1	siUHRF1-D	GGAGGAGGACGTCATTTACCA

Las células se transfectaron utilizando 3 μ l por pocillo de placa de 6 o 15 μ l por placa de 100 mm del reactivo Lipofectamina RNAiMax con los oligonucleótidos siRNA específicos para cada ensayo y con el siRNA control (siGL) a una concentración de 75 nM en las transfecciones individuales y 56,25 nM en las co-transfecciones. El medio de transfección utilizado fue Opti-MEM (31985-047; Gibco) al 10 % de FBS y sin antibióticos. A las 4-6 horas de la transfección se cambió al medio de cultivo correspondiente para cada tipo celular.

Las células se utilizaron en diferentes ensayos y se recogieron a las 24, 36, 48 o 72 horas de la transfección.

1.3.2. Plásmidos

Todos los vectores de expresión utilizados se produjeron transformando bacterias competentes *E.coli* y creciéndolas en LB Broth (L3022; Sigma-Aldrich) en condiciones estériles y a 37 °C en agitación durante toda la noche. Los plásmidos se purificaron mediante el kit *Endofree Plasmid Maxi Kit* de Qiagen (12391; Hilden, Alemania). La concentración de los plásmidos se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

El vector de expresión SLU7 fue producido por GenScript BioTech (Piscataway, NJ, EEUU) y el vector HDAC1-Flag fue cedido por el Dr. Donald E. Ayer (University of Utah, EEUU). Como vector control se utilizó pcDNA6A y pcDNA3.1 respectivamente.

Las distintas líneas celulares se transfectaron utilizando 1,5 µl/pocillo de placa de 6 del reactivo Lipofectamina 2000 (11668027; Invitrogene) con 1,0 - 1,8 µg/pocillo de placa de 6 del plásmido de estudio o el correspondiente plásmido control. El medio de transfección utilizado fue Opti-MEM al 10 % de FBS y sin antibióticos. A las 4-6 horas de la transfección se cambió al medio de cultivo correspondiente para cada tipo celular.

A las 36 o 48 horas de la transfección las células se recogieron para continuar con el análisis correspondiente especificado en el apartado de resultados.

2. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA genómico (gDNA) se realizó siguiendo el protocolo del kit *Maxwell RSC cultured cells DNA kit* (AS1620; Promega) en el equipo Maxwell® de Promega (Madison, WI, EEUU). Brevemente, previa a la extracción, el pellet celular se resuspendió en el tampón de lisis (Promega) y se incubó a 56 °C durante 20 minutos con proteinasa K (Promega). A continuación, cada muestra se cargó en el cartucho correspondiente para la extracción automatizada del gDNA.

La concentración y calidad del DNA se evaluó mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Todas las muestras de DNA obtenidas se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL DNA

3.1. Tratamiento con bisulfito

El tratamiento del DNA con bisulfito sódico desamina las citosinas no metiladas, convirtiéndolas en uracilos, sin modificar las citosinas metiladas. Por lo tanto, este tratamiento convierte un fenómeno epigenético en una diferencia genética que puede ser analizada por diferentes técnicas (Figura 12).

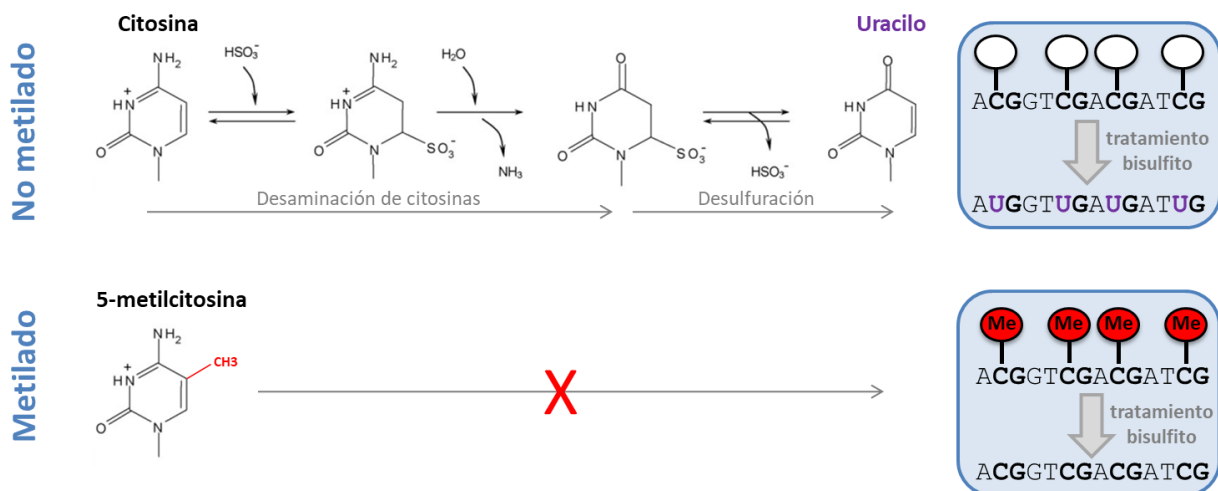


Figura 12. Representación esquemática de la reacción que tiene lugar al tratar el DNA metilado y no metilado con bisulfito sódico.

Este tratamiento se llevó a cabo utilizando el kit *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (D5005; Zymo Research Company, CA, EEUU), siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, $1\text{ }\mu\text{g}$ de gDNA se mezcló con el tampón de conversión y se incubó durante 10 minutos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de 2,5 horas a $64\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, el DNA convertido fue cargado en columnas comerciales, donde tras realizar sucesivos lavados, fue eluido.

3.2. Secuenciación por Representación Reducida tras Tratamiento con Bisulfito (*Reduced Representation Bisulfite Sequencing; RRBS*)

La secuenciación reducida tras tratamiento con bisulfito es una técnica que permite evaluar el patrón de metilación de alrededor de 5 millones de CpGs a nivel individual²³⁰. Se trata de una variación de la secuenciación de todo el genoma tras tratamiento con bisulfito que utiliza la digestión con enzimas de restricción y la selección del tamaño del DNA para así centrar el análisis de metilación en una fracción reducida del genoma, en la que se incluyen la mayoría de los promotores e islas CpGs. Dicho análisis fue realizado con la compañía *Active Motif* (Carlsbad, CA, EEUU).

Para ello, se preparó 1 µg de gDNA de células PLC/PRF/5 transfectadas durante 72 horas con siGL, siSLU7, siDNMT1 y siDNMT1+siDNMT3B y se envió a *Active Motif*, tras haberse confirmado el correcto silenciamiento de SLU7, DNMT1 y DNMT3B en las muestras correspondientes de RNA mensajero (mRNA) y proteína.

Brevemente, el protocolo seguido por la empresa fue el siguiente (Figura 13): el DNA fue digerido con la enzima de restricción MspI (insensible a la metilación) que escinde el DNA en los sitios CCGG creando fragmentos de 40-220 pares de bases con alto contenido en CpGs. A continuación, los extremos de los fragmentos fueron reparados y ligados con adaptadores, cargados en un gel de agarosa y aislados para su conversión con bisulfito. Tras el tratamiento con bisulfito, el DNA se amplificó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y se sometió a la secuenciación en el instrumento Illumina HiSeq™. Una vez completada la secuenciación, se procedió al análisis bioinformático. Las lecturas fueron mapeadas en el genoma humano de referencia hg38. El análisis de metilación diferencial se generó utilizando DMAP²³¹. Las regiones resultantes se anotaron con el paquete de software HOMER. Los análisis posteriores sólo incluyen las CpGs cubiertas por 3 o más lecturas. A continuación, se aplicó la prueba de Chi-cuadrado. El valor de metilación se conoce como β -value y oscila entre 0 y 1, siendo 0 cuando la citosina no está metilada y 1 cuando está metilada. Para cada CpG el valor de metilación será el ratio entre el número de moléculas metiladas y el total de moléculas analizadas. Los sitios CpG se consideraron diferencialmente metilados cuando la diferencia de metilación entre la muestra

siSLU7, siDNMT1 o siDNMT1+siDNMT3B comparada con la siGL fue superior a 0,6 o 0,4 y el β -value era menor de 0,3 en siSLU7, siDNMT1 o siDNMT1+siDNMTB y mayor de 0,7 en el control o viceversa. Las CpGs se localizaron dentro o fuera de una CGI utilizando el *bedfile* “CpG Island” descargado de UCSC Genome Browser (*website*; <https://genome.ucsc.edu/>).

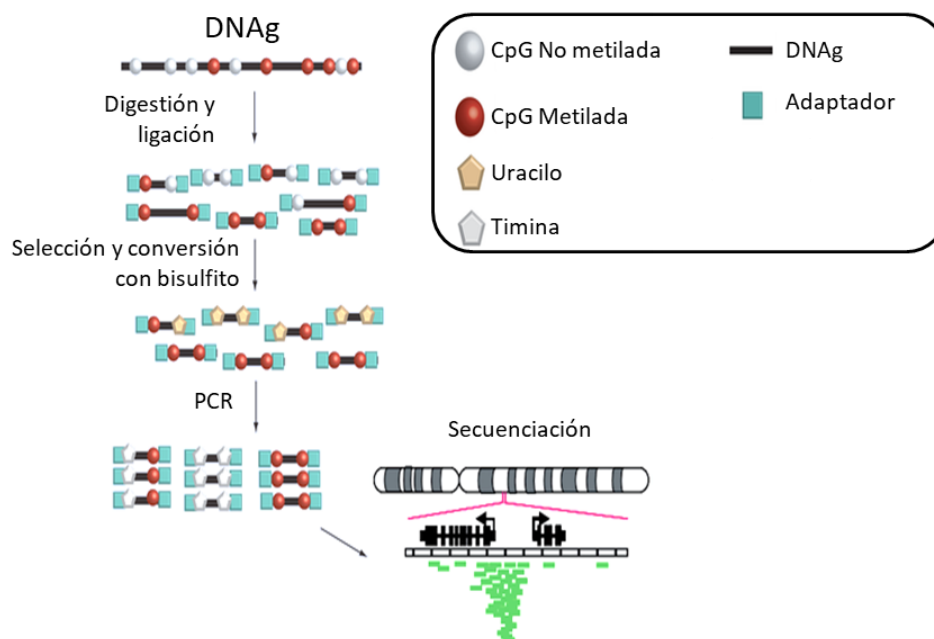


Figura 13. Esquema representativo del protocolo de la secuenciación masiva tras tratamiento con bisulfito (RRBS). Adaptación de Zuo T y col. *Epigenomics* (2009).

3.3. PCR específica de metilación (*Methylation Specific PCR; MSP*)

Para evaluar el estado de metilación de regiones concretas de los genes *TRIM47* (*tripartite motif containing 47*), *TFF3* (*trefoil factor*), *DLG3* (*discs large MAGUK scaffold protein 3*), *RASSF1A* (*ras-association domain family 1, isoform A*) y *GNMT* (*glycine-N-methyltransferase*) tras el silenciamiento de SLU7 y DNMT1 en distintas líneas celulares, se llevaron a cabo PCRs específicas de metilación. Se trata de una técnica no cuantitativa en la que, tras la conversión del DNA con bisulfito, se realizan dos reacciones de PCR independientes, con dos parejas de cebadores diseñadas para

reconocer la secuencia de interés en el estado metilado (M) y no metilado (U) respectivamente.

Para la realización de las PCRs se utilizaron 100 ng de DNA convertido, el kit *Phusion U Hot Start DNA Polymerase kit* (F-555S; Thermo Fisher Scientific) que contenía la enzima específica (*U-Phusion*), el tampón de reacción y DMSO, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs; 11814 362 001; Roche) y los cebadores específicos para amplificar la región diana metilada (M) o no metilada (U). Los cebadores utilizados se detallan en el anexo 1.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes, variando para cada PCR específica la temperatura de hibridación (anexo 1).

Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	} 40 Ciclos
	98 °C	30 seg	
Desnaturalización en cada ciclo	98 °C	10 seg	
Hibridación	X °C	20 seg	
Extensión	72 °C	15 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Los productos de PCR se separaron en un gel al 2 % de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) teñido con *GelRed Nucleic Acid* (41003; Biotium, Fremont, CA). Se utilizó el marcador de peso molecular *TrackIt™ 100 bp DNA Ladder* (Invitrogen) y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV).

3.4. Cuantificación global de la metilación del DNA por ELISA

Para cuantificar de manera global los niveles de 5-mC se utilizó el kit *MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric)* (P-1030; Epigentek, Farmingdale, NY, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 200 ng de gDNA se desnaturalizaron durante 5 minutos a 98 °C. A continuación, se añadió el tampón de unión y la muestra de DNA desnaturalizado en la placa ELISA y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación, se retiró el tampón y se hicieron tres lavados antes de añadir el anticuerpo frente a 5-mC que se incubó durante 1 hora a

temperatura ambiente. Tras realizar sucesivos lavados, la absorbancia (abs) a 450 nm de cada muestra y de la recta patrón preparada fue leída en un lector de placas. Con los datos de la recta patrón y utilizando la siguiente fórmula se calcularon los porcentajes de 5-mC de cada muestra.

$$5 - mC \% \text{ de la muestra} = \frac{\text{abs muestra} - \text{abs blanco}}{\text{pendiente} \times \text{cantidad de DNA}} \times 100 \%$$

3.5. Inmunofluorescencia

Los niveles globales de metilación del DNA también fueron evaluados mediante detección por inmunofluorescencia de la molécula 5-mC y el marcaje del DNA con DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) en las células PLC/PRF/5 y HepG2 a las 72 horas del silenciamiento de SLU7. Para estos experimentos, las células fueron sembradas sobre cubres en placas de 6 pocillos. Tras 72 horas de silenciamiento con siGL y siSLU7, las células se fijaron con metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con DPBS. A continuación, la autofluorescencia de las células se bloqueó con 500 μ l de NH_4Cl 50 mM en DPBS durante 10 minutos. Tras el lavado, se procedió a realizar un tratamiento de permeabilización celular con 0,2 % Triton X-100 durante 5 minutos a 4 °C seguido de una desnaturalización del DNA con dos tratamientos, en primer lugar, con HCl 4 M durante 15 minutos y a continuación con Tris-HCl pH 8,5 100 mM durante 10 minutos. Tras los sucesivos lavados, las muestras se bloquearon con 500 μ l de tampón *Superblocking*[®] 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-5-mC (BI-MECY 0100; Eurogentec, Seraing, Bélgica) a una dilución 1/2000 en DPBS al 1 % BSA (albúmina sérica bovina) 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 (anti-ratón AlexaFluor 488; Thermo Fisher Scientific) marcado con el fluorocromo AlexaFluor 488 a una dilución 1/1000 en DPBS al 1 % de BSA durante una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. El marcaje de DNA se realizó con DAPI incorporado en el medio de montaje final (Vectashield; Vector

laboratorios, Burlingame, CA, EEUU). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio automatizado Zeiss Axio Imager.M1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

4. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

4.1. Extracción de RNA

El RNA total de las células y muestras de tejido se aisló siguiendo el protocolo del kit *Maxwell RSC simply RNA Tissue* (AS1340; Promega) en el equipo Maxwell® de Promega, el cual incluye el tratamiento final con DNasa (Desoxirribonucleasa) para eliminar los posibles restos de gDNA contaminante. Brevemente, el pellet celular o las muestras de tejido congelado se homogeneizaron con 200 µl de tampón de homogeneización (Promega) y se añadió a cada muestra 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 espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Todas las muestras de RNA obtenidas se almacenaron a -80 °C.

4.2. Retrotranscripción (RT)

Todos los reactivos utilizados son de Invitrogen excepto los cebadores aleatorios y los dNTPs que son de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

Partiendo de 1 µg de RNA, se realizó un tratamiento de DNasa I (18068-015), durante 20 minutos a 37 °C, adicional al incluido en el sistema de extracción de Promega para asegurar la eliminación del posible gDNA presente en la muestra. A continuación, se realizó un tratamiento con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Y02353) para prevenir la acción de enzimas nucleasas sobre nuestro RNA. Seguidamente, se desnaturalizaron las muestras a 90 °C durante 1 minuto y se procedió a la retrotranscripción del RNA a DNA complementario (cDNA) durante 1

hora a 37 °C con la enzima transcriptasa inversa M-MLV (28025-013), junto con su tampón de reacción, ditioneitol (DTT), e inhibidores de RNasa (Ribonucleasas) (RNase OUT; 100000840), cebadores aleatorios (*random primers*; 11034731001) y dNTPs.

Todos los cDNA obtenidos se conservaron a -20 °C.

5. PCR CONVENCIONAL Y PCR A TIEMPO REAL

5.1. PCR convencional

Para analizar el efecto del silenciamiento de SLU7 en el patrón de expresión del mRNA de *DNMT1*, se realizó una PCR con parejas de cebadores que hibridan en los exones 1 y 17, permitiéndonos identificar por el tamaño de los fragmentos amplificados la generación de distintas isoformas mediante *splicing* alternativo.

Del mismo modo, para verificar la delección de los exones 2-5 del mRNA de *DNMT1* en las células HCT116 *DNMT1*^{-/-} 229,232, se realizaron PCRs con parejas de cebadores que hibridan en distintos exones (1-17; 2-6; 13-17).

Las PCRs se realizaron partiendo de muestras de cDNA, junto con el kit de la enzima DNA polimerasa Inmolasa (BIO-21047; Meridian Bioscience, Heidelberg Germany) que contenía la enzima, el tampón de reacción y MgCl₂, los dNTPs (Roche) y los cebadores específicos para cada reacción siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las condiciones generales de las reacciones fueron las siguientes, variando para cada gen la temperatura de hibridación, el tiempo de extensión y el número de ciclos realizados. Los cebadores y la temperatura de hibridación utilizadas se detallan en el anexo 1.

Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	} 30-40 ciclos
Desnaturalización en cada ciclo	95 °C	30 seg	
Hibridación	X °C	30 seg	
Extensión	72 °C	15-30 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa, cuyo porcentaje varió según el tamaño del producto de PCR (1 % o 2%), teñido con el intercalante de DNA SYBR® *Safe DNA gel stain* (Invitrogen). Se utilizó el marcador de peso molecular *TrackIt™ 100 bp DNA Ladder* y las bandas se visualizaron bajo luz UV.

5.2. 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* (#1708880) de la misma casa comercial. La especificidad de los productos amplificados se verificó mediante el análisis de la curva de disociación o *melting*. Así, para asegurar en cada PCR la especificidad de la cuantificación, en cada ciclo, la emisión de fluorescencia se midió 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 control de expresión constitutiva el de la proteína ribosomal RPLP0 (*ribosomal protein lateral stalk subunit P0*), 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 y su temperatura de hibridación se detallan en el anexo 1:

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	X °C	10 seg	
Curva de <i>melting</i>	De 70 °C a 99,5 °C en intervalos de 0,5 °C (60x)		

6. EXTRACCIÓN DE PROTEINAS

6.1. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de las proteínas derivadas de las líneas celulares, se resuspendió el pellet celular previamente lavado en un volumen de tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris pH 7,5 50 mM, SDS 0,1 %, Tritón X-100 1 %, deoxicolato sódico 0,5 %) acorde a la concentración de células en cada muestra junto con una mezcla de inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico, 10 mM fluoruro sódico y 100 mM β -glucerofosfato, de Sigma-Aldrich) y un cóctel de inhibidores de proteasas (20 mM *Complete cocktail* de Roche). Las muestras se sonicaron durante 30 segundos a alta intensidad en el sonicador de Diagenode (Liège, Bélgica) y se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes para la posterior cuantificación de la concentración de proteínas mediante el método de ácido bicinonínico (BCA) de Sigma-Aldrich (B9643) respecto de una curva estándar de BSA.

La extracción de proteínas de tejido hepático se realizó a partir de aproximadamente 50 mg de hígado homogeneizado en tampón de urea (urea 7 M, tiourea 1,97 M, CHAPS 65 nM y DTT 6 mg/ml). El homogeneizado se ultracentrifugó (ultracentrífuga Optima *TLX Ultracentrifuge* de Beckman) durante 45 minutos a 75.000 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.

6.2. Fraccionamiento subcelular

Este protocolo se realiza para separar las fracciones de citoplasma, nucleoplasma y fracción unida a la cromatina. Se utilizó el kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (#78835; Thermo Fisher Scientific) para separar el núcleo del citoplasma y a continuación partiendo del núcleo se procedió a separar el nucleoplasma de la fracción unida a la cromatina. En primer lugar, el pellet celular previamente lavado se resuspendió en un volumen de tampón CER I acorde a la concentración de células de cada muestra junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa. A continuación, se incubó en hielo durante 10 minutos y se añadió el

volumen correspondiente de tampón CER II incubando la muestra 1 minuto en hielo. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm y 4 °C, quedando en el sobrenadante el extracto citoplasmático y en el pellet el extracto nuclear. Este se incubó en tampón NP40 (Tris HCl pH 7,4 15 mM, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, MgCl₂ 1 mM, Glicerol 10 %, NP40 0,1 %) con inhibidores de proteasas y fosfatasa durante 30 minutos a 4 °C en agitación rotatoria. Para separar el nucleoplasma y la fracción unida a cromatina se realizó una centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos y 4 °C quedando en el sobrenadante el nucleoplasma y como pellet la fracción unida a cromatina. A continuación, se trató la fracción unida a cromatina con 250 U/μl de benzonasa (Sigma-Aldrich; E8263) en un tampón compuesto por Tris HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 60 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NP40 0,1 % e inhibidores de proteasas y fosfatasa a 4 °C durante 30 minutos, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para quedarnos con el sobrenadante. Las proteínas obtenidas en cada fracción fueron después cuantificadas por el método BCA y utilizadas para el correspondiente análisis por *Western blot* o inmunoprecipitación.

6.3. Extracción de histonas

La extracción de las histonas se llevó a cabo con un protocolo específico para el aislamiento de esta familia de proteínas. El pellet celular se resuspendió en un tampón compuesto por Tris-HCl pH 7,4 10 mM, NaCl 10 mM y MgCl₂ 3 mM y se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. De nuevo el pellet se resuspendió en el tampón anterior añadiendo 0,5 % de NP40 y se incubó en hielo durante 10 minutos en agitación suave. El núcleo celular se aisló por centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendió e incubó durante 30 minutos en MgCl₂ 5 mM y HCl 0,8 M. A continuación, la muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para quedarnos con el sobrenadante, que fue transferido a un tubo límpido donde se añadió 50 % de TCA (ácido tricloroacético) para precipitar las histonas. Tras lavar el pellet con acetona, fue secado al aire y resuspendido en Tris-HCl pH 7,5 100 mM, EDTA 1 mM y SDS 1 %. Se determinó la concentración de histonas mediante el método de BCA.

6.4. Cuantificación de proteínas

6.4.1. Método del ácido bicinconínico (BCA)

La cuantificación de proteínas derivadas de líneas celulares se llevó a cabo por el método del ácido bicinconínico y cobre (II) en relación 50:1 (Sigma). Este consiste en la reducción de cobre (II) en un medio alcalino y la detección de cobre (I). Se sometieron las muestras a una dilución 1:5 y se realizó una curva patrón con concentración conocida usando BSA como referencia. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm. Con los resultados de absorbancia obtenidos y la concentración conocida de BSA, se generó una curva estándar para extrapolar la absorbancia y calcular la concentración de proteína en cada muestra.

6.4.2. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas derivadas de tejido hepático se llevó a cabo por un método colorimétrico comercial (5000002; BioRad Protein Assay), basado en el método de Bradford. Este consiste en la cuantificación de la unión del colorante azul brillante de *Coomassie* a las proteínas en estudio. Las muestras se sometieron a una dilución 1:20 y se realizó una curva patrón con concentración conocida de BSA como referencia. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 570 nm. Con los resultados de absorbancia obtenidos y la concentración conocida de BSA, se generó una curva estándar para extrapolar la absorbancia y calcular la concentración de proteína en cada muestra.

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

7. ENSAYOS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y SUS INTERACCIONES

7.1. Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

7.1.1. Electroforesis y *Western blot*

Las proteínas se detectaron por la técnica de *Western Blot*. A 25 µg de extracto proteico se añadió 4 µl del tampón de carga Laemmli 5X (Tris pH 6,8 50 mM, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,01 %) y se completó con el tampón de extracción correspondiente hasta un volumen final de 20 µL.

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

A continuación, se realizó la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa de Amersham™Protran™ (GE Healthcare) de poro 0,45 µm utilizando el tampón de transferencia compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 % aplicando un voltaje constante de 120 V durante 45-90 minutos dependiendo del tamaño de la proteína y a 4 °C.

7.1.2. Inmunodetección

Tras la transferencia, se procedió al bloqueo de la membrana de nitrocelulosa durante una hora a temperatura ambiente en TBS-T (Tris pH 7,5 25 mM, NaCl 200 mM (TBS) y Tween 0,1 %) al 5 % de leche o BSA, dependiendo de la proteína a detectar, con el fin de bloquear los puntos de unión inespecíficos a la membrana. A continuación, la membrana se incubó en agitación durante toda la noche a 4 °C con el correspondiente anticuerpo primario diluido en TBS-T al 5 % de leche o BSA a la concentración indicada por el proveedor. A la mañana siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con

TBS-T para eliminar el anticuerpo primario no unido a la proteína diana y se incubó con el anticuerpo secundario a una dilución 1/6.000 en TBS-T al 5 % de leche o BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y un lavado con TBS antes de proceder al revelado. El revelado de las membranas se realizó con el kit de quimioluminiscencia *Western Lightning-ECL* de Perkin Elmer Inc. (NEL104001EA; Waltham, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante en el equipo ChemiDoc MP (Biorad). Los anticuerpos utilizados se detallan en el anexo 2.

7.2. Inmunoprecipitación

Para analizar la posible interacción entre SLU7 y DNMT1, la interacción de estos con G9a, UHRF1 y HDAC1 y la acetilación de DNMT1 tras el silenciamiento de SLU7, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando diferentes anticuerpos, detallados en el anexo 2.

Las células se recogieron en DPBS y tras una centrifugación a 4.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el pellet celular se resuspendió en el tampón de co-IP (Tris HCl pH 8 20 mM, NaCl 137 mM, NP-40 1 % y EDTA 2 mM) con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se incubaron durante 30 minutos en agitación orbital a 4 °C y después se centrifugaron durante 20 minutos a 1.200 rpm, para quedarnos con el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron por BCA y se prepararon 800-1.000 µg de proteína para cada condición en un volumen final de 300 µl de tampón de co-IP, que se incubaron con 25 µl de bolas magnéticas *Dynabeads* proteína G (Invitrogene) en rotación a 4 °C durante 2 horas. En paralelo se prepararon las bolas magnéticas con los anticuerpos de interés. Para ello 25 µL de *Dynabead* se lavaron 3 veces con 250 µL de tampón citrato-fosfato pH 5 con Tween 0,01 % y posteriormente se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en rotación suave en el orbital con 5 µg del anticuerpo correspondiente o del control IgG en tampón citrato fosfato pH 5. Finalmente, las *Dynabeads* con los anticuerpos se lavaron de nuevo y se incubaron a 4 °C con la muestra preclareada durante toda la noche en rotación suave en el orbital. A la mañana siguiente las bolas magnéticas se lavaron 3 veces con DPBS 1X con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se resuspendieron en 50

µl de tampón de carga 1X (Tris pH 6,8 50 mM, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,01 %). Se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y con la ayuda de un imán separamos las *Dynabeads* de la muestra que se utilizó para realizar el correspondiente análisis por *Western blot*.

8. ENSAYOS *IN VIVO*

Todos los animales utilizados recibieron cuidados humanitarios según los criterios de la "Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio" creada por la Academia Nacional de Ciencias y publicada por el Instituto Nacional de Salud (publicación NIH 86-23 revisada en 1985). Los protocolos fueron aprobados y realizados de acuerdo con las directrices del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Navarra (CEEA-062/16) y del Gobierno de Navarra (GN2016/325511) (Pamplona, España).

Se utilizaron ratones macho C57BL/6J de 8 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.

Durante los experimentos los animales fueron alimentados con dieta regular.

8.1. Producción de los virus adenoasociados (AAV)

Los experimentos en animales se realizaron modulando la expresión de SLU7 en el ratón utilizando la estrategia de los AAV desarrollados en nuestro laboratorio que modulan la expresión de SLU7 específicamente en el hepatocito. Estos virus se diseñaron, produjeron y purificaron en un proyecto anterior^{193,233,234}.

8.2. Silenciamiento de la expresión de SLU7 *in vivo*

El silenciamiento *in vivo* de SLU7 en el hígado se realizó mediante AAV-shSLU7. La dosis del correspondiente AAV (Renilla y shSLU7) 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 de hepatectomía parcial (HP) e inducción de daño hepático se realizaron a los 15-21 días tras la inyección de los AAVs.

8.3. Modelo de regeneración hepática tras hepatectomía parcial (HP)

Se realizó un modelo de regeneración hepática tras HP de dos tercios del hígado utilizando el protocolo previamente descrito²³⁵ en ratones control (AAV-Renilla) y en ratones a los que se les había silenciado la expresión de SLU7 en los hepatocitos (AAV-shSLU7) (Figura 14). 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 resecaados. El grupo control (SHAM) fue sometido al mismo proceso sin ligación y resección de la masa hepática.

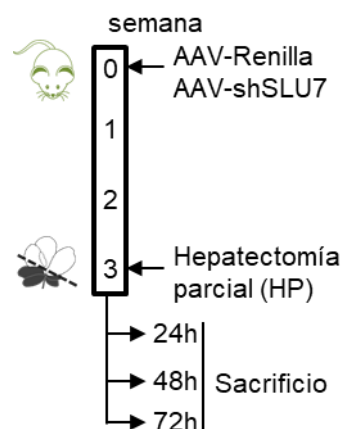


Figura 14. Representación esquemática del modelo de hepatectomía parcial (HP) de 2/3 realizada en ratones control (AAV-Ren) y ratones silenciados de SLU7 de manera hepatoespecífica (AAV-shSLU7).

Se sacrificaron los animales a las 24, 48 y 72 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 que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA y proteínas.

8.4. Modelo de daño hepático agudo y crónico tras tratamiento con tetracloruro (CCl₄)

Se realizó un modelo de daño agudo y un modelo de daño crónico hepático tras tratamiento con el hepatotóxico CCl₄. A los ratones se les inyectó de manera intraperitoneal una mezcla 1:1 de CCl₄ y aceite de maíz (0,6 µL CCl₄/g peso corporal) dos veces a la semana durante una semana, en el caso de daño agudo (Figura 15A) y durante 5 semanas en caso de daño crónico (Figura 15B)^{216,236}.

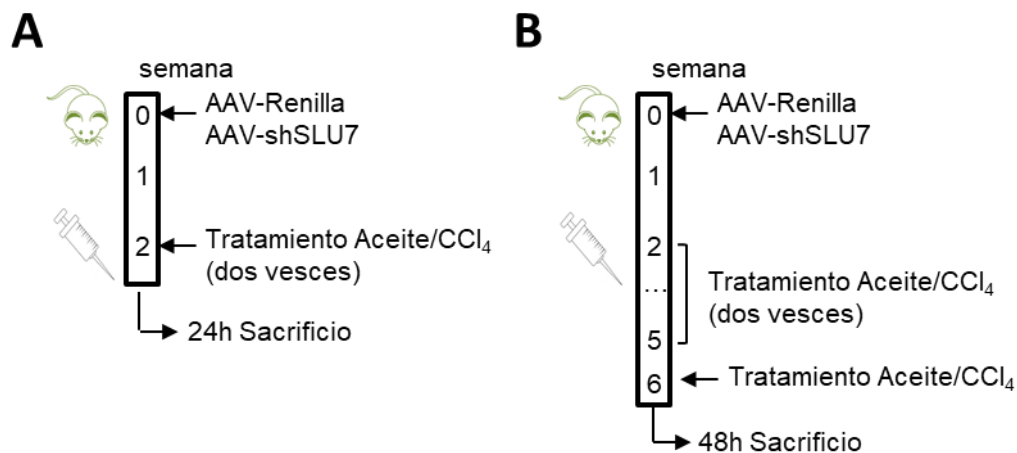


Figura 15. Representación esquemática de los modelos de daño hepático. Modelos *in vivo* de daño hepático agudo (A) y crónico (B) inducido por la administración de CCl₄ en ratones control (AAV-Ren) y ratones silenciados de SLU7 de manera hepatoespecífica (AAV-shSLU7). El vehículo (aceite) se administró como control. A los ratones se les inyectó CCl₄ o aceite dos veces por semana durante 1 semana (agudo) o durante 5 semanas (crónico) antes del sacrificio y la recogida de muestras de hígado.

Los animales se sacrificaron a las 24 horas de la última inyección en el modelo de daño agudo y a las 48 horas en el modelo de daño crónico. Se recogió una muestra de hígado de cada ratón que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA y proteínas.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa *GraphPad Prism versión 9.3.1*. Los datos se representan como la media \pm SEM. Para estudiar la normalidad se utilizó el test *D'Agostino and Pearson*. Aquellos 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 Chi-cuadrado para analizar el RRBS. Se consideró un valor $p < 0,05$ como significativo. Las diferentes condiciones experimentales se estudiaron con duplicados biológicos y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

RESULTADOS

1. SLU7 ES NECESARIO PARA LA CORRECTA METILACIÓN DEL DNA

Estudios previos de nuestro laboratorio identificaron a SLU7 como esencial para el correcto mantenimiento del patrón de expresión génica en el hígado¹⁹³ controlando tanto mecanismos de *splicing*, como la actividad de complejos transcripcionales¹⁹³. Por otro lado, como se ha explicado en la introducción, está demostrada la estrecha conexión e interacción entre los diferentes mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica, incluyendo la metilación del DNA con la transcripción y el *splicing* alternativo. La metilación del DNA supone la adición de grupos metilo (CH₃) al carbono 5 de los residuos de citosina en los dinucleótidos CpG dando lugar al nucleótido 5-mC. Los dinucleótidos CpG generalmente se encuentran localizados en CGIs en las regiones promotoras de los genes, de forma que cuando están metiladas interfieren con la unión de los factores de transcripción, reprimiendo en este caso la transcripción génica¹. Recientemente se ha demostrado que la metilación de CpGs presentes en el cuerpo de los genes puede facilitar o interferir con la unión de factores que permiten o impiden la incorporación de exones, modulando por lo tanto el *splicing* alternativo^{56,60}.

En este contexto, y habiendo demostrado que SLU7 regula tanto el *splicing* como la transcripción, decidimos investigar si SLU7 también participa en la regulación de la metilación del DNA, representando un agente integrador de los diferentes mecanismos de regulación de la expresión génica.

1.1. El silenciamiento de SLU7 provoca una hipometilación general del DNA

En un primer momento decidimos estudiar si el silenciamiento de SLU7 tenía algún efecto sobre la metilación del DNA. Para ello primero determinamos, a través de un ensayo colorimétrico tipo ELISA, los niveles globales de 5-mC en células transformadas de distintos orígenes a las 72 horas tras el silenciamiento de SLU7. En concreto utilizamos dos líneas de hepatocarcinoma humano (PLC/PRF/5 y HepG2), una línea de cáncer de colon humano (HCT116) y una línea de cáncer de pulmón humano (H358).

La reducción de la expresión de SLU7 en las cuatro líneas transformadas (Figura 16A) resultó en una disminución significativa de los niveles globales de 5-mC comparado con las células control (siGL) (Figura 16B).

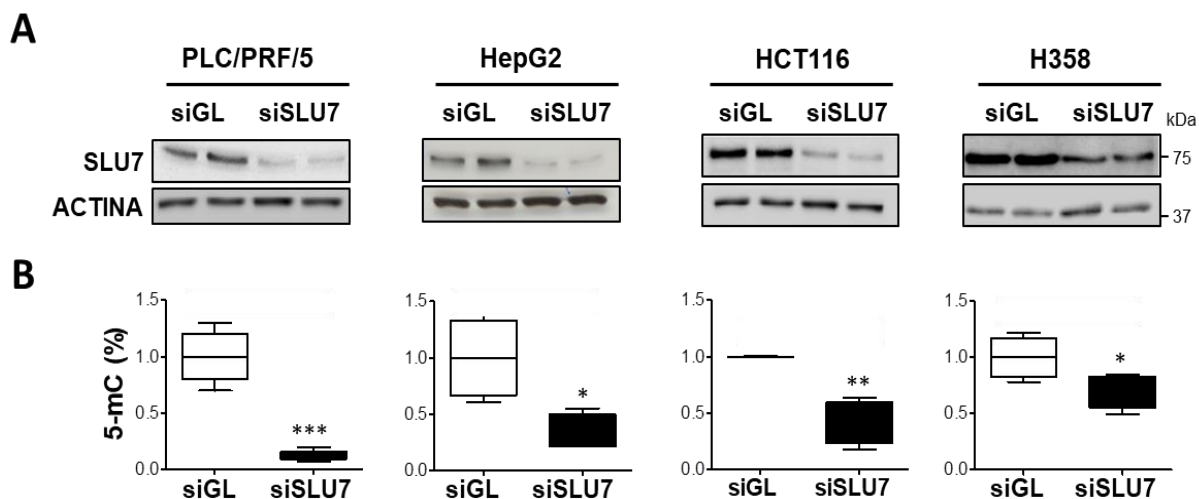


Figura 16. El silenciamiento de SLU7 provoca una caída de los niveles globales de 5-metilcitosina (5-mC). (A) Análisis por *Western blot* de la expresión de SLU7 y de actina como control de carga, tras las 72 horas de transfección con siGL o siSLU7 en células humanas de hepatocarcinoma (PLC/PRF/5 y HepG2), cáncer de colon (HCT116) y cáncer de pulmón (H358). (B) Análisis de los niveles de metilación global del DNA mediante ensayo colorimétrico tipo ELISA en las células representadas en el panel A. Los niveles de metilación global del DNA aparecen representados como % de 5-mC (5-metilcitosina) respecto al control siGL. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

La caída de los niveles globales de metilación del DNA tras el silenciamiento de SLU7 se confirmó mediante ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti 5-mC en las dos líneas de hepatocarcinoma PLC/PRF/5 y HepG2 (Figura 17).

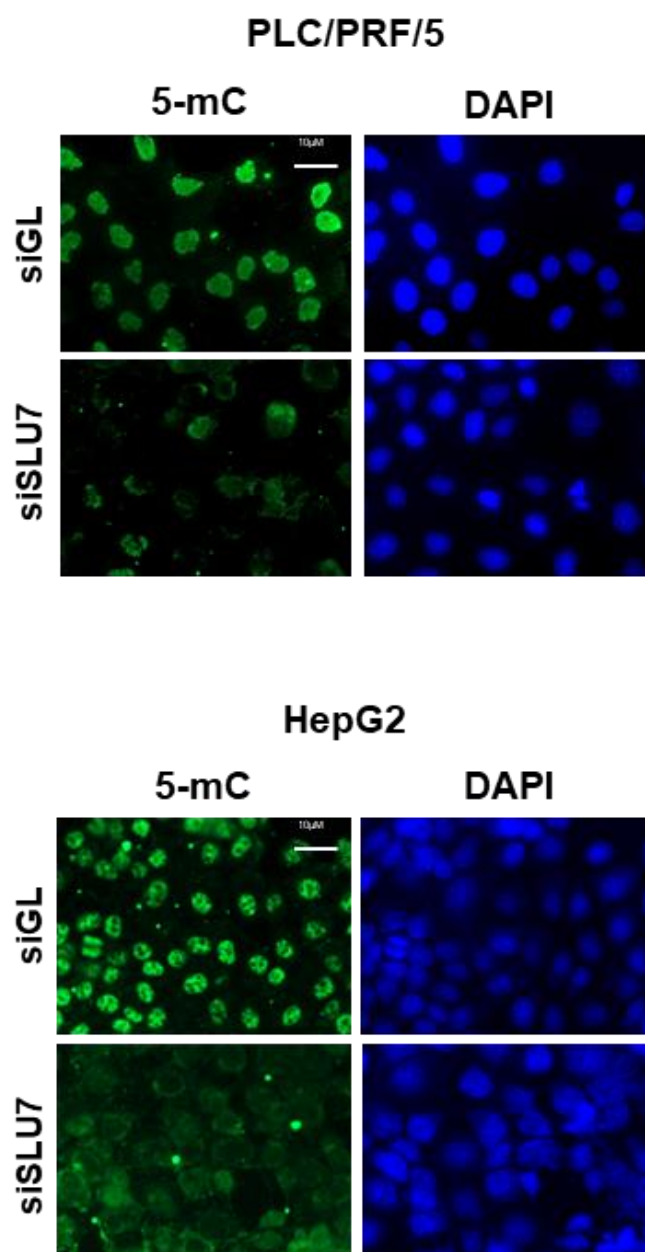


Figura 17. El silenciamiento de SLU7 disminuye los niveles de 5-mC detectados mediante inmunofluorescencia. Imágenes representativas de la inmunodetección de 5-metilcitosina (5-mC) (en verde) en células PLC/PRF/5 y HepG2 tras 72 horas de silenciamiento con siSLU7 o el control siGL. Los núcleos fueron marcados con DAPI (en azul). Escala: 10 μ m.

Estos resultados muestran que el silenciamiento de SLU7 provoca una hipometilación global del DNA en células transformadas de distintos orígenes, sugiriendo que SLU7 juega un papel en la metilación del DNA.

1.2. Caracterización de la hipometilación global provocada por el silenciamiento de la expresión de SLU7

Para caracterizar en mayor detalle el efecto del silenciamiento de SLU7 en la metilación global del DNA realizamos un ensayo de secuenciación reducida tras tratamiento con bisulfito (RRBS). Se trata de una técnica que permite conocer el nivel de metilación de alrededor de 5 millones de dinucleótidos CpGs del genoma. Los fragmentos secuenciados incluyen la mayoría de las CGIs y de los promotores.

Para la realización de este ensayo utilizamos las células PLC/PRF/5 tras 72 horas de silenciamiento con el siRNA siSLU7 o el control siGL. Además, en paralelo y como control positivo, se silenció en las células PLC/PRF/5 la expresión de la enzima encargada del mantenimiento de la metilación del DNA, DNMT1 (siDNMT1) durante 72 horas (Figura 18A). Todas las muestras de DNA obtenidas se enviaron a la compañía *Active Motif* para realizar el ensayo de RRBS.

En este ensayo, sólo se consideraron como distintas las diferencias de metilación mayores de 0,6 (como se indica en materiales y métodos, la escala de medición de metilación o β -value oscila entre 0 y 1). Así, el silenciamiento de SLU7 indujo la metilación aberrante de un total de 9.143 CpGs, mientras que el silenciamiento de DNMT1 de 13.128 CpGs (Figura 18B). Un análisis más exhaustivo reveló que de las 9.143 CpGs metiladas de manera aberrante tras 72 horas del silenciamiento de SLU7, un 62 % estaban hipometiladas, mientras que un 38 % estaban hipermetiladas (Figura 18C). Asimismo, observamos porcentajes similares en las células silenciadas para DNMT1, un 84 % de hipometilación y un 16 % de hipermetilación, (Figura 18C). La llamativa hipermetilación inducida tras el silenciamiento de DNMT1 está de acuerdo con otros estudios publicados en los que tanto la inhibición de la actividad de DNMT1¹⁴⁰ como su silenciamiento¹⁵⁰ inducen no solo hipometilación, sino también un porcentaje de hipermetilación.

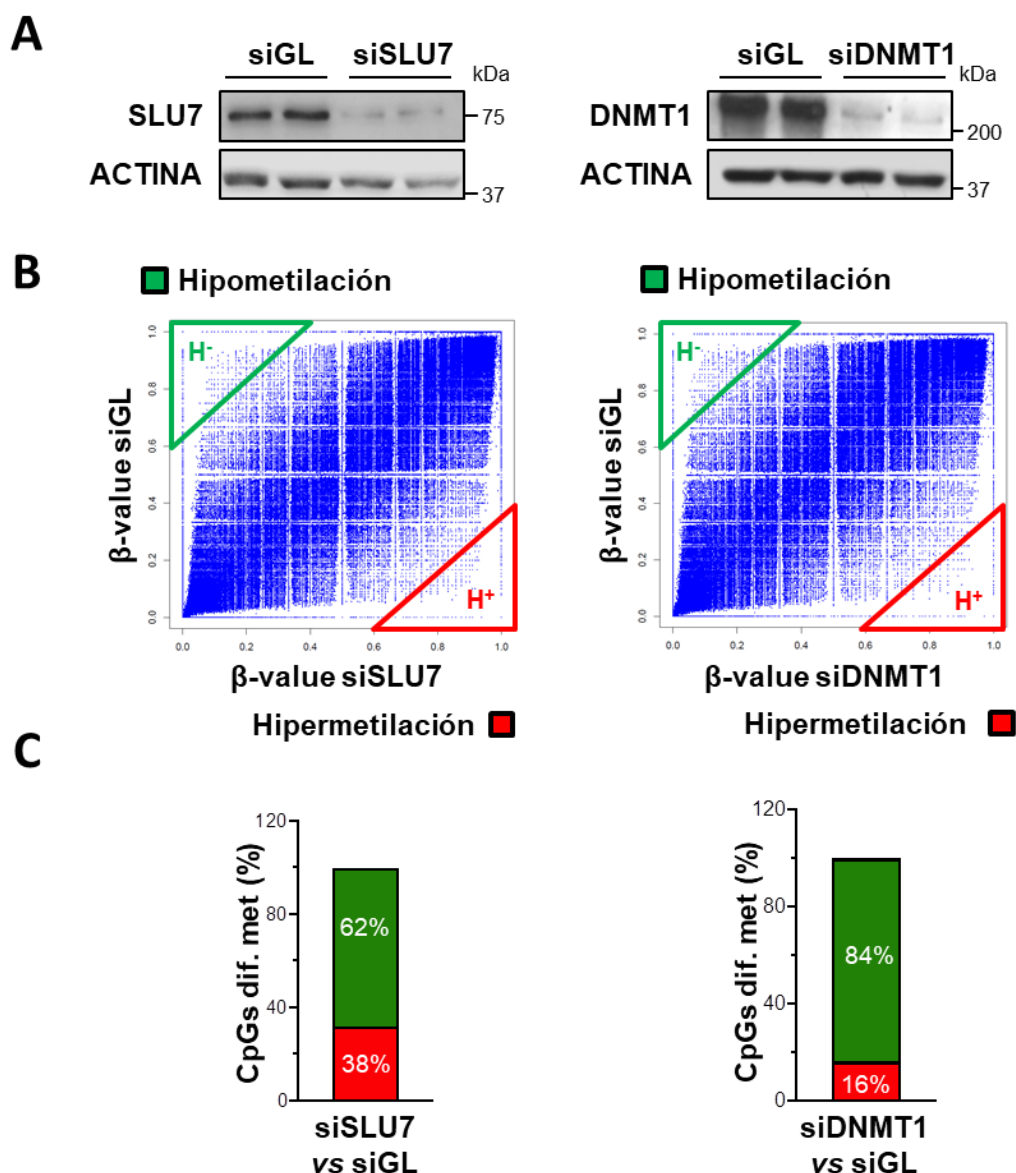


Figura 18. El silenciamiento de SLU7 induce una metilación aberrante del DNA similar al silenciamiento de DNMT1. (A) Análisis por *Western blot* para confirmar el silenciamiento de SLU7 y DNMT1 en la línea celular PLC/PRF/5 tras 72 horas de la transfección de los siRNAs. La actina se utilizó como control de carga. En estas células se realizó el ensayo de secuenciación reducida tras tratamiento con bisulfito (RRBS). **(B)** Gráficos de dispersión del ensayo de RRBS en el que se representa el valor de metilación (β -value) de cada una de las CpGs analizadas. El eje de abscisas corresponde al valor de metilación en las células siSLU7 (izquierda) o siDNMT1 (derecha) y el eje de ordenadas corresponde al valor de metilación en las células control (siGL). Los cambios de metilación mayores de 0,6 se han resaltado con un triángulo verde (hipometilación) o un triángulo rojo (hipermetilación). **(C)** Los gráficos representan el porcentaje de CpGs hipometiladas en verde (con una diferencia de metilación superior a 0,6 ($FC < -0,6$) e hipermetiladas en rojo ($FC > 0,6$) en siSLU7 o siDNMT1 frente a siGL.

A continuación, analizamos la distribución en el genoma de las CpGs diferentemente metiladas tras el silenciamiento de SLU7 y de DNMT1 con el fin de entender la relevancia funcional de dichas alteraciones. De manera general, las CpGs se distribuyeron de forma homogénea entre los 24 pares de cromosomas (Figura 19) y llamativamente de forma muy similar en las células silenciadas de SLU7 (Figura 19A) y de DNMT1 (Figura 19B).

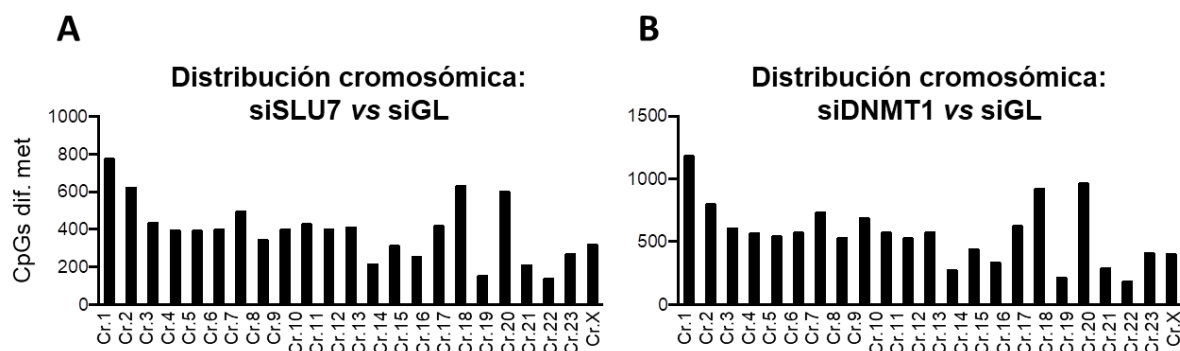


Figura 19. Distribución cromosómica de las CpGs diferentemente metiladas en siSLU7 (A) y siDNMT1 (B) respecto a las células control (siGL). Las gráficas representan el número total de CpGs metiladas de manera aberrante en cada uno de los 24 pares de cromosomas, sumando un total de 9.143 y 13.128 CpGs en las células PLC/PRF/5 silenciadas de SLU7 (A) y de DNMT1 (B) frente a las células control siGL, respectivamente.

Como ya hemos mencionado, existen zonas del genoma ricas en CpGs cuyo estado de metilación regula la transcripción génica^{22,75}. Por ello, quisimos analizar si las CpGs identificadas se acumulaban en regiones concretas del genoma. El RRBS reveló que el silenciamiento de SLU7 inducía la metilación aberrante de CpGs distribuidas de manera dispersa por todo el genoma. De forma inesperada y llamativa, estos mismos resultados se observaron en las células silenciadas de DNMT1. En concreto, en cuanto a las CpGs hipermetiladas tras el silenciamiento de SLU7 encontramos un total de 3.526 CpGs en un total de 3.019 genes lo que corresponde con un ratio de 1,17 CpGs por gen (Figura 20A). Además, solo una pequeña proporción de dichas CpGs se localizan dentro de islas CpGs (13,5%) (Figura 20A). De manera similar, el silenciamiento de DNMT1 provocó la hipermetilación de un total de 2.106 CpGs en un total de 1.870 genes, lo que se corresponde con un ratio de 1,12 CpGs por gen (Figura 20A). Estos resultados revelan que la hipermetilación inducida tras 72 horas de los

silenciamientos de SLU7 y de DNMT1 es dispersa a lo largo del genoma. Además, si comparamos la lista de genes hipermetilados tras el silenciamiento de SLU7 con los genes hipermetilados al silenciar DNMT1, encontramos 614 genes en común (Figura 20B) y cuando comparamos las CpGs de manera individual, el solapamiento entre ambos silenciamientos es de 407 CpGs (Figura 20B).

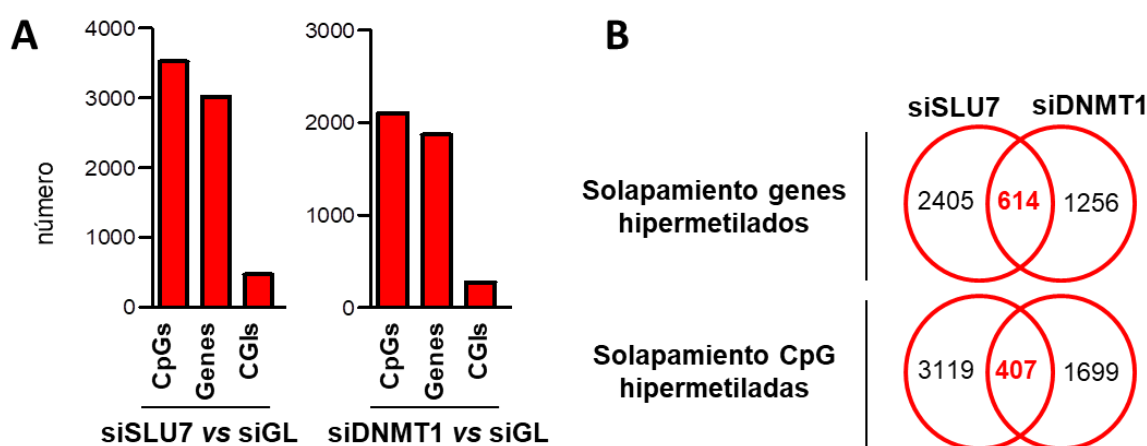


Figura 20. Las CpGs hipermetiladas tras el silenciamiento de SLU7 o DNMT1 se encuentran distribuidas de manera dispersa en el genoma. (A) Gráfico de barras que representa el número de CpGs únicas, genes con CpGs y CpGs dentro de islas (CGIs) hipermetiladas ($FC < 0,6$) en las células PLC/PRF/5 tras 72 horas de transfección con siSLU7 o siDNMT1 comparando con las células control (siGL). **(B)** Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de genes (arriba) o CpGs (abajo) hipermetiladas ($FC < 0,6$) entre las PLC/PRF/5 transfectadas con siSLU7 y aquellas transfectadas con siDNMT1 comparada con siGL respectivamente.

Entender y caracterizar los mecanismos por los cuales el silenciamiento de SLU7 o de DNMT1 resultan en hipermetilaciones, así como sus implicaciones funcionales es muy importante. Sin embargo, en el presente trabajo, decidimos centrarnos en el papel canónico de DNMT1 y por lo tanto en estudiar, con mayor profundidad, el efecto del silenciamiento de SLU7 y DNMT1 en la hipometilación del DNA. Así analizamos los datos de hipometilación derivados del ensayo RRBS en ambos silenciamientos. En concreto, el silenciamiento de SLU7 indujo la hipometilación de un total de 5.617 CpGs en un total de 4.567 genes, lo que se corresponde con un ratio de 1,2 CpGs por gen (Figura 21A). Además, solo una pequeña proporción de dichas CpGs se localizan dentro de islas CpGs (11,5 %) (Figura 21A). De manera similar, el silenciamiento de DNMT1 provocó la hipometilación de un total de 11.022 CpGs en un total de 7.978 genes, lo

que se corresponde con un ratio de 1,4 CpGs por gen (Figura 21A). Estos resultados revelan que la hipometilación inducida tras 72 horas de los silenciamientos de SLU7 y de la propia DNMT1 es dispersa a lo largo del genoma. Además, si comparamos la lista de genes hipometilados tras el silenciamiento de SLU7 con los genes hipometilados al silenciar DNMT1, encontramos 2.104 genes en común (Figura 21B). Sin embargo, al comparar las CpGs de manera individual, el solapamiento entre ambos silenciamientos es de 993 CpGs (Figura 21B).

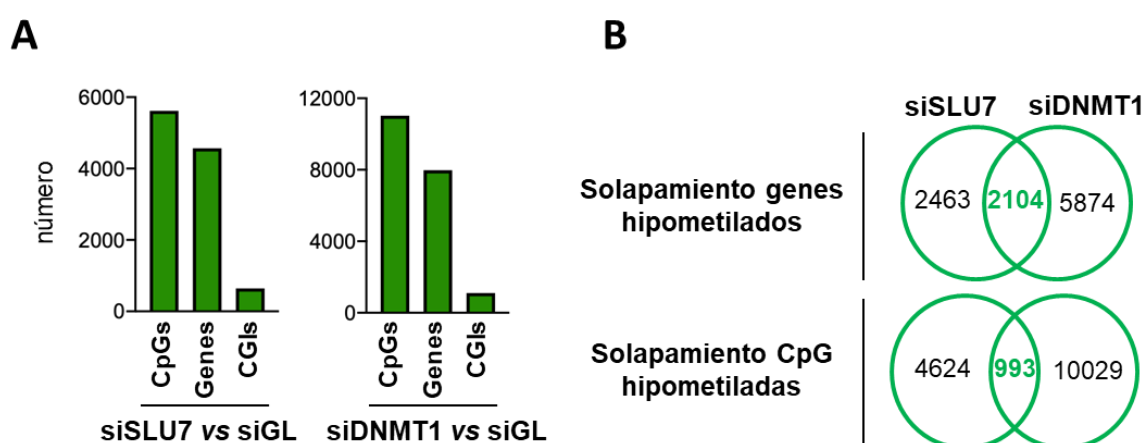


Figura 21. Las CpGs hipometiladas tras el silenciamiento de SLU7 o DNMT1 se encuentran distribuidas de manera dispersa en el genoma. (A) Gráfico de barras que representa el número de CpGs únicas, genes con CpGs y CpGs dentro de islas (CGIs) hipometiladas ($FC < -0,6$) en las células PLC/PRF/5 tras 72 horas de transfección con siSLU7 o siDNMT1 comparando con las células control (siGL). **(B)** Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de genes (arriba) o CpGs (abajo) hipometiladas ($FC < -0,6$) entre las PLC/PRF/5 transfectadas con siSLU7 y aquellas transfectadas con siDNMT1 comparada con siGL respectivamente.

Con el fin de comprender el reducido solapamiento encontrado en los genes y las CpGs individuales hipometiladas entre las células silenciadas de SLU7 y las silenciadas de DNMT1, decidimos seguir dos estrategias. En primer lugar, reanalizamos el ensayo RRBS en condiciones menos restrictivas, considerando como metilación diferencial cambios de 0,4 en el β -value (Figura 22). Como era de esperar, tras dicho análisis encontramos un aumento en el solapamiento de los genes (60 % de los genes hipometilados al silenciar SLU7) y las CpGs individuales hipometiladas entre las células silenciadas de SLU7 y las silenciadas de DNMT1.

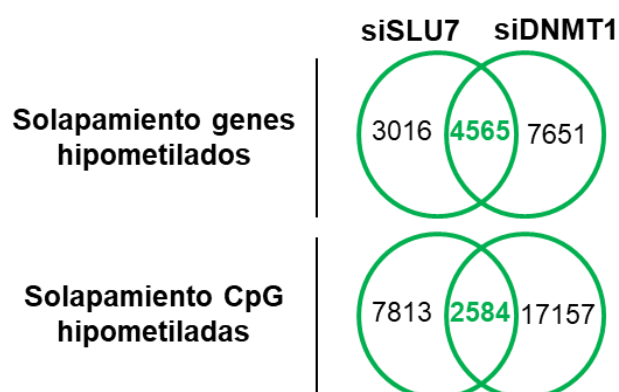


Figura 22. El solapamiento de genes y CpGs hipometiladas entre las células silenciadas de SLU7 y DNMT1 considerando diferencias de metilación de 0,4 en el β -value. Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de genes (arriba) o CpGs (abajo) hipometiladas ($FC < -0,4$) entre las PLC/PRF/5 transfectadas con siSLU7 con siDNMT1.

En segundo lugar, realizamos un nuevo ensayo RRBS en las células PLC/PRF/5 para comparar el efecto del silenciamiento de DNMT1 con el efecto del silenciamiento combinado de DNMT1 y una de las DNMTs encargadas de la metilación del DNA *de novo*, DNMT3B (siDNMT1+siDNMT3B) durante 72 horas (Figura 23). En este ensayo, encontramos un solapamiento de los genes (34 %) y de las CpGs individuales (11 %) hipometiladas entre las células silenciadas para DNMT1 y las células con el doble silenciamiento (siDNMT1+siDNMT3B) inferior al encontrado entre las células siSLU7 y siDNMT1 (46 % en genes y 18 % en las CpGs individuales). El reducido solapamiento entre los dos experimentos independientes en los que se silencia DNMT1 parece indicar que el proceso de hipometilación se inicia en cada experimento de manera heterogénea a lo largo del genoma, y que sería necesario un tiempo más prolongado de silenciamiento para recapitular de forma homogénea el efecto del silenciamiento en la metilación global del DNA. Todo ello, pone en valor el grado de solapamiento observado en la hipometilación entre el silenciamiento de SLU7 y de DNMT1, sugiriendo, además, que puede existir una relación funcional.

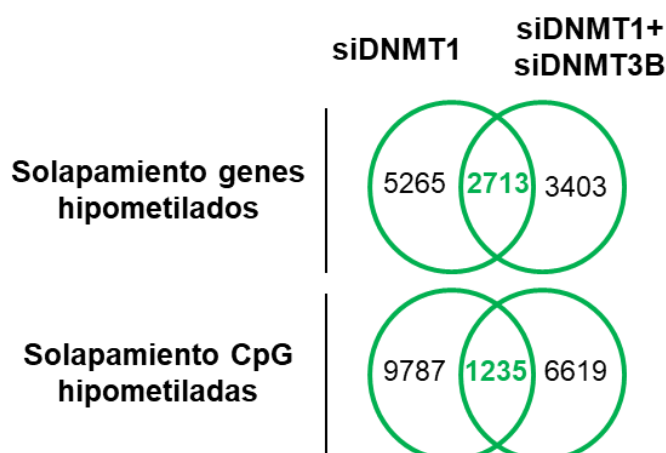


Figura 23. El solapamiento de genes y CpGs hipometilados ($FC < -0,6$) entre las células silenciadas de DNMT1 y DNMT1 + DNMT3B. Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de genes (arriba) o CpGs (abajo) hipometilados ($FC < -0,6$) entre las PLC/PRF/5 transfectadas con siDNMT1 y siDNMT1+siDNMT3B comparadas con siGL en cada caso.

El conjunto de estos resultados sugiere que SLU7 es necesario para la correcta metilación del DNA en células transformadas, de forma que el silenciamiento transitorio de SLU7 induce una metilación aberrante de CpGs, mayoritariamente una hipometilación de CpGs dispersas a lo largo del genoma. De manera llamativa, estos hallazgos son similares a los obtenidos tras silenciar de manera transitoria la expresión de DNMT1, la enzima responsable de la metilación del DNA.

2. SLU7 REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES CONTROLADOS POR METILACIÓN

Como se ha explicado en la introducción, la metilación del DNA regula la expresión génica. De manera general, la metilación de CpGs en los promotores de genes está asociada con la represión de su transcripción, mientras que los promotores no metilados se asocian con la transcripción del gen¹⁵¹. De acuerdo con ello y en base a nuestros resultados, decidimos estudiar si SLU7 estaba regulando la expresión génica a través de la metilación del DNA.

2.1. SLU7 regula la expresión de genes hipometilados tras su silenciamiento.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la gran mayoría de las CpGs hipometiladas en las células PLC/PRF/5 tras el silenciamiento de SLU7 y DNMT1 se encontraban distribuidas de manera dispersa por el genoma. Sin embargo, los datos del RRBS nos permitieron identificar un conjunto de genes con más de 6 CpGs hipometiladas en la misma región genómica, comparado con las células control y que coincidían en las células silenciadas para SLU7 y para DNMT1. Este fue el caso de *TRIM47*, un miembro de la superfamilia de proteínas TRIM (*tripartite motif containing*) con actividad ubiquitina ligasa; *TFF3*, un factor implicado en el mantenimiento y la reparación de la mucosa intestinal y *DLG3*, un miembro de la superfamilia de proteínas de la guanilato quinasa (Figura 24A).

Decidimos validar estos resultados realizando PCRs específicas de metilación en DNA tratado con bisulfito. Para ello se diseñaron dos reacciones de PCR para cada uno de los genes: una reacción con cebadores específicos que se unirán a la secuencia metilada (M) y otra reacción con cebadores específicos que se unirán a la secuencia no metilada (U). Así, analizamos el estado de metilación de las tres regiones en DNA convertido con tratamiento bisulfito de PLC/PRF/5 transfectadas durante 72 horas con siGL, siSLU7 y siDNMT1. Como muestra la Figura 24B, se confirma una reducción de la banda metilada correspondiente a las regiones de *TRIM47* y *DLG3* y un aumento de la banda no metilada correspondiente a la región de *TFF3* en las células silenciadas para SLU7 y DNMT1 comparado con las células control siGL (Figura 24B).

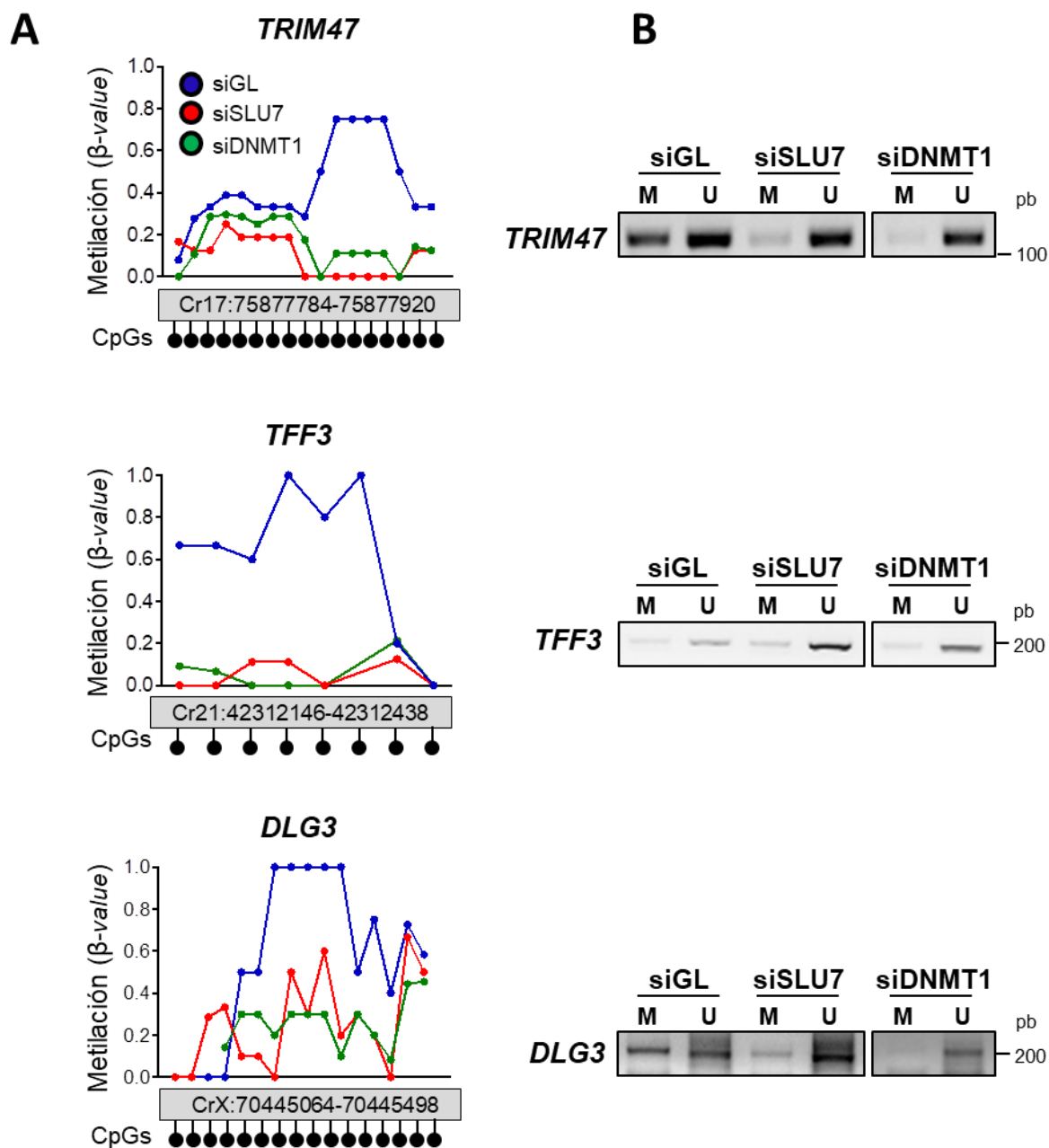


Figura 24. Identificación de genes en el RRBS con la metilación de varias CpGs regulada por SLU7. (A) Gráficos que representan los niveles de metilación del DNA (β -value) obtenidos en el RRBS de una región dentro de los genes *TRIM47*, *TFF3* y *DLG3*. Estas regiones se encuentran hipometiladas en las células PLC/PRF/5 silenciadas durante 72 horas de SLU7 (rojo) y DNMT1 (verde) al compararlas con las células control (siGL, en azul). **(B)** PCRs específicas de metilación (MSPs) de la región representada en el apartado A de cada uno de los tres genes. M: metilado, U: no metilado.

De las tres regiones analizadas, aquellas que corresponden a los genes *TRIM47* y *DLG3* están localizadas en CGIs en el promotor y en el exón 1 respectivamente,

mientas que la región que corresponde al gen *TFF3* se localiza en el cuerpo del gen y fuera de CGI (Figura 25A). Por ello, y con el objetivo de evaluar si las alteraciones en los niveles de metilación inducidas tras el silenciamiento de *SLU7* se asociaban a cambios en el nivel de expresión de dichos genes, analizamos los niveles de expresión de *TRIM47* y *DLG3* en células PLC/PRF/5 tras 72 horas del silenciamiento de *SLU7*. Tal como se esperaba, observamos un aumento significativo de los niveles de expresión de *TRIM47* y *DLG3* en las células siSLU7 comparado con las células control (siGL) (Figura 25B).

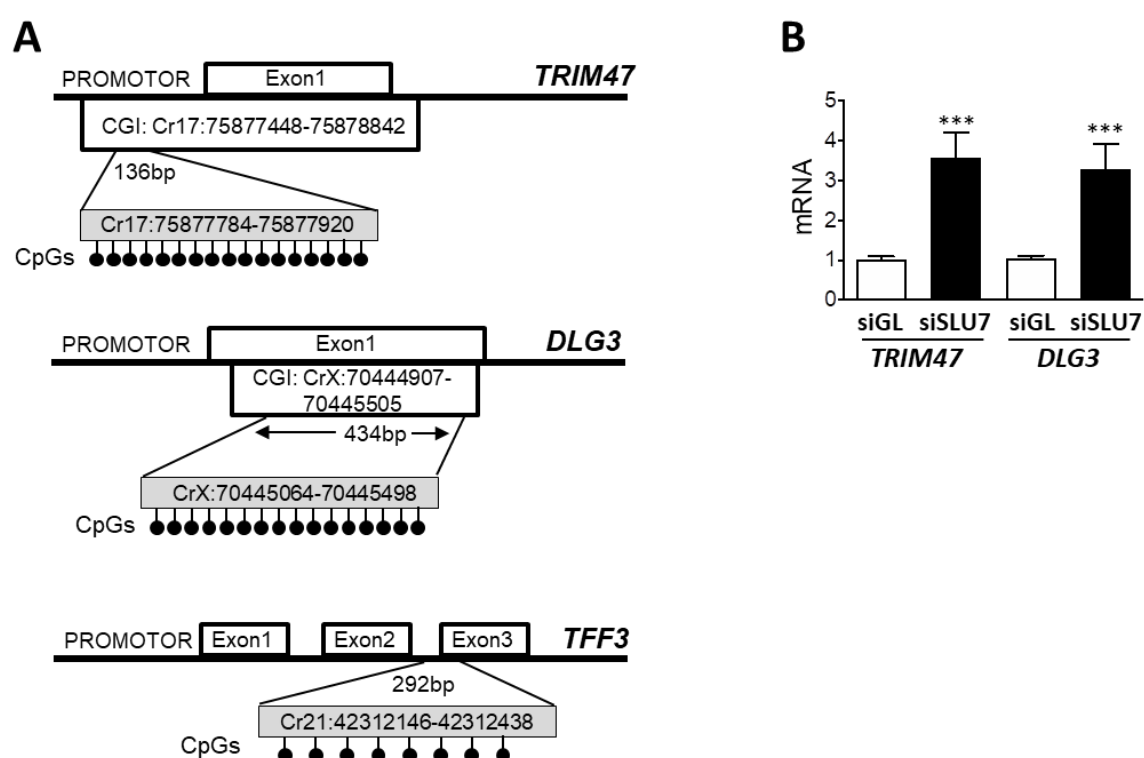


Figura 25. El silenciamiento de *SLU7* induce la expresión de genes en paralelo con la hipometilación de su promotor. **(A)** Representación de las regiones de los genes *TRIM47*, *DLG3* y *TFF3* analizadas en la Figura 24. La región concreta analizada está marcada en gris. **(B)** Expresión de *TRIM47* y *DLG3* por PCR a tiempo real en las células PLC/PRF/5 transfectadas con siGL o siSLU7 durante 72 horas. Se ha utilizado *RPLP0* como control. *** $P < 0,001$.

2.2. El silenciamiento de SLU7 induce la expresión de genes supresores de tumores típicamente hipermetilados y silenciados en cáncer

Una de las características de las células tumorales es la hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores, lo que conduce a la inhibición de su expresión. Por ejemplo, el gen supresor de tumores *RASSF1A*²³⁷ o la enzima *GNMT*^{238,239}. Por ello, decidimos analizar la metilación de sus promotores por MSP y la expresión por PCR cuantitativa de ambos genes en las células PLC/PRF/5 tras 72 horas del silenciamiento de SLU7 y de DNMT1. En ambos casos observamos un aumento de la banda correspondiente a las secuencias no metiladas tanto para *RASSF1A* como para *GNMT* y, en paralelo, un incremento significativo de su expresión (Figura 26A).

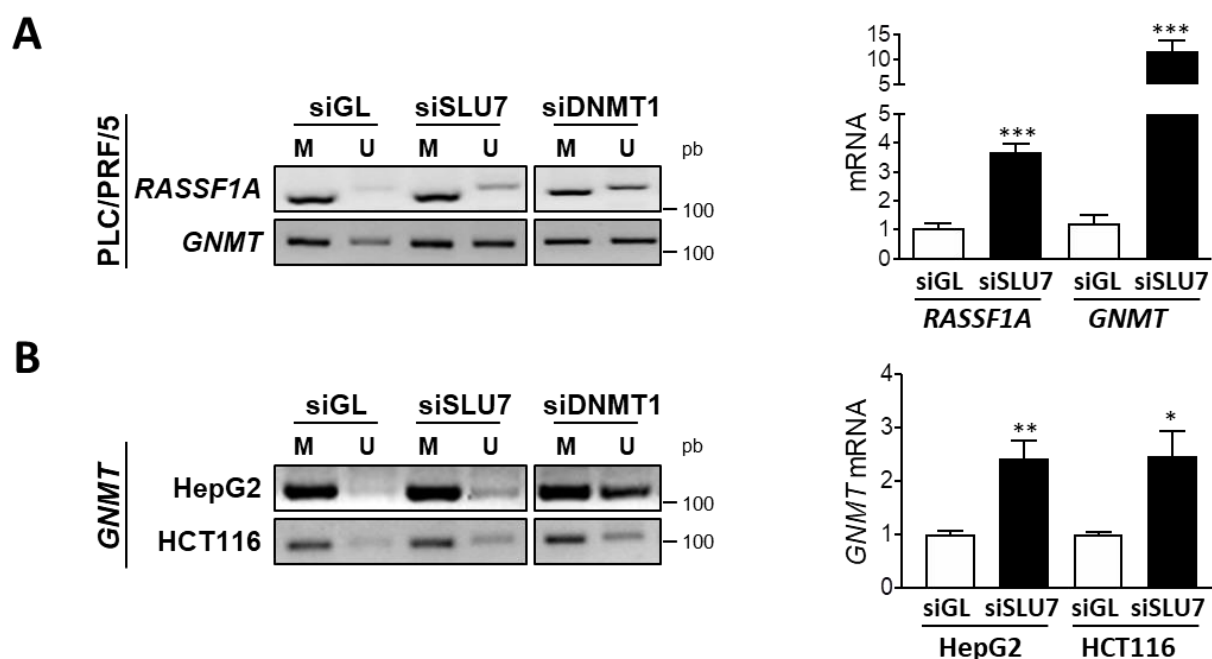


Figura 26. La reducción de los niveles de SLU7 induce la expresión de genes típicamente hipermetilados en cáncer. (A) La metilación del DNA se analizó mediante MSPs en los promotores de los genes típicamente regulados por metilación *RASSF1A* y *GNMT* y su expresión por PCR a tiempo real en las células PLC/PRF/5 transfectadas durante 72 horas con siGL, siSLU7 y siDNMT1. **(B)** MSP y PCR a tiempo real de *GNMT*, en las células humanas de hepatocarcinoma (HepG2) y de cáncer de colon (HCT116) transfectadas durante 72 horas con siGL, siSLU7 y siDNMT1. M: metilado, U: no metilado. *RPLPO* como control. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Asimismo, quisimos determinar el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre la metilación y expresión de *GNMT* en otra línea de hepatocarcinoma (HepG2) y de cáncer colorrectal (HCT116). Al igual que ocurría en las células PLC/PRF/5, el silenciamiento de SLU7 y de DNMT1 en las células HepG2 y HCT116 indujo un aumento de la banda correspondiente a la secuencia no metilada del promotor de *GNMT* y un aumento significativo de su expresión (Figura 26B).

2.3. El silenciamiento de SLU7 induce la expresión de genes implicados en la inducción de la inmunidad innata y adaptativa y de genes regulados por impronta

Por otro lado, y de manera relevante, está descrito que la hipometilación global del DNA provoca una inducción de la respuesta inmune innata y adquirida²⁴⁰ a través de la expresión de diferentes genes como son los retrovirus endógenos (ERVs)⁷⁷ o los *cancer-testis antigens* (CTAs)²⁴¹, antígenos cuya expresión está restringida principalmente a las células germinales masculinas. En condiciones fisiológicas, la expresión de ambas familias de genes se encuentra reprimida en la mayoría de las células somáticas debido a la metilación del DNA²⁴¹⁻²⁴³. De acuerdo con ello, el tratamiento durante 7 días con el agente desmetilante DAC a una concentración de 10 μ M en las células PLC/PRF/5 indujo la expresión del ERV *envFc2* y de los CTAs *MAGE-A1* y *MAGE-A7* (Figura 27A). Dado que el silenciamiento de SLU7 provoca una hipometilación global del DNA, decidimos estudiar los niveles de expresión de *envFc2*, *MAGE-A1* y *MAGE-A7* tras 72 horas de silenciamiento de SLU7 en cuatro líneas tumorales distintas (PLC/PRF/5, HepG2, HCT116 y H358). Como se muestra en la Figura 27B, el silenciamiento de SLU7 provocó un aumento de la expresión de los tres genes analizados en comparación con las células control (siGL).

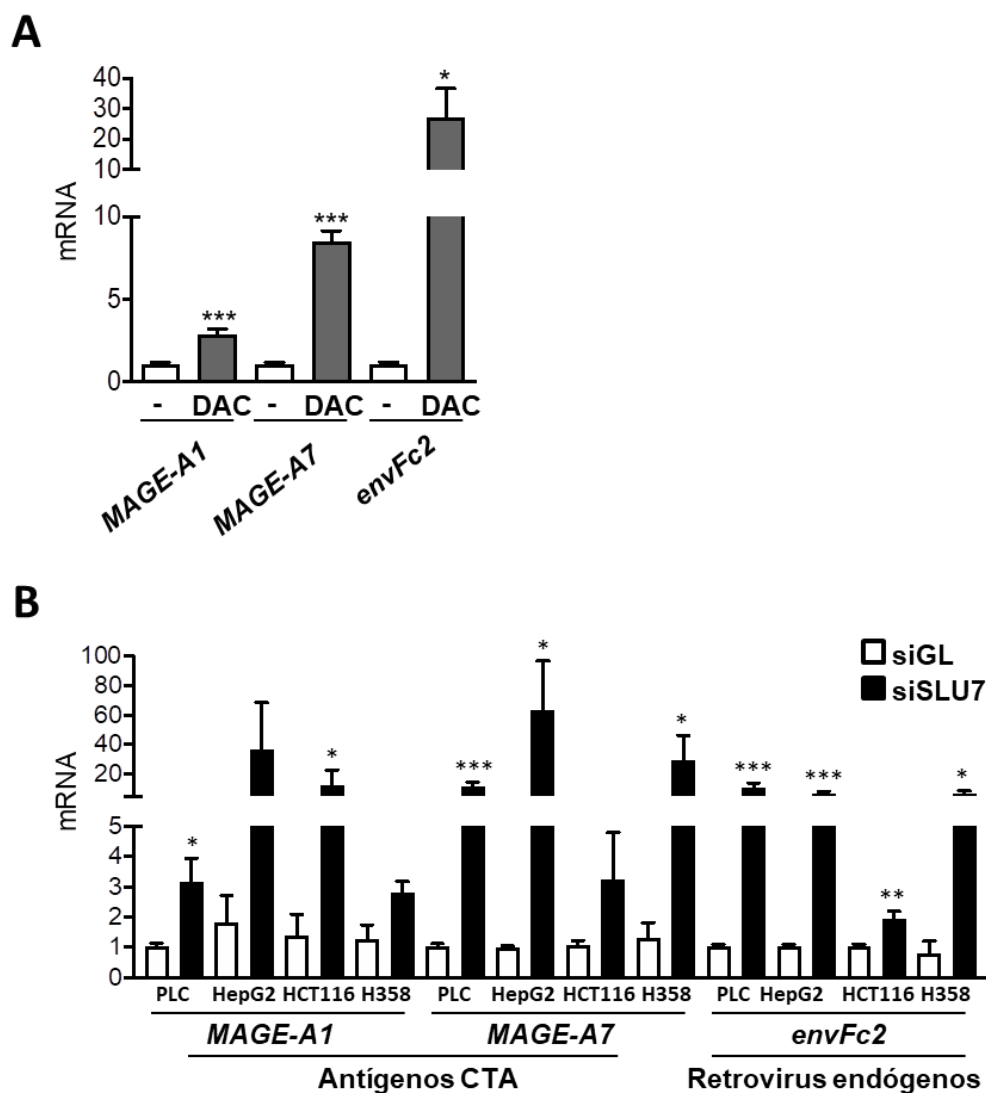


Figura 27. El silenciamiento de SLU7 induce la expresión de genes que codifican antígenos tumorales y retrovirus endógenos. (A, B) Expresión por PCR a tiempo real de antígenos CTA (*MAGE-A1* y *MAGE-A7*) y retrovirus endógeno (*envFc2*) **(A)** en células PLC/PRF/5 tras 7 días en cultivo con o sin tratamiento con el agente desmetilante 5-aza -2'-deoxycytidina (DAC) a 10 μ M, **(B)** en las células PLC/PRF/5, HepG2, HCT116 y H358 silenciadas con el control (siGL) y siSLU7 durante 72 horas. Se ha utilizado *RPLPO* como control. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

La impronta genética es un mecanismo por el que ciertos genes son expresados de manera diferente dependiendo del progenitor que lo haya transmitido²⁴⁴. Uno de los mecanismos de activación/ represión de estos genes es la metilación del DNA. Por ello, evaluamos si el silenciamiento de SLU7 regulaba la expresión del gen improntado *H19* en los cuatro tipos celulares. En todos ellos se observó un aumento de expresión de *H19* tras 72 horas del silenciamiento de SLU7 (Figura 28A), de manera similar al tratamiento con DAC (Figura 28B).

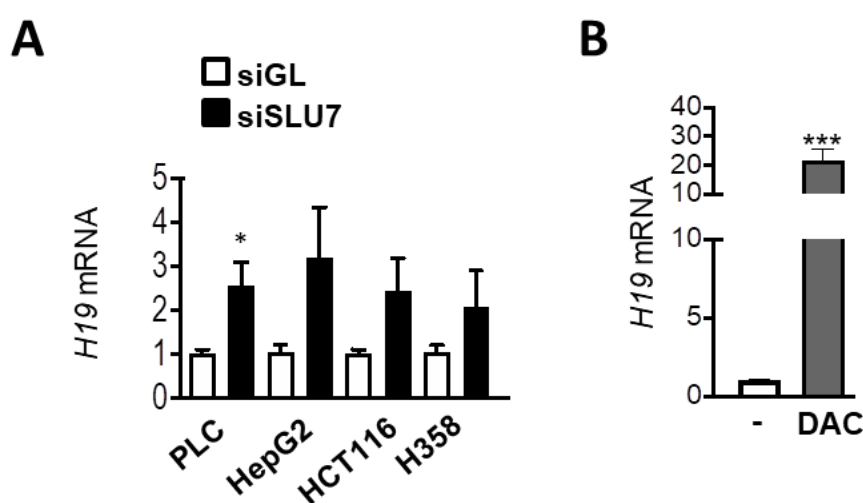


Figura 28. El silenciamiento de SLU7 induce la expresión de genes improntados (A,B) Expresión por PCR a tiempo real del gen de impronta (*H19*) en las células PLC/PRF/5, HepG2, HCT116 y H358 silenciadas con el control (siGL) y siSLU7 durante 72 horas, **(B)** en células PLC/PRF/5 tras 7 días en cultivo con o sin tratamiento con el agente desmetilante 5-aza -2'-deoxycytidina (DAC) a 10 μ M. Hemos utilizado *RPLP0* como control. *** $P < 0,001$.

El conjunto de estos ensayos demuestra que la hipometilación del DNA que tiene lugar como consecuencia del silenciamiento de SLU7 se asocia con la inducción de la expresión de diferentes genes silenciados por metilación. Así, estos resultados ponen de manifiesto por primera vez la contribución de SLU7 a la regulación epigenética de la expresión génica.

3. SLU7 ES NECESARIO PARA MANTENER LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEINA DNMT1 EN CELULAS PROLIFERANTES

Nuestros resultados mostrados hasta el momento reflejan que el silenciamiento de SLU7 induce una hipometilación global del DNA similar a la encontrada cuando se reducen los niveles de DNMT1. Por ello decidimos evaluar la posible implicación de SLU7 en la regulación de los niveles de las proteínas encargadas de la metilación de DNA, las DNMTs.

3.1. El silenciamiento de SLU7 reduce los niveles proteicos de DNMT1 en las células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5

En primer lugar, decidimos evaluar los niveles de expresión de la enzima encargada del mantenimiento de la metilación del DNA, DNMT1, tras el silenciamiento de la expresión de SLU7. Los análisis mediante *Western blot* revelaron que el silenciamiento de SLU7 en las células PLC/PRF/5 daba lugar a una reducción drástica y constante de los niveles de proteína DNMT1, alcanzándose una disminución de hasta el 60% tras las primeras 24 horas de la transfección. Además, esta caída de DNMT1 se mantuvo o incluso aumentó después de 48 y 72 horas del silenciamiento (Figura 29A). Con el fin de conocer si la regulación que SLU7 estaba ejerciendo sobre DNMT1 era a nivel transcripcional, se analizó la expresión de *DNMT1* por PCR a tiempo real en los distintos tiempos estudiados. Sorprendentemente, se observó que la rápida reducción de la proteína DNMT1 tras el silenciamiento de SLU7 no estaba asociada a una disminución de los niveles de su mRNA (Figura 29B), sugiriendo por tanto que SLU7 afecta directamente a la estabilidad proteica de DNMT1.

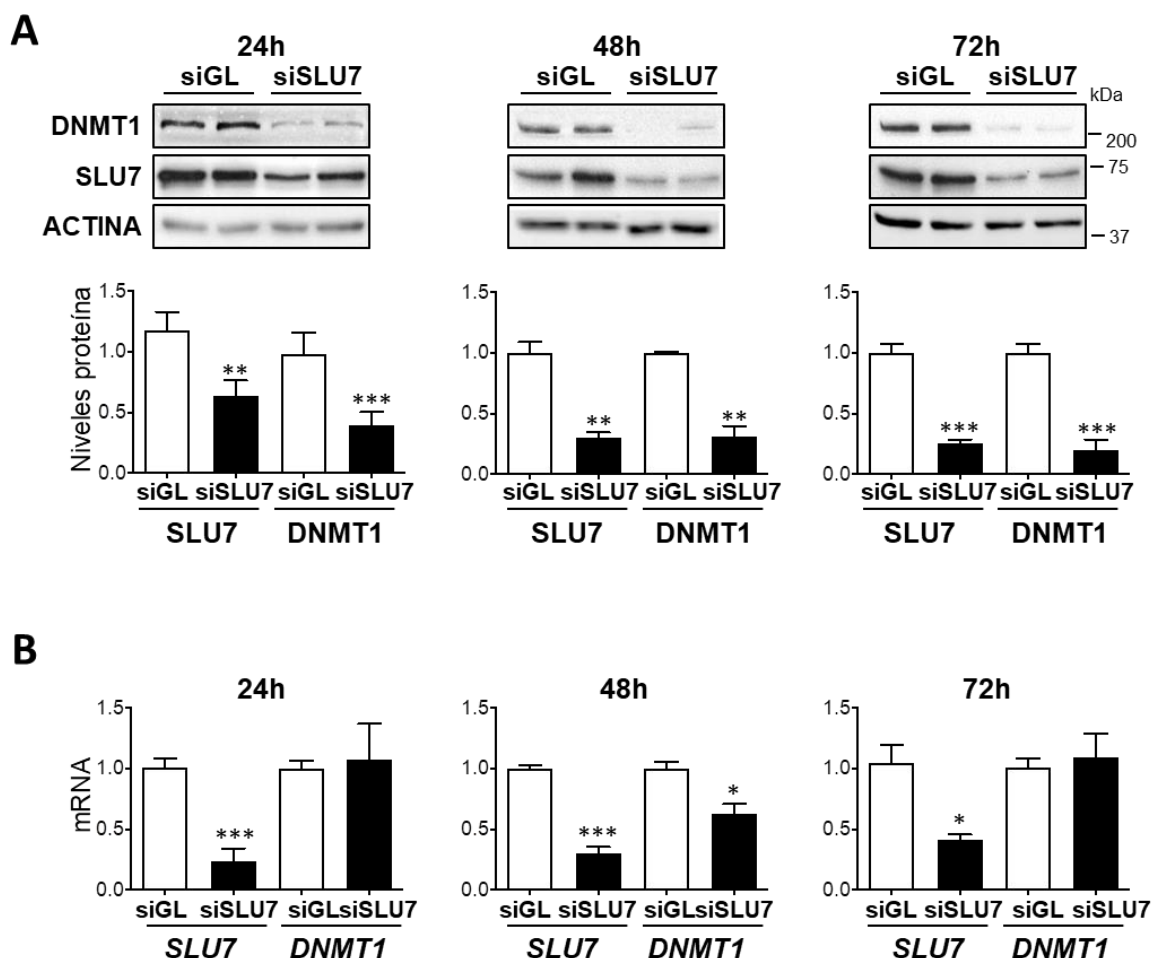


Figura 29. El silenciamiento de SLU7 reduce los niveles proteicos de DNMT1 en las células PLC/PRF/5. (A) Análisis mediante *Western blot* de la expresión de DNMT1, SLU7 como control del silenciamiento y actina como control de carga, en la línea celular PLC/PRF/5 a las 24, 48 y 72 horas de la transfección con siGL o siSLU7. Los niveles proteicos de SLU7 y DNMT1 fueron cuantificados en al menos tres experimentos independientes con duplicados biológicos utilizando *Image J software* (histogramas bajo los *Western blots*). **(B)** Cuantificación mediante PCR a tiempo real de los niveles de expresión de mRNA de *SLU7* y *DNMT1* en los mismos experimentos analizados en el panel A. La expresión del gen *RPLP0* se utilizó como control de expresión constitutiva. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

A continuación, evaluamos también los niveles de las DNMTs encargadas de la metilación de *ново* del DNA, DNMT3A y DNMT3B, en estas mismas células. La Figura 30 muestra que, aunque existen cambios tanto a nivel de proteína (Figura 30A) como de mRNA (Figura 30B) para DNMT3A y DNMT3B tras el silenciamiento de SLU7 comparado con las células control, estos son menos consistentes y tienen lugar a tiempos de transfección posteriores si los comparamos con la reducción observada en el caso de DNMT1.

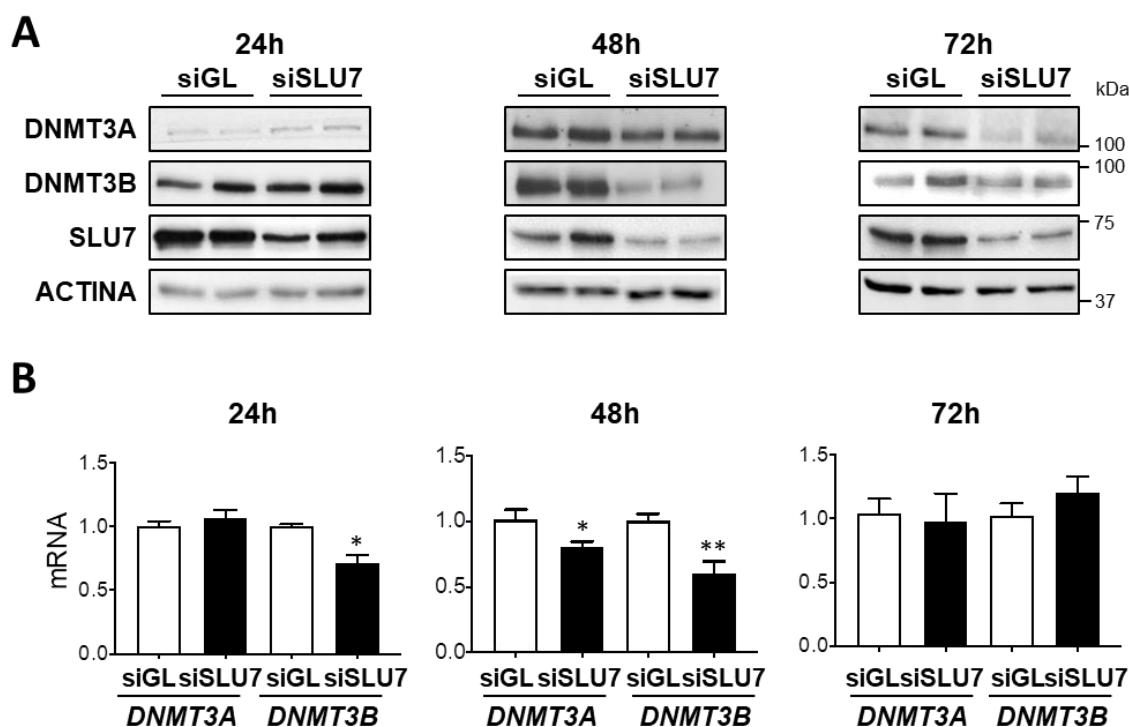


Figura 30. Análisis de los niveles de DNMT3A y DNMT3B tras el silenciamiento de SLU7. (A) Análisis mediante *Western blot* de la expresión de DNMT3A, DNMT3B, SLU7 como control de silenciamiento y actina como control de carga, en la línea celular PLC/PRF/5 a las 24, 48 y 72 horas de la transfección con siGL o siSLU7, en las mismas muestras analizadas en la Figura 29A. **(B)** Cuantificación mediante PCR a tiempo real de los niveles de expresión de mRNA de *DNMT3A* y *DNMT3B* en los mismos experimentos analizados en el panel 29A. La expresión del gen *RPLP0* se utilizó como control de expresión constitutiva. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

En base a estos resultados, decidimos centrar nuestro estudio en caracterizar el mecanismo por el que cuál SLU7 regula los niveles de DNMT1.

3.2. El silenciamiento de SLU7 no induce un *splicing* aberrante de DNMT1

Como se ha mencionado en la introducción, SLU7 es un factor esencial en la segunda reacción catalítica del proceso de *splicing*¹⁸⁶. Además, recientemente hemos demostrado que una expresión reducida de SLU7 induce la acumulación de isoformas proteicas truncadas debido a alteraciones del *splicing*¹⁹⁴. Por lo tanto, decidimos evaluar si la reducción de los niveles proteicos de la forma constitutiva de DNMT1 observados tras el silenciamiento de SLU7 estaba asociada a la acumulación, por

ejemplo, de isoformas aberrantes de menor tamaño generadas por *splicing* alternativo.

Para ello se realizaron dos análisis complementarios en células PLC/PRF/5 a las 48 horas de la transfección con siSLU7 y el control (siGL). En primer lugar, se realizó una PCR con cebadores localizados en el exón 1 y en el exón 17. Como se muestra en la Figura 31A, el silenciamiento de SLU7 no indujo la generación de isoformas aberrantes de *splicing* de *DNMT1*. En paralelo se realizó un análisis por *Western blot* con anticuerpos dirigidos contra dos epítomos diferentes de la proteína *DNMT1*. El anticuerpo anti-*DNMT1* de la casa comercial *Cell signaling*, dirigido en torno a la Leucina 985, y el anticuerpo anti-*DNMT1* de la casa comercial *Abcam*, dirigido a los aminoácidos 637-650. En ninguno de los dos casos se observaron isoformas truncadas de *DNMT1* (Figura 31B).

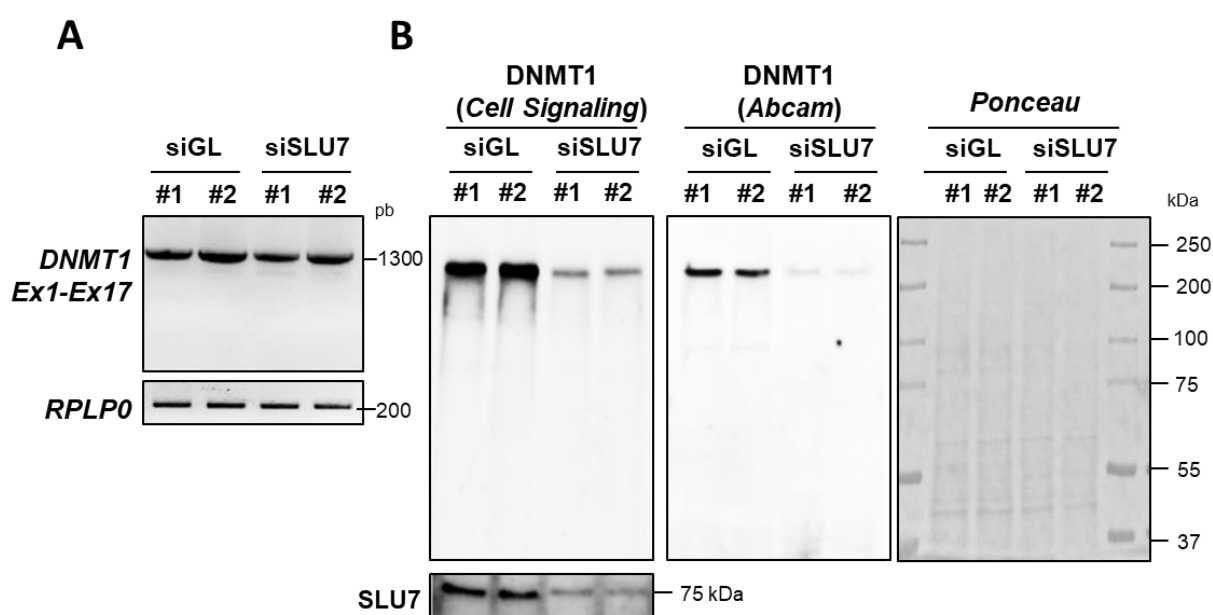


Figura 31. SLU7 no es necesario para el correcto *splicing* de *DNMT1* (A) Análisis del patrón de expresión de *DNMT1* por PCR y electroforesis utilizando cebadores localizados en los exones 1 y 17. Como control de carga hemos utilizado *RPLP0*. (B) Detección de la proteína *DNMT1* utilizando dos anticuerpos diferentes (*Cell Signaling* y *Abcam*) dirigidos frente a dos epítomos distintos. Se utilizó la membrana completa de *Western blot* para la detección de isoformas de distintos tamaños. Se muestra *SLU7* como control de silenciamiento y el *Ponceau* como control de carga. El ensayo fue realizado en la línea celular PLC/PRF/5 transfectada con siSLU7 y el control (siGL) durante 48 horas.

Estos experimentos descartan que SLU7 esté regulando los niveles de DNMT1 mediante el control de su *splicing*, generando un mRNA aberrante o isoformas proteicas truncadas de DNMT1.

3.3. SLU7 regula la expresión de DNMT1 en todas las fases del ciclo celular

Como se ha mencionado en la introducción, el papel fundamental de DNMT1 es la metilación de los sitios hemimetilados generados en las cadenas hijas de DNA durante la replicación^{72,73}. En concreto, este proceso de metilación por parte de DNMT1 se produce durante la fase S de síntesis de DNA del ciclo celular⁸¹. De acuerdo con ello, se ha descrito una expresión diferencial de DNMT1 durante las diferentes fases del ciclo celular¹⁴⁵. Así, los niveles de expresión de DNMT1 son mínimos durante la fase de reposo o fase G0; al entrar la célula en la fase G1 se produce una rápida inducción de su transcripción, alcanzándose el pico máximo de expresión durante la fase S, y volviendo a disminuir durante la fase G2/M^{146,147,245}.

Por otro lado, en trabajos previos hemos demostrado que la reducción de los niveles de SLU7 induce la parada del ciclo celular en la fase G2/M en líneas tumorales de diferentes orígenes¹⁹⁴. Por lo tanto, quisimos explorar si la reducción de los niveles de DNMT1 observada tras el silenciamiento de SLU7 podría atribuirse a la parada de estas células en la fase G2/M. Para responder a esta cuestión comparamos el efecto del tratamiento con nocodazol, un agente que promueve la parada de las células proliferantes en mitosis al interferir con el dinamismo de los microtúbulos induciendo su despolimerización, con el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre los niveles proteicos de DNMT1. La inducción de la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 (H3S10P), una modificación específica que se produce durante la mitosis, confirmó que tanto el tratamiento con nocodazol como el silenciamiento de SLU7 paraban las células en dicha fase (Figura 32). No se observaron cambios significativos en los niveles de DNMT1 entre las células control y las células enriquecidas en mitosis por el tratamiento con nocodazol. Sin embargo, tras el silenciamiento de SLU7 los niveles proteicos de DNMT1 se vieron reducidos de forma drástica comparando con el control

(siGL) (Figura 32). Estos resultados nos permiten concluir que la reducción de los niveles de DNMT1 observados tras el silenciamiento de SLU7 no se debe a la parada de estas células en fase G2/M del ciclo celular.

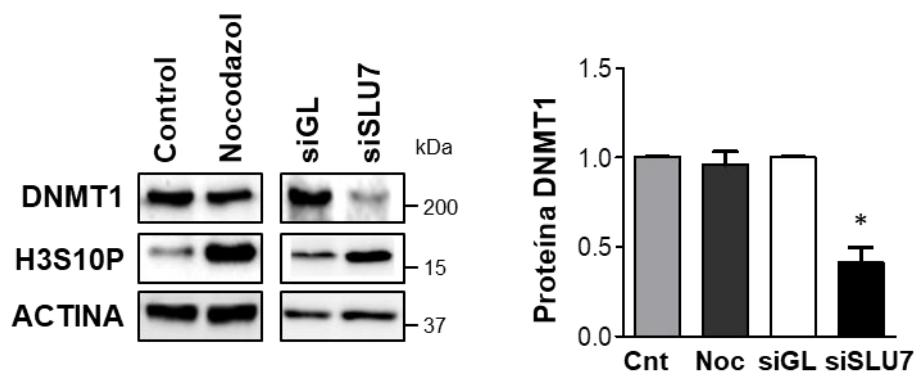


Figura 32. La reducción de los niveles proteicos de DNMT1 tras el silenciamiento de SLU7 es independiente de la inducción de la parada de las células en la fase G2/M del ciclo celular. Los niveles de proteína DNMT1 se analizaron mediante *Western blot* en células PLC/PRF/5 con y sin tratamiento con 330 nM de nocodazol durante 12 o 48 horas después de la transfección con siGL o siSLU7. La histona H3 fosforilada en la serina 10 (H3S10P) se utilizó como control de la parada en G2/M. La expresión de la actina se utilizó como control de carga. Los niveles de la proteína de DNMT1 se cuantificaron en 3 experimentos independientes utilizando el *software ImageJ*.

A continuación, y teniendo en cuenta la expresión diferencial de DNMT1 a lo largo del ciclo celular, quisimos evaluar si SLU7 era necesario para la correcta expresión de DNMT1 a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular. Para ello, provocamos la parada de las células PLC/PRF/5 en las fases G1, S y G2/M mediante el tratamiento con los inhibidores lovastatina, afidicolina y nocodazol respectivamente (Figura 33A). La lovastatina produce la acumulación de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 (*cyclin dependent kinase inhibitor 1B*) de manera que evita la progresión de la fase G1 del ciclo celular hacia la fase S, quedando las células paradas en fase G1²⁴⁶. La afidicolina es un inhibidor específico de la DNA polimerasa en eucariotas²⁴⁷, impidiendo que las células progresen más allá de la fase S del ciclo celular²⁴⁸, provocando por ello una acumulación de las células en esta fase. Y el nocodazol, como se ha mencionado anteriormente, induce la parada en la fase G2/M. Como observamos en la Figura 33B, el silenciamiento de SLU7 indujo una reducción de los niveles proteicos de DNMT1 similar en las células control no sincronizadas y en las células paradas en G1, S y G2/M.

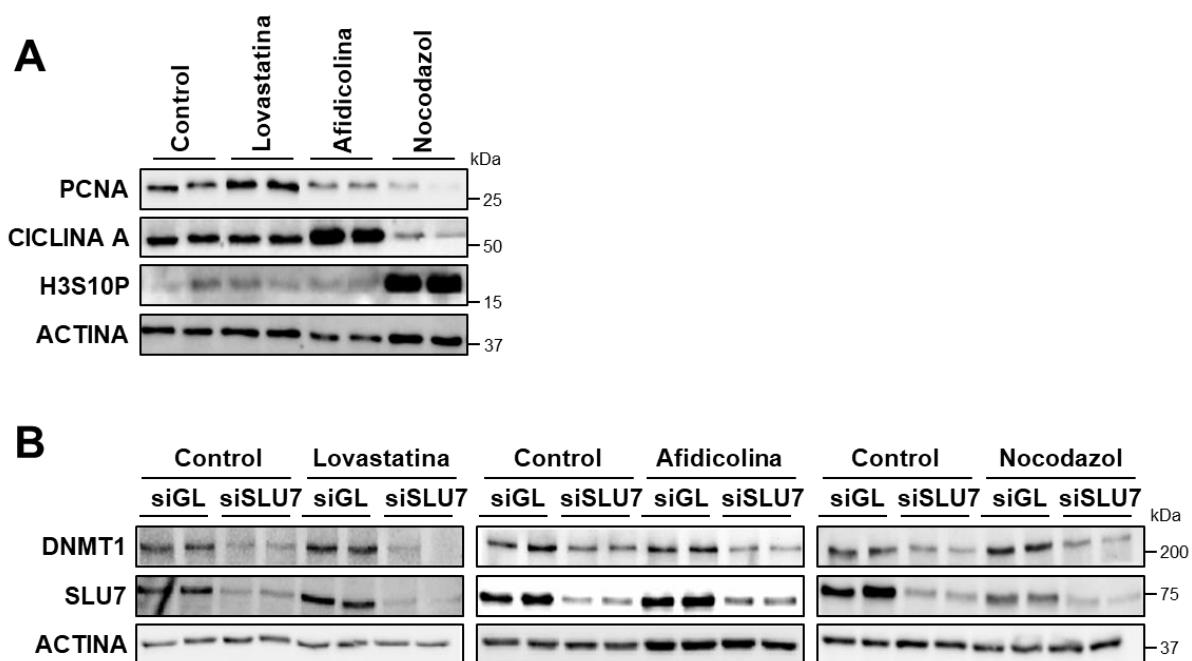


Figura 33. SLU7 controla los niveles de la proteína DNMT1 en todas las fases del ciclo celular **(A)** Western blot de células PLC/PRF/5 tras 60 horas con o sin tratamiento con lovastatina (20 μ M), afidicolina (2 μ g/ml) o nocodazol (330 nM). La expresión de PCNA, ciclina A, H3S10P y actina se utilizaron como marcadores de parada del ciclo celular en fase G1, S, G2/M y de control de carga respectivamente. **(B)** Western blot de DNMT1 y SLU7 en las células PLC/PRF/5 tratadas durante 60 horas con lovastatina (20 μ M), afidicolina (2 μ g/ml) o nocodazol (330 nM) como se describe en el panel A, y transfectadas con siSLU7 o el control (siGL) durante las últimas 48 horas. La expresión de actina se estudió como control de carga.

En vista de estos resultados, nos planteamos si la pérdida de DNMT1 desencadenada por el silenciamiento de SLU7 estaba relacionada con el estado de transformación de las células PLC/PRF/5, o si por el contrario estaba asociada al estado de proliferación de las células. Para responder dicha cuestión, en primer lugar, analizamos los niveles de DNMT1 tras el silenciamiento de SLU7 en la línea celular HEK293T, línea celular embrionaria de riñón y por lo tanto capaz de proliferar, pero no transformada. Como se observa en la Figura 34A, al igual que ocurría en las células PLC/PRF/5, el silenciamiento de SLU7 indujo una reducción significativa de los niveles proteicos de DNMT1. A continuación, decidimos parar en la fase de reposo del ciclo celular (fase G0), tanto a las células transformadas PLC/PRF/5 como a la línea no transformada HEK293T (Figura 34B), y evaluar el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre los niveles de DNMT1. Para ello mantuvimos el cultivo en confluencia para

inducir la inhibición de la proliferación por contacto celular, junto con la privación de suero (0 % FBS) antes de la transfección con siSLU7 y siGL. Destacar primero que, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía¹⁴⁵, los niveles proteicos de DNMT1 se reducen significativamente cuando las células se encuentran detenidas en G0. Llamativamente, los niveles de DNMT1 no se vieron afectados por el silenciamiento de SLU7 cuando las células se encontraban paradas en la fase de reposo.

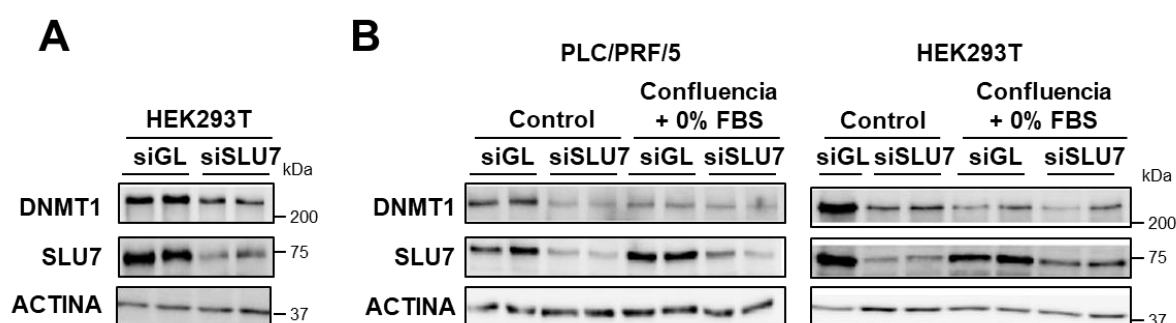


Figura 34. SLU7 regula la expresión de DNMT1 en células proliferantes no transformadas, por el contrario, no regula su expresión en las células paradas en la fase de reposo del ciclo celular. (A) Análisis por *Western blot* de DNMT1, SLU7 como control del silenciamiento y actina como control de carga en las células no transformadas HEK293T a las 48 horas de la transfección con siGL o siSLU7. **(B)** Análisis por *Western blot* de DNMT1 en células PLC/PRF/5 y HEK293T en condiciones normales (control), o tras ser mantenidas a alta confluencia durante 6 días y sin suero (0 % FBS) durante las últimas 60 horas. En ambas condiciones fueron transfectadas con siGL o siSLU7 durante las últimas 48 horas. La expresión de actina se muestra como control de carga.

En resumen, nuestros datos muestran que el efecto que tiene SLU7 sobre la proteína DNMT1 depende de que la célula esté proliferando, sin embargo no depende de la fase del ciclo celular ni del estado de transformación de la célula. Es decir, SLU7 es necesario para asegurar una correcta expresión de la proteína DNMT1 en las células en proliferación.

4. SLU7 ES NECESARIO PARA MANTENER LA ESTABILIDAD PROTEICA DE DNMT1 EN CÉLULAS PROLIFERANTES DE DIFERENTES ORÍGENES

4.1. SLU7 regula la estabilidad de la proteína DNMT1 en células tumorales de distintos orígenes

Los datos mostrados hasta el momento demuestran que el silenciamiento de SLU7 provoca la caída de los niveles proteicos de DNMT1 en las células PLC/PRF/5 y HEK293T proliferantes. A continuación, quisimos explorar si esta dependencia de DNMT1 por los niveles de SLU7 ocurría en líneas tumorales de diferentes orígenes. Para ello, analizamos los niveles de la proteína DNMT1 tras el silenciamiento de SLU7 en un amplio panel de líneas transformadas. En concreto, se analizaron (Figura 35) la línea celular de hepatocarcinoma HepG2, la línea celular de carcinoma colorrectal HCT116, las líneas celulares de cáncer de pulmón H358 y A549, la línea celular de carcinoma de cuello de útero HeLa, la línea celular de carcinoma de mama MCF7, la línea celular de glioblastoma U87 y la línea celular de melanoma A375.

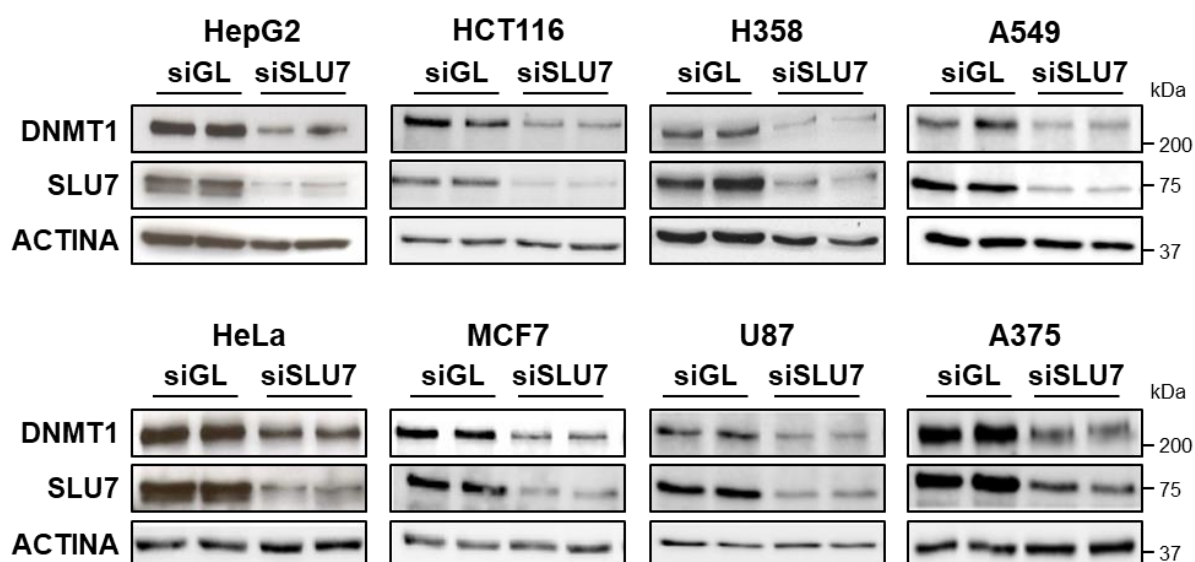


Figura 35. SLU7 es necesario para mantener los niveles de la proteína DNMT1 en células tumorales de distintos orígenes. Análisis por *Western blots* de DNMT1 y SLU7 en HepG2, HCT116, H358, A549, HeLa, MCF7, U87 y A375 48 horas después de la transfección con siSLU7 o el control siGL. La expresión de la actina se utilizó como control de carga.

Como observamos en la Figura 35, en todas las líneas celulares examinadas, independientemente de su origen, el silenciamiento de SLU7 durante 48 horas provocó una reducción drástica de los niveles de la proteína DNMT1.

La especificidad de nuestros resultados se validó utilizando otro siRNA independiente para SLU7 (siSLU7-1) en cuatro líneas celulares (Figura 36).

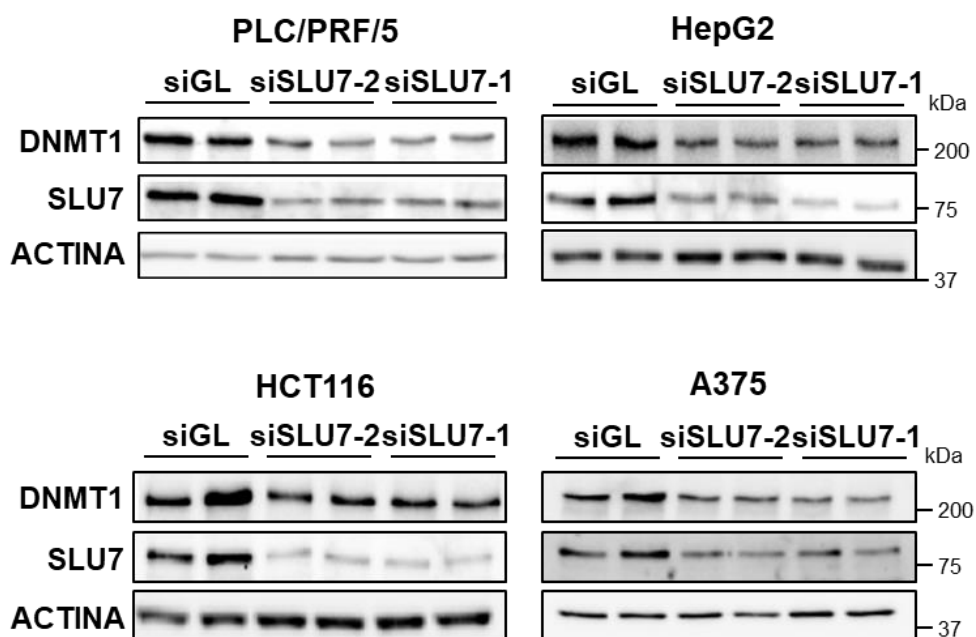


Figura 36. SLU7 es necesario para el mantenimiento de la estabilidad proteica de DNMT1 en células tumorales de distintos orígenes. Análisis por *Western blots* de DNMT1 y SLU7 en células PLC/PRF/5, HepG2, HCT116 y A375 48 horas después de la transfección con dos siRNAs diferentes específicos para SLU7 (siSLU7-2 y siSLU7-1). La expresión de actina se muestra como control de carga.

Además, de acuerdo con lo observado en las células PLC/PRF/5, los niveles de mRNA de *DNMT1* no se vieron afectados al inhibir la expresión de SLU7 en ninguna de las líneas analizadas (HepG2, H385, HCT116 y HeLa; Figura 37).

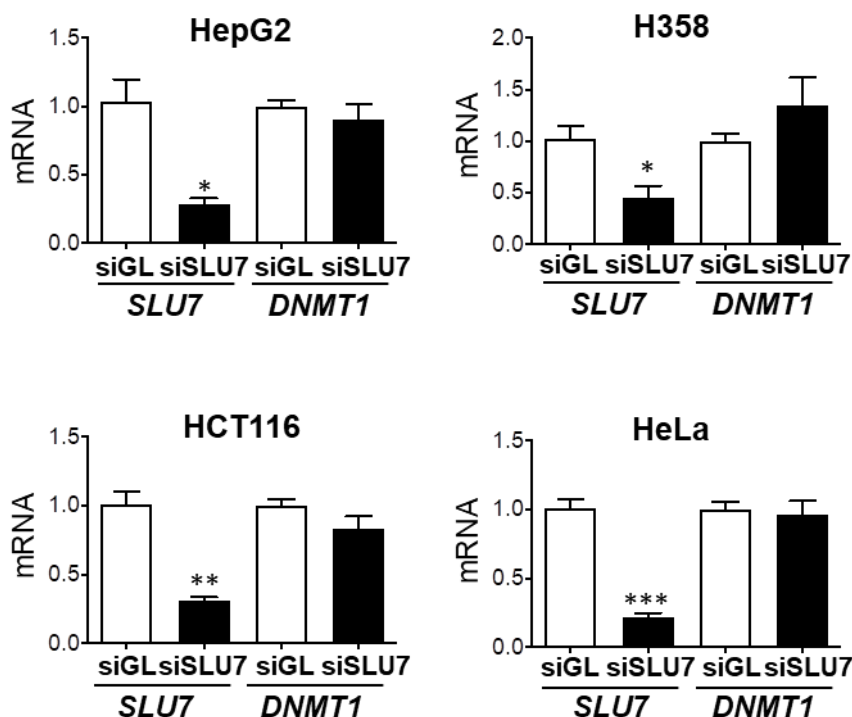


Figura 37. SLU7 no es necesario para mantener la estabilidad del mRNA de DNMT1 en células tumorales de distintos orígenes. Niveles de expresión del mRNA de *SLU7* y *DNMT1* mediante PCR en tiempo real en las líneas celulares HepG2, H358, HCT116 y HeLa 48 horas después de la transfección con siSLU7. La expresión del gen *RPLP0* se utilizó como control de expresión constitutiva. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Para confirmar nuestros resultados basados en el silenciamiento de la expresión de SLU7, decidimos comprobar si la sobreexpresión de SLU7 tenía el efecto contrario sobre la expresión de DNMT1. Para ello transfectamos las líneas celulares humanas de hepatocarcinoma PLC/PRF/5 y HepG2 y de cáncer de colon HCT116 con un plásmido control (pC) y un plásmido de sobre-expresión de SLU7 (pSLU7) (Figura 38). Como se observa en la figura 38, los niveles de la proteína DNMT1 aumentaron con el incremento de la expresión de SLU7 (Figura 38A y B), sin que los niveles de su mRNA se vieran afectados (Figura 38C), confirmando, que SLU7 estabiliza la proteína DNMT1.

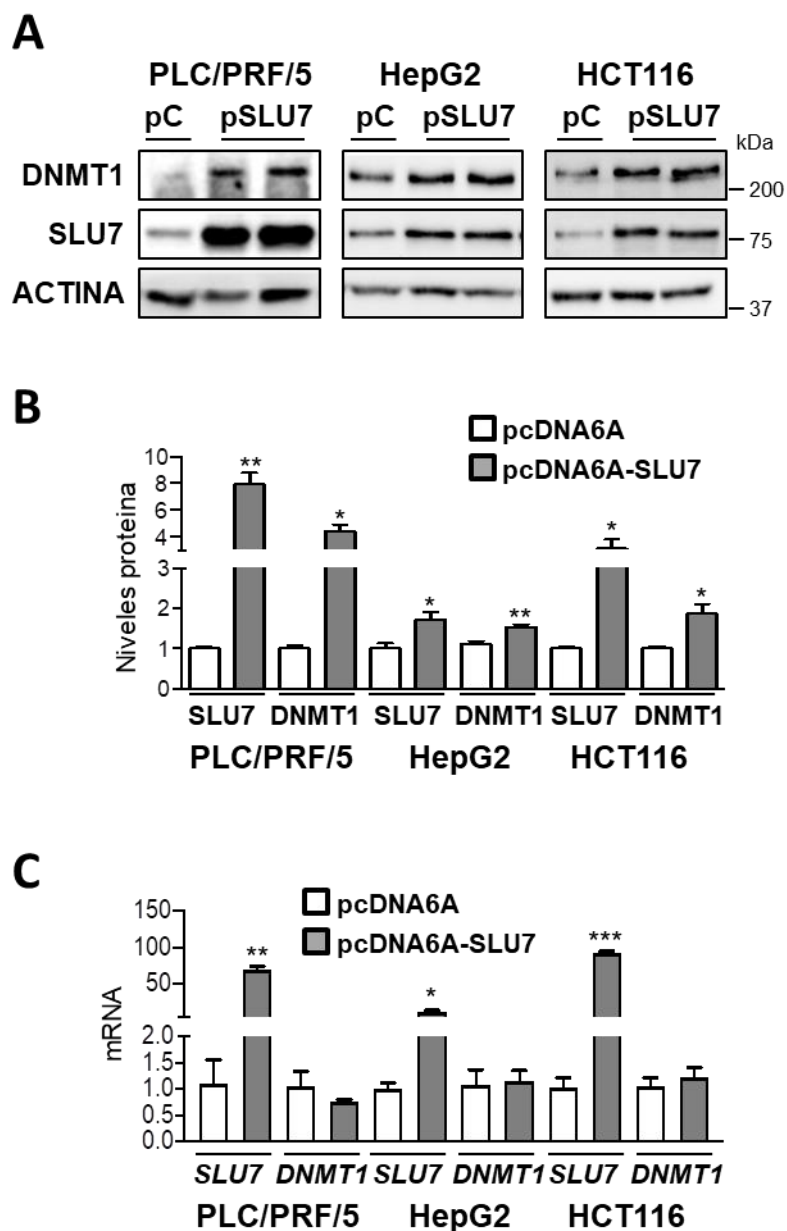


Figura 38. La sobreexpresión de SLU7 estabiliza los niveles de la proteína DNMT1. Las líneas celulares PLC/PRF/5, HepG2 y HCT116 fueron transfectadas de manera transitoria durante 48 horas con el plásmido vacío pcDNA6A (pC) o el mismo plásmido que expresa SLU7 (pSLU7). **(A)** Análisis por *Western blot* de la expresión de DNMT1 y SLU7 como control de sobreexpresión. Se muestra la expresión de actina como control de carga. **(B)** Los niveles proteicos de SLU7 y DNMT1 fueron cuantificados en 4 ensayos por duplicado, utilizando el *software ImageJ*. **(C)** Se analizaron por PCR a tiempo real los niveles de expresión de mRNA de *DNMT1* y *SLU7*. La expresión de *RPLPO* se utilizó como control de expresión constitutiva. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.2. SLU7 es necesario para impedir la degradación proteica de DNMT1

Nuestros datos muestran que SLU7 está regulando los niveles de la proteína DNMT1. Los niveles de cada proteína son el resultado del balance entre su síntesis y su degradación. Por ello, llegados a este punto, quisimos dilucidar los procesos fundamentales a través de los cuales SLU7 está controlando los niveles proteicos de DNMT1.

En primer lugar, para evaluar si SLU7 era necesario para la síntesis de la proteína DNMT1, realizamos experimentos con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida (CHX). La cicloheximida actúa interfiriendo en la actividad peptidiltransferasa del ribosoma 60S, bloqueando así la elongación del proceso de traducción²⁴⁹. Las células transfectadas con el control (siGL) y siSLU7 durante 36 horas fueron además tratadas con CHX durante las últimas 8 y 12 horas de la transfección (Figura 39). El análisis por *Western blot* reveló que el silenciamiento de SLU7 reducía los niveles proteicos de DNMT1 incluso cuando la síntesis de proteínas estaba inhibida. Este resultado sugiere que la estabilidad de DNMT1 mediada por SLU7 es independiente del proceso de su síntesis.

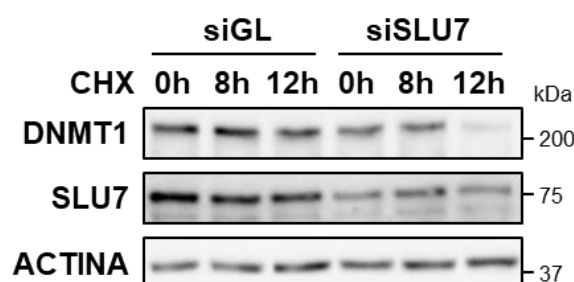


Figura 39. SLU7 media la estabilidad de DNMT1 cuando la síntesis proteica está inhibida. Los niveles de proteína DNMT1 se analizaron mediante *Western blot* en células PLC/PRE/5 36 horas después de la transfección con siGL o siSLU7 con y sin tratamiento con cicloheximida (10 µg/ml) durante las últimas 8 y 12 horas. La expresión de actina se utilizó como control de carga.

En segundo lugar, para estudiar si la reducción de la expresión de SLU7 desencadena una acelerada degradación de la proteína DNMT1 realizamos experimentos con el inhibidor del proteasoma MG-132 (Figura 40).

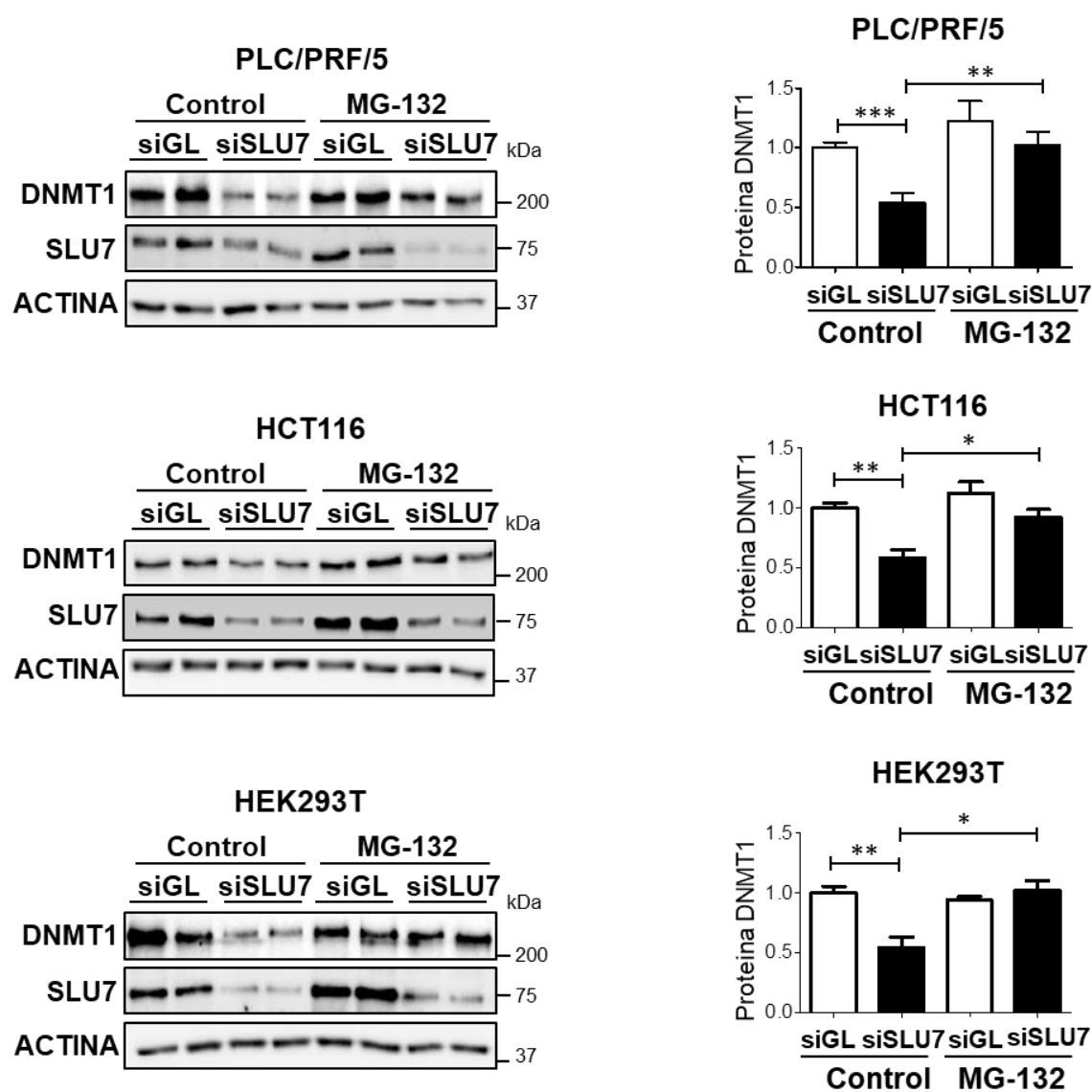


Figura 40. El silenciamiento de SLU7 favorece la degradación proteica de DNMT1 mediada por el proteasoma. Las células PLC/PRF/5 y HEK293T fueron transfectadas con el siRNA control (siGL) o siSLU7 durante 48 horas y tratadas con 10 μ M de MG-132 durante las últimas 20 horas. Las células HCT116 fueron transfectadas con siGL o siSLU7 durante 36 horas y tratadas con 20 μ M de MG-132 durante las últimas 12 horas. En las tres líneas celulares se analizaron los niveles proteicos de DNMT1 y SLU7 por *Western blot*. La expresión de actina se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína de DNMT1 se cuantificaron utilizando el *software ImageJ*, la cuantificación corresponde al menos a tres experimentos independientes realizados con duplicados biológicos para cada condición (histogramas en el panel de la derecha). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

El MG-132 es un péptido aldehído que bloquea eficazmente la actividad proteolítica del complejo del proteasoma 26S²⁵⁰. Para ello, transfectamos las líneas tumorales PLC/PRF/5 y HCT116 y la línea celular no transformada HEK293T con siGL y siSLU7 durante 48 o 36 horas y las tratamos con MG-132 durante las últimas 12 o 20 horas de transfección (Figura 40). Como podemos observar en la figura 40, la reducción de los niveles proteicos de DNMT1 observada tras el silenciamiento de SLU7 se ve significativamente disminuida en presencia del inhibidor del proteasoma en las tres líneas celulares analizadas.

En conjunto, estos datos indican que SLU7 es necesario para mantener la estabilidad proteica de DNMT1 impidiendo su degradación, a través de mecanismos que se conservan entre líneas celulares transformadas de diferentes orígenes y células no transformadas en proliferación.

5. IDENTIFICACIÓN DE SLU7 COMO UN NUEVO MIEMBRO ESENCIAL PARA LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EPIGENÉTICO DNMT1/UHRF1/G9a

Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de SLU7 no solo reduce de manera significativa los niveles de la proteína DNMT1 (Figura 29 y 35), sino también los niveles globales de 5-mC (Figura 16 y 17). Como se ha explicado en la introducción, aunque DNMT1 es la enzima directamente encargada de mantener el patrón de metilación del DNA durante la división celular, no actúa sola, sino que lo hace formando complejos con otras proteínas¹³⁴. En concreto, el complejo canónico encargado de metilar las CpGs hemimetiladas generadas durante la replicación del DNA es el complejo DNMT1/UHRF1/G9a¹⁰⁴. La proteína UHRF1 mediante su dominio SRA reconoce los dinucleótidos CpGs hemimetilados⁹², y mediante su dominio PHD reconoce la marca de la H3 di- o tri-metilada (H3K9me2/3)¹⁰⁰. Ambos mecanismos son críticos para la correcta localización de UHRF1 en la cromatina y el posterior reclutamiento de DNMT1 y G9a a su lugar de acción. Por ello, decidimos evaluar la posible relación de SLU7 con el complejo DNMT1/UHRF1/G9a.

5.1. SLU7 interacciona con DNMT1

En primer lugar, nos preguntamos si SLU7 y DNMT1 interactúan entre sí físicamente. Para responder a esta pregunta se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando extracto total de proteínas en 5 líneas celulares proliferantes (PLC/PRF/5, HCT116, MCF7, H358 y HEK293T), inmunoprecipitando con un anticuerpo anti-SLU7 y revelando *el Western blot* con anticuerpo anti-DNMT1. Como se observa en el panel superior de la Figura 41, SLU7 interacciona con DNMT1. Esta interacción se confirmó inmunoprecipitando con un anticuerpo anti-DNMT1 y revelando con anti-SLU7 (panel inferior de la Figura 41).

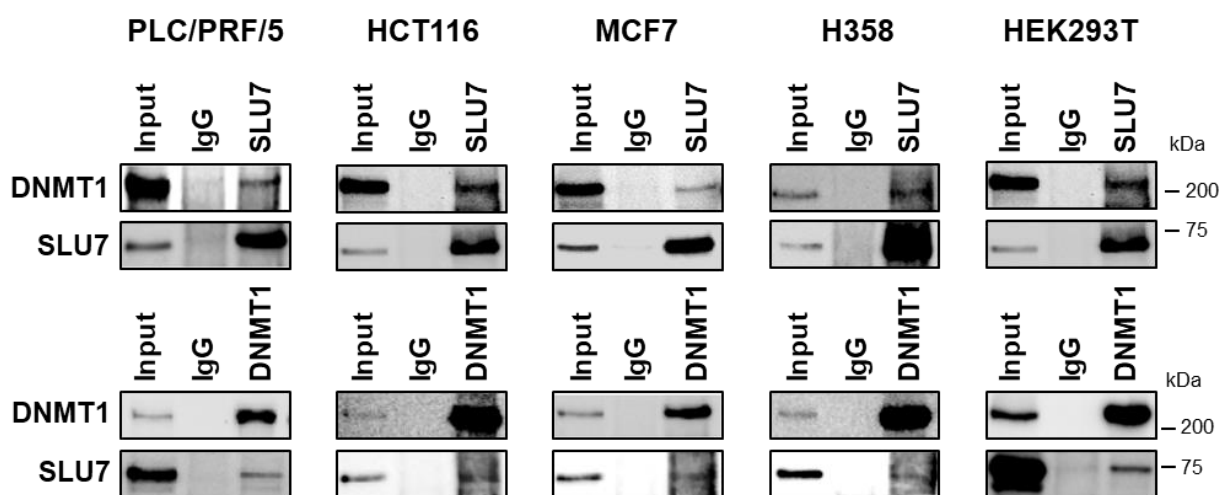


Figura 41. SLU7 interacciona con DNMT1. SLU7 y DNMT1 fueron co-inmunoprecipitados en células PLC/PRF/5, HCT116, MCF7, H358 y HEK293T con anticuerpos anti-SLU7 (arriba) y anti-DNMT1 (abajo). La inmunoprecipitación con la inmunoglobulina control (IgG de ratón) y los inputs (extracto total) se muestran como controles.

5.2. SLU7 interacciona en la cromatina con todos los miembros del complejo de metilación del DNA: DNMT1/UHRF1/G9a

Una vez confirmada la interacción entre SLU7 y DNMT1 en extracto total de proteína, y teniendo en cuenta que el silenciamiento de SLU7 provoca una hipometilación global, nos preguntamos si la interacción SLU7-DNMT1 tenía lugar en el contexto del complejo epigenético localizado en la cromatina^{92,97,251}.

En primer lugar, aislamos las diferentes fracciones subcelulares, el citoplasma, el nucleoplasma y la fracción unida a la cromatina en la línea celular PLC/PRF/5. Como era de esperar, tanto SLU7 como DNMT1, G9a y UHRF1 se localizaban predominantemente en la fracción unida a la cromatina (Figura 42A). Además, el ensayo de co-inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-SLU7 y anti-DNMT1 en la fracción de cromatina, confirmó la interacción entre SLU7 y DNMT1 en este compartimento, y reveló que SLU7 también interacciona con G9a y UHRF1 en la cromatina (Figura 42B).

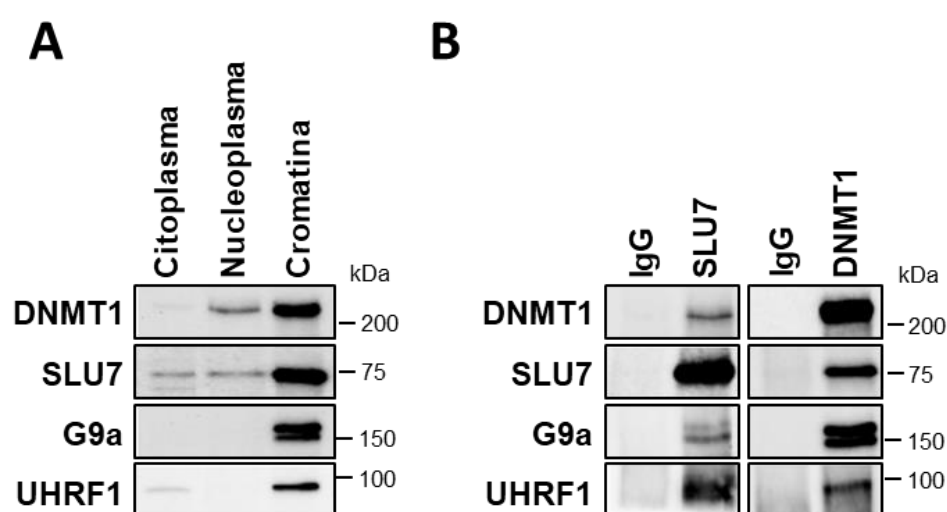


Figura 42. SLU7 interacciona con el complejo de mantenimiento de la metilación del DNA (DNMT1/UHRF1/G9a) en la cromatina. (A) Análisis por *Western blot* de las proteínas DNMT1, SLU7, G9a y UHRF1 en el fraccionamiento subcelular, citoplasma, nucleoplasma y fracción unida a la cromatina, de las células PLC/PRF/5. **(B)** Ensayo de co-inmunoprecipitación en el extracto proteico de la fracción subcelular unida a la cromatina con anticuerpos anti-SLU7 y anti-DNMT1 o IgG de ratón (como control) y revelado por *Western blot* con anticuerpos anti-DNMT1, anti-SLU7, anti-G9a y anti-UHRF1.

5.3. SLU7 regula los niveles proteicos de G9a y UHRF1

Dado que el silenciamiento de SLU7 reduce los niveles de la proteína DNMT1, y SLU7 interacciona con DNMT1 y las proteínas UHRF1 y G9a, nos preguntamos si los niveles proteicos del resto de los miembros del complejo de mantenimiento de la metilación del DNA también dependen de la expresión de SLU7. Por ello, en primer

lugar, analizamos los niveles de las proteínas DNMT1, G9a y UHRF1 en la fracción unida a la cromatina en las células PLC/PRF/5 tras ser transfectadas con siGL y siSLU7 durante 48 horas. Como control de fracción unida a la cromatina se analizó la expresión de PCNA y de la histona H3. El *Western blot* reveló una marcada reducción de los niveles de DNMT1, G9a y UHRF1 en la fracción de cromatina en aquellas células en las que la expresión de SLU7 había sido silenciada (Figura 43). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la expresión de SLU7 para el correcto mantenimiento de la metilación del DNA, ya que SLU7 no solo interacciona con el complejo DNMT1/G9a/UHRF1, sino que la asociación de los miembros de este complejo proteico a la cromatina es estrictamente dependiente de la expresión de SLU7.

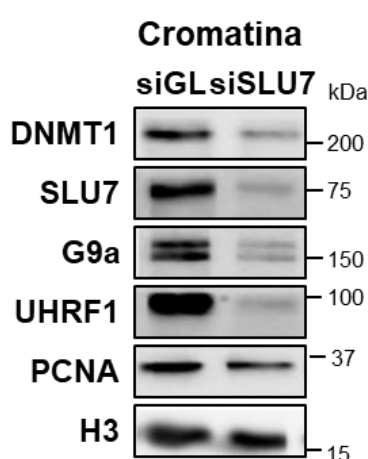


Figura 43. SLU7 regula la presencia en la cromatina de los miembros del complejo de mantenimiento de la metilación del DNA. El extracto proteico unido a la cromatina de las células PLC/PRF/5 48 horas después de la transfección con siSLU7 se analizó mediante *Western blot* con anticuerpos contra DNMT1, SLU7, G9a y UHRF1. La expresión de PCNA y de la histona 3 (H3) se utilizaron como control.

Por último, y con el objetivo de entender la relevancia de la expresión de SLU7 en el mantenimiento de los niveles de DNMT1, nos preguntamos si la estabilidad de DNMT1 también estaba gobernada por los otros miembros del complejo (UHRF1 y G9a). Trabajos previos habían descrito que aunque la reducción de los niveles de G9a y UHRF1 impedía el correcto mantenimiento de los patrones de metilación, no

afectaban a la abundancia de la proteína DNMT1^{92,97,252}. De acuerdo con ello, nuestros resultados mostraron que los silenciamientos de G9a y UHRF1 con siRNAs específicos en las células PLC/PRF/5 y HCT116 no alteraban de forma llamativa los niveles proteicos de DNMT1 (Figura 44).

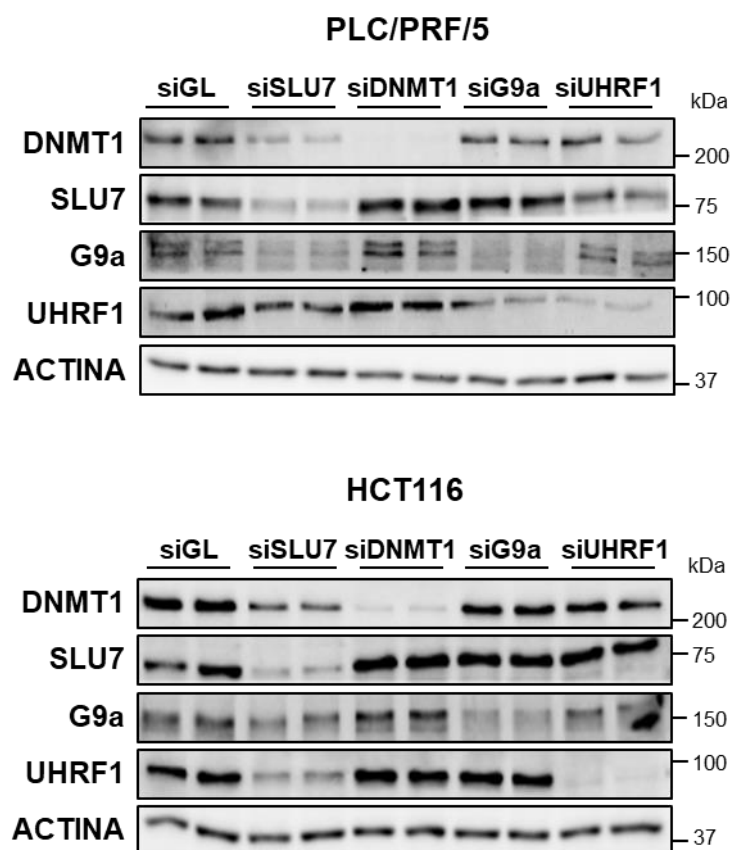


Figura 44. SLU7 es el único miembro del complejo de mantenimiento de la metilación del DNA capaz de regular de forma relevante los niveles proteicos del resto de los miembros. Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína de DNMT1, SLU7, G9a y UHRF1 en las células PLC/PRF/5 y HCT116 48 horas después de la transfección con el control siGL, siSLU7, siDNMT1, siG9a y siUHRF1. La expresión de actina se utilizó como control de carga.

Además, podemos especular que el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre la estabilidad de DNMT1 tampoco estaría relacionado con su liberación de la cromatina, ya que se ha descrito que el silenciamiento de UHRF1 reduce la asociación de DNMT1 a la cromatina sin afectar a sus niveles totales⁹². Llamativamente nuestros resultados también evidenciaron que SLU7 es necesario para mantener los niveles globales de las proteínas G9a y UHRF1 (Figura 44).

Por tanto, estos resultados demuestran por primera vez que SLU7 no solo interacciona con el complejo encargado del mantenimiento de la metilación del DNA, sino que la integridad de este complejo es totalmente dependiente de la expresión de SLU7.

6. EL SILENCIAMIENTO DE SLU7 INDUCE LA ACETILACIÓN DE DNMT1

Se ha descrito una gran cantidad de mecanismos intrínsecos y extrínsecos que regulan la expresión, la estabilidad y la actividad de DNMT1. En concreto, entre los mecanismos que regulan los niveles proteicos de DNMT1, incrementando su estabilidad o por el contrario induciendo su degradación, cabe destacar las modificaciones postraduccionales incluyendo fosforilaciones^{108,128}, metilaciones¹²⁶ y acetilaciones^{125,129-131,253}, que marcan a DNMT1 para la posterior ubiquitinización o desubiquitinización^{125,129,131,132}. Por ejemplo, la fosforilación de la serina 143 (S143) por parte de la quinasa AKT1¹²⁸ estabiliza a DNMT1, mientras que la monometilación de la lisina 142 (K142) por parte de la histona metiltransferasa SET7¹²⁶ induce la ubiquitinación y degradación de DNMT1. Se trata de dos modificaciones postraduccionales en aminoácidos consecutivos (K142 y S143), mutuamente excluyentes, que regulan la cantidad de DNMT1 durante el ciclo celular¹²⁸. Además, se han descrito acetilaciones en distintas lisinas de DNMT1^{130,131,253} capaces de estabilizar o desestabilizar a DNMT1. Entre las enzimas implicadas en la acetilación y desacetilación de DNMT1 se encuentran las histonas acetiltransferasas Tip60, p300 y PCAF y las histonas deacetilasas SIRT1 y HDAC1¹²⁵. Asimismo, se ha descrito que las proteínas que incorporan o eliminan las modificaciones químicas a DNMT1 interaccionan con ella^{127,134}. Nuestros resultados demuestran que SLU7 interacciona con DNMT1. En este contexto, decidimos explorar qué modificación química podría estar induciendo la degradación de DNMT1 tras la reducción de la expresión de SLU7.

6.1. El silenciamiento de SLU7 reduce los niveles de la isoforma de DNMT1 truncada en su extremo aminoterminal

Tanto la fosforilación de la S143 como la metilación de la K142 mencionadas, tienen lugar en la región aminoterminal de DNMT1 que se pierde en la isoforma truncada de la proteína DNMT1 generada en las células HCT116 DNMT1^{-/-}. Se trata de una línea celular derivada de las células de cáncer de colon HCT116 en la que se expresa una proteína de DNMT1 truncada obtenida por la delección homocigótica de los exones 2-5^{229,232} (Figura 45A y B).

Por ello, para valorar el papel de esas modificaciones postraduccionales, en la estabilización de SLU7, comenzamos evaluando el efecto del silenciamiento de la expresión de SLU7 sobre los niveles de la isoforma truncada de DNMT1 generada en estas células.

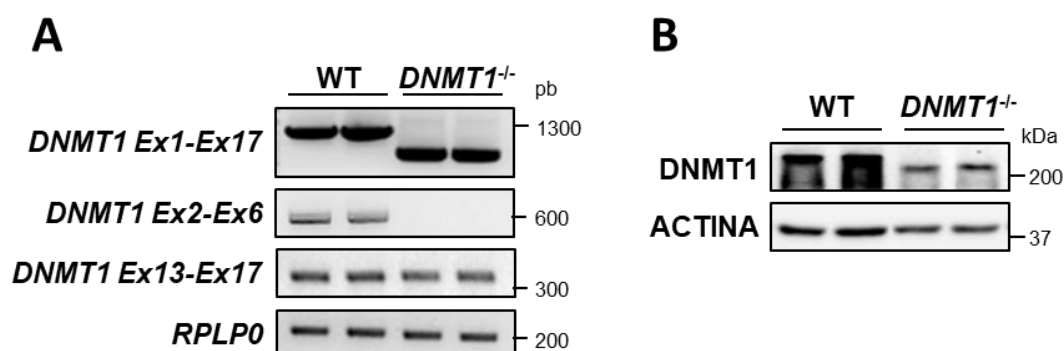


Figura 45. Análisis de la expresión de la proteína truncada de DNMT1 en las células HCT116 DNMT1^{-/-}. (A) Validación de la correcta transcripción de *DNMT1* en las células HCT116 control (WT) y las células mutadas de *DNMT1^{-/-}* mediante PCR y posterior electroforesis, utilizando cebadores situados en: el exón 1 y exón 17, para comprobar la diferencia de tamaño del mRNA; el exón 2 y el exón 6, para demostrar la delección de los exones 2-5 de *DNMT1* en las células HCT116 DNMT1^{-/-}; el exón 13 y 17 para verificar la transcripción de *DNMT1* en ambas líneas celulares. La expresión de *RPLP0* se analizó como control. (B) Análisis por *Western blot* de la proteína de DNMT1 con un anticuerpo dirigido al extremo C-terminal en las células HCT116 WT y HCT116 DNMT1^{-/-}. La expresión de actina se muestra como control de carga. Se observa el menor tamaño de DNMT1 en las células HCT116 DNMT1^{-/-}.

Como se muestra en la Figura 46A, y de forma similar a lo previamente observado (Figura 35), la reducción de la expresión de SLU7 en las células HCT116 DNMT1^{-/-} provocó una disminución de los niveles proteicos de la isoforma truncada de DNMT1, observables ya a las 24 horas de la transfección con siSLU7 (Figura 46A) sin afectar a los niveles de expresión de su mRNA (Figura 46B).

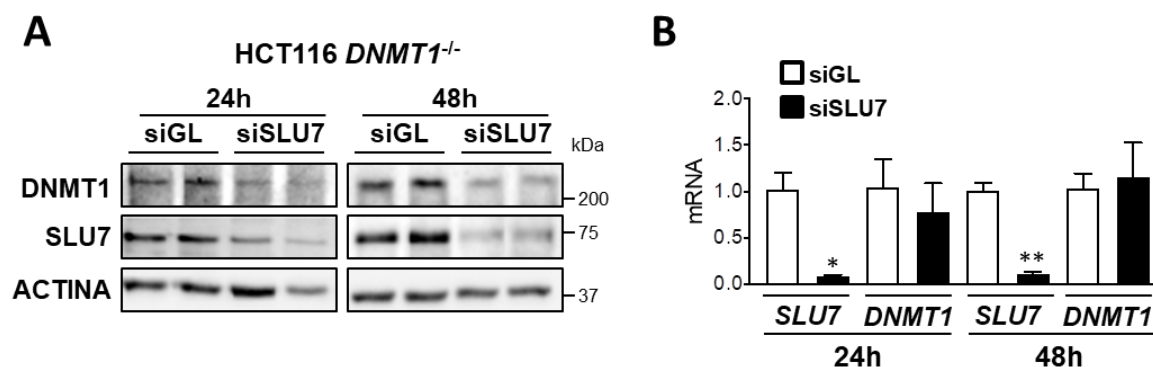


Figura 46. SLU7 es necesario para mantener la estabilidad proteica de la isoforma de DNMT1 truncada en el extremo aminoterminal. (A) Western blot de DNMT1 y SLU7 en células HCT116 DNMT1^{-/-} 24 y 48 horas después de la transfección con siSLU7 y siGL (como control). La expresión de actina se utilizó como control de carga. **(B)** Niveles de expresión del mRNA de SLU7 y DNMT1 mediante PCR en tiempo real en las células HCT116 DNMT1^{-/-} 24 y 48 horas después de la transfección con siSLU7 y siGL. La expresión de RPLPO se utilizó como gen de control. Se representa la media de tres experimentos realizados con duplicados biológicos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Estos resultados sugieren que la regulación de la estabilidad proteica de DNMT1 por parte de SLU7 no depende de las modificaciones postraduccionales que tienen lugar en la región aminoterminal, ya que dicha región está ausente en la proteína DNMT1 truncada expresada en la línea celular HCT116 DNMT1^{-/-}.

6.2. La reducción de la expresión de SLU7 aumenta los niveles de acetilación de la proteína DNMT1

Continuamos explorando la posible implicación de la acetilación como modificación postraduccional responsable de la degradación de DNMT1 tras el silenciamiento de la expresión de SLU7. Para ello realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la proteína DNMT1 endógena y revelamos el *Western blot* con el anticuerpo anti-acetil-lisina en las células PLC/PRF/5 y HEK293T control y tras silenciar la expresión de SLU7 durante 36 horas. Además, para evitar la degradación de DNMT1 y poder así analizar sus modificaciones postraduccionales tratamos las células con el inhibidor del proteasoma MG-132 durante las últimas 20 horas de cultivo.

Como se muestra en la Figura 47, la reducción de los niveles de SLU7 indujo un incremento de la acetilación de DNMT1 tanto en las células PLC/PRF/5 como en las HEK293T (Figura 47). En este escenario, se ha descrito que la acetilación de DNMT1 impide su interacción con la proteína USP7, enzima encargada de desubiquitar y por tanto estabilizar a DNMT1¹³¹. De acuerdo con ello, observamos una disminución en la interacción USP7-DNMT1 en las células silenciadas con SLU7 (Figura 47), confirmando que DNMT1 está más acetilada en estas células.

El conjunto de estos resultados sugiere que la disminución de los niveles de SLU7 induce una mayor acetilación de DNMT1, impidiendo por tanto su interacción con USP7 y facilitando su degradación.

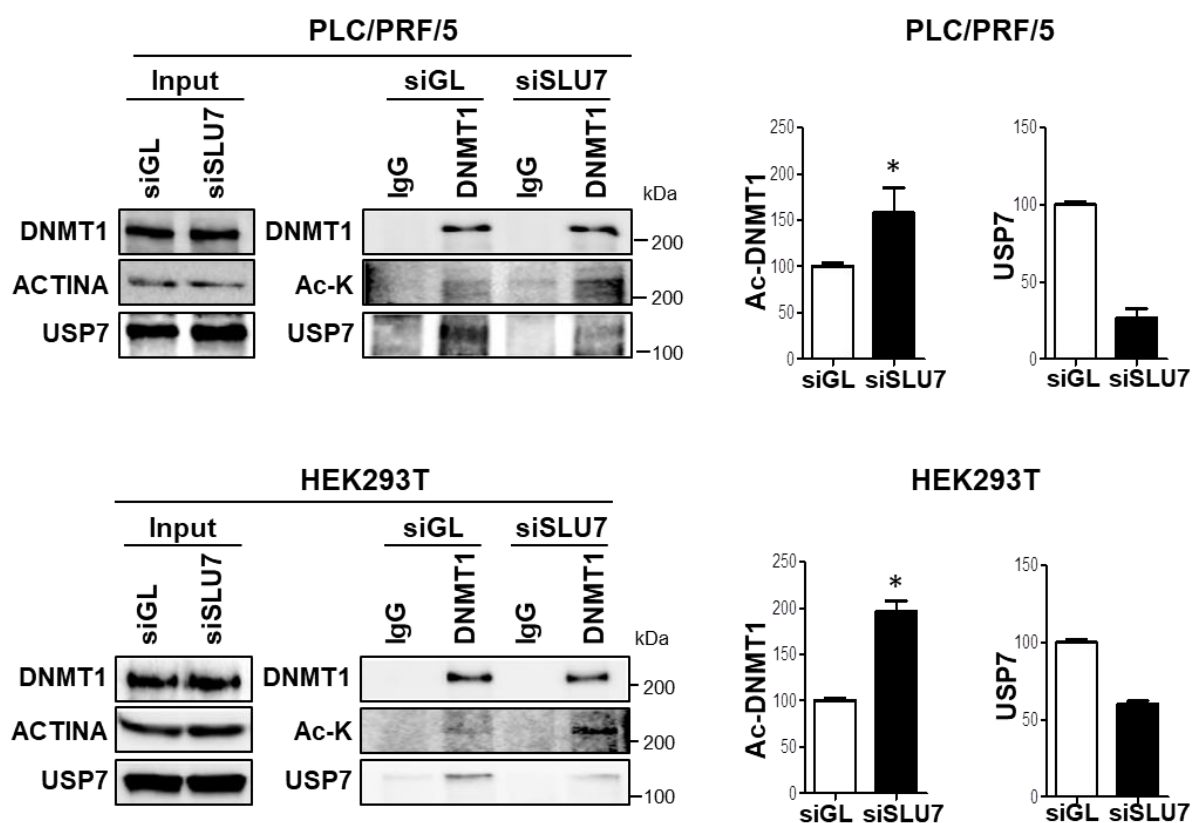


Figura 47. El silenciamiento de SLU7 induce la acetilación de DNMT1 y reduce su interacción con USP7. Ensayo de inmunoprecipitación de la proteína DNMT1 y revelado con anticuerpos anti-acetil-lisina (Ac-K), DNMT1 y USP7 en las células PLC/PRF/5 y HEK293T transfectadas durante 36 horas con el siRNA control siGL y siSLU7 y tratadas con MG-132 (10 μ M) durante las últimas 20 horas. Los inputs se muestran como controles de extracto total, y la inmunoprecipitación realizada con la IgG de ratón como control negativo. Los niveles de acetilación de DNMT1 y de USP7 se cuantificaron en cuatro y dos experimentos independientes respectivamente utilizando el *software ImageJ*. * $P < 0,05$.

6.3. SLU7 es necesario para la interacción entre las proteínas DNMT1 y HDAC1

Nuestros resultados mostraban que DNMT1 estaba más acetilada en las células en las que se había silenciado la expresión de SLU7. Por ello, nos planteamos dos hipótesis: (1) que la expresión de SLU7 impedía la acetilación de DNMT1 o; (2) que la reducción de los niveles de SLU7 impedía que DNMT1 se desacetilara. En concreto, se

ha descrito que HDAC1 interacciona con DNMT1, la desacetila y la protege de la degradación por el proteasoma^{129,254}. De acuerdo con ello, la inhibición de HDAC1 durante 48 horas en las células PLC/PRF/5 con un siRNA específico (Figura 48A) provoca una disminución de los niveles de la proteína DNMT1 (Figura 48B) similares a los inducidos tras el silenciamiento de la expresión de SLU7.

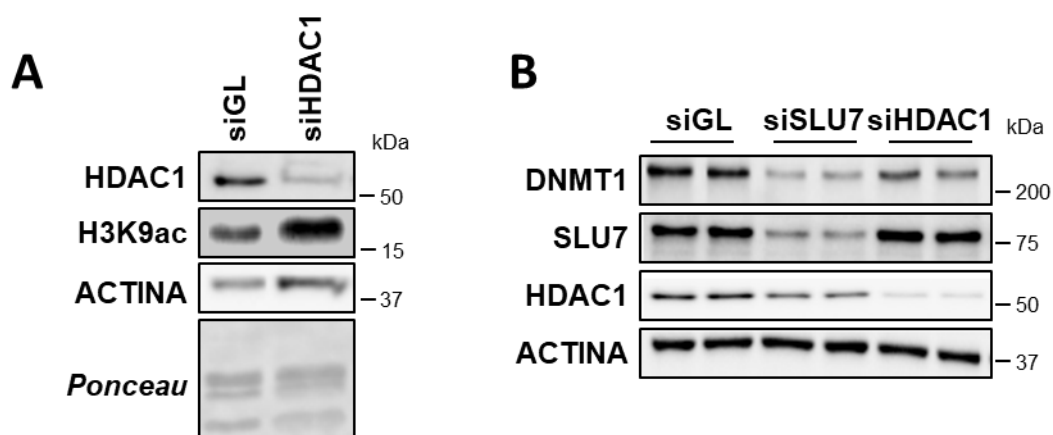


Figura 48. El silenciamiento de HDAC1 produce una disminución de los niveles proteicos de DNMT1 similar al silenciamiento de SLU7. (A) *Western blot* de HDAC1 en células PLC/PRF/5 48 horas después del silenciamiento con un siRNA específico para HDAC1. Se muestra la acetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9ac) como control de inhibición de la actividad de HDAC1. La tinción de *Ponceau* de las histonas y la expresión de actina fueron utilizados como controles de carga. **(B)** Análisis de la disminución de los niveles de la proteína DNMT1 mediante *Western blot* en las células PLC/PRF/5 48 horas después del silenciamiento de la expresión de SLU7 y HDAC1. La expresión de actina se muestra como control de carga.

Como se observa en la Figura 48B, el silenciamiento de SLU7 resultó en una ligera reducción de los niveles de HDAC1 a las 48 horas del silenciamiento.

Para excluir un posible papel de la ligera caída de la expresión de HDAC1 en la degradación de DNMT1 inducida tras el silenciamiento de SLU7, estudiamos el posible efecto de rescate de la sobreexpresión de HDAC1 en las células silenciadas de SLU7. Para ello, las células PLC/PRF/5 se transfectaron durante 36 horas simultáneamente con siSLU7 y un plásmido específico para sobreexpresar HDAC1.

En paralelo se analizó el efecto del plásmido control (pcDNA3.1) (Figura 49A). Como se muestra en la Figura 49B, la expresión ectópica de HDAC1 no rescató la caída de DNMT1 observada en las células silenciadas de SLU7.

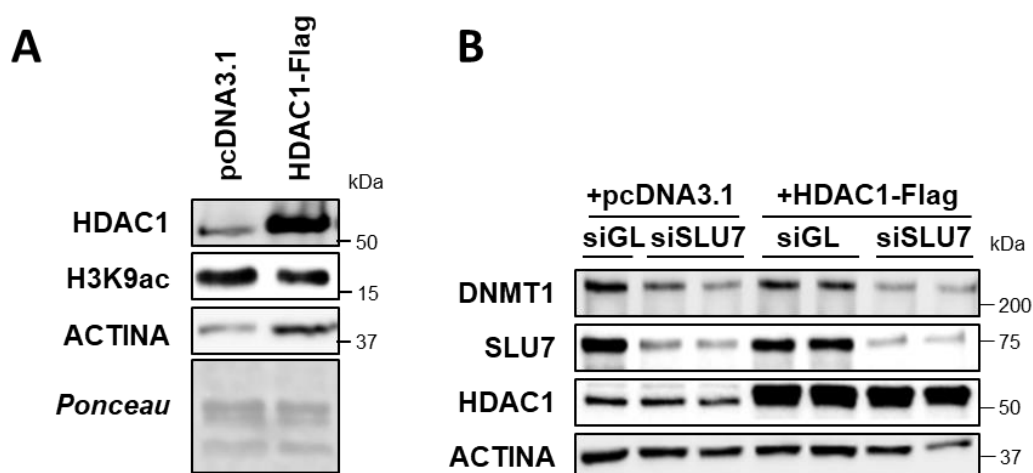


Figura 49. La sobreexpresión de HDAC1 no rescata la caída de DNMT1 inducida tras el silenciamiento de SLU7. (A) *Western blot* de HDAC1 en células PLC/PRF/5 36 horas después de la sobreexpresión de HDAC1 con un plásmido específico (HDAC1-Flag) y un plásmido control (pcDNA3.1). Se muestra la acetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9ac) como control de la actividad desacetilasa de HDAC1. La tinción de *Ponceau* de las histonas y la expresión de la actina fueron utilizados como controles de carga. (B) Los niveles de las proteínas DNMT1, SLU7 y HDAC1 se analizaron mediante *Western blot* en las células PLC/PRF/5 36 horas después de la transfección con el control siGL o el siSLU7 en presencia del plásmido vacío pcDNA3.1 o del plásmido para expresar HDAC1 (HDAC1-flag). Se utilizó la expresión de la actina como control de carga.

Dado que la sobreexpresión de HDAC1 no impide la degradación de DNMT1 en las células silenciadas de SLU7, nos planteamos si SLU7 pudiera ser necesario para la interacción entre DNMT1 y HDAC1, facilitando así la desacetilación y estabilización de DNMT1 mediada por HDAC1. Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar, analizamos si SLU7 formaba un complejo con DNMT1 y HDAC1. En la Figura 50 podemos observar la interacción entre SLU7, DNMT1 y HDAC1 a nivel de la cromatina en las células PLC/PRF/5.

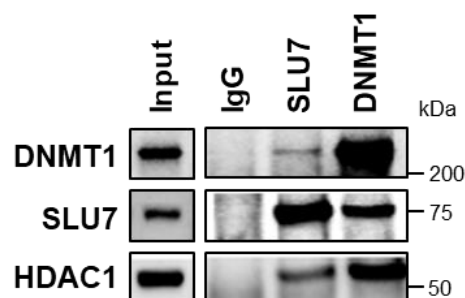


Figura 50. DNMT1, SLU7 y HDAC1 interactúan entre sí. Ensayo de co-inmunoprecipitación de la fracción subcelular correspondiente a las proteínas unidas a la cromatina con anticuerpos anti-SLU7 y anti-DNMT1 o con IgG de ratón (como control) en las células PLC/PRF/5 y revelado con anticuerpos anti-DNMT1, SLU7 y HDAC1. Se muestra el Input como control de extracto total.

En este punto decidimos estudiar la interacción entre DNMT1 y HDAC1 tras el silenciamiento de SLU7. Como se observa en la Figura 51, los ensayos de co-inmunoprecipitación con DNMT1 en la línea celular PLC/PRF/5 transfectada con siGL y siSLU7 durante 36 horas, demostraron que el silenciamiento de SLU7 reduce significativamente la interacción entre DNMT1 y HDAC1 (Figura 51A y B).

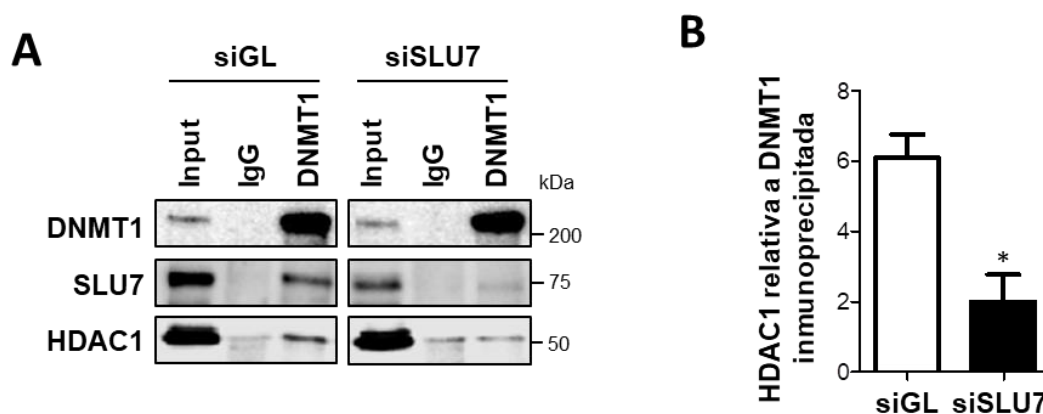


Figura 51. SLU7 es necesario para la interacción entre DNMT1 y HDAC1. (A) Los extractos de las células PLC/PRF/5 36 horas después de la transfección con siGL y siSLU7 se sometieron a inmunoprecipitación de DNMT1 y se analizaron por *Western blot* con anticuerpos contra DNMT1, SLU7 y HDAC1. La inmunoprecipitación con la IgG de ratón y los inputs se utilizaron como controles. (B) La interacción DNMT1-HDAC1 se cuantificó mediante el *software ImageJ* en tres experimentos independientes, incluido el del panel A. * $P < 0,05$.

Todos estos datos sugieren que SLU7 es necesario para que HDAC1 se una a DNMT1, favoreciendo así la desacetilación de DNMT1 y evitando su degradación por el proteasoma.

7. SLU7 ES NECESARIO PARA LA ESTABILIDAD DE DNMT1 *IN VIVO*

Hasta el momento, todos nuestros datos muestran que SLU7 es necesario para asegurar la estabilidad proteica de DNMT1, mantener la integridad del complejo DNMT1/G9a/UHRF1 y por tanto mantener una correcta metilación global del DNA y una correcta expresión génica en múltiples líneas celulares proliferantes *in vitro*.

Por ello, 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 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 perdida²⁵⁵. Esta capacidad proliferativa, aunque ya no sincronizada, se observa también en respuesta a un daño hepático agudo o crónico²⁵⁶. Por todo ello, decidimos utilizar estos escenarios de proliferación *in vivo* para estudiar si SLU7 es también necesario para mantener la estabilidad de la proteína DNMT1 *in vivo*.

7.1. SLU7 es necesario para mantener los niveles proteicos adecuados de DNMT1 tras una hepatectomía parcial

El primer escenario de proliferación *in vivo* consistió en un modelo de regeneración hepática tras una hepatectomía parcial (HP) del 70 %. En estudios previos describimos que los niveles endógenos de SLU7 caen rápidamente, pero de manera transitoria tras la HP, recuperándose ya a las 3 horas y siendo SLU7 esencial para la correcta progresión de los hepatocitos en el ciclo celular y por tanto en la recuperación de la masa hepática¹⁹³. Además, está descrito que los niveles de DNMT1 se ven inducidos durante la progresión del ciclo celular, adquiriendo un protagonismo funcional. De hecho, en modelos de ratón se ha demostrado que *DNMT1* es necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica, la madurez funcional y la capacidad regenerativa de los hepatocitos¹⁵⁰.

La inhibición de la expresión de SLU7 se realizó utilizando AAV desarrollados por nuestro grupo^{193,194}, que expresan un shRNA específico de SLU7 (AAV-shSLU7) o un shRNA control (AAV-Ren) bajo el control de un promotor hepatoespecífico. A los 21 días de la administración de los AAVs, a los ratones se les realizó una HP de 2/3 o una cirugía control (SHAM), que supone una laparotomía y la exposición del hígado sin realizar su escisión. Los ratones se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas tras la operación (Figura 14).

De acuerdo con lo descrito²⁵⁷, nuestros datos mostraron que los niveles de mRNA de *Dnmt1* se ven inducidos tras las 24, 48 y 72 horas de la realización de la HP, y esto ocurría tanto en los ratones control (AAV-Ren) como en los ratones a los que habíamos inhibido la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7) (Figura 52A). Sin embargo, el aumento de los niveles de la proteína DNMT1 observado en los ratones AAV-Ren control, a las 48 y 72 horas tras la HP, fue mucho menor en los ratones AAV-shSLU7 (Figura 52B).

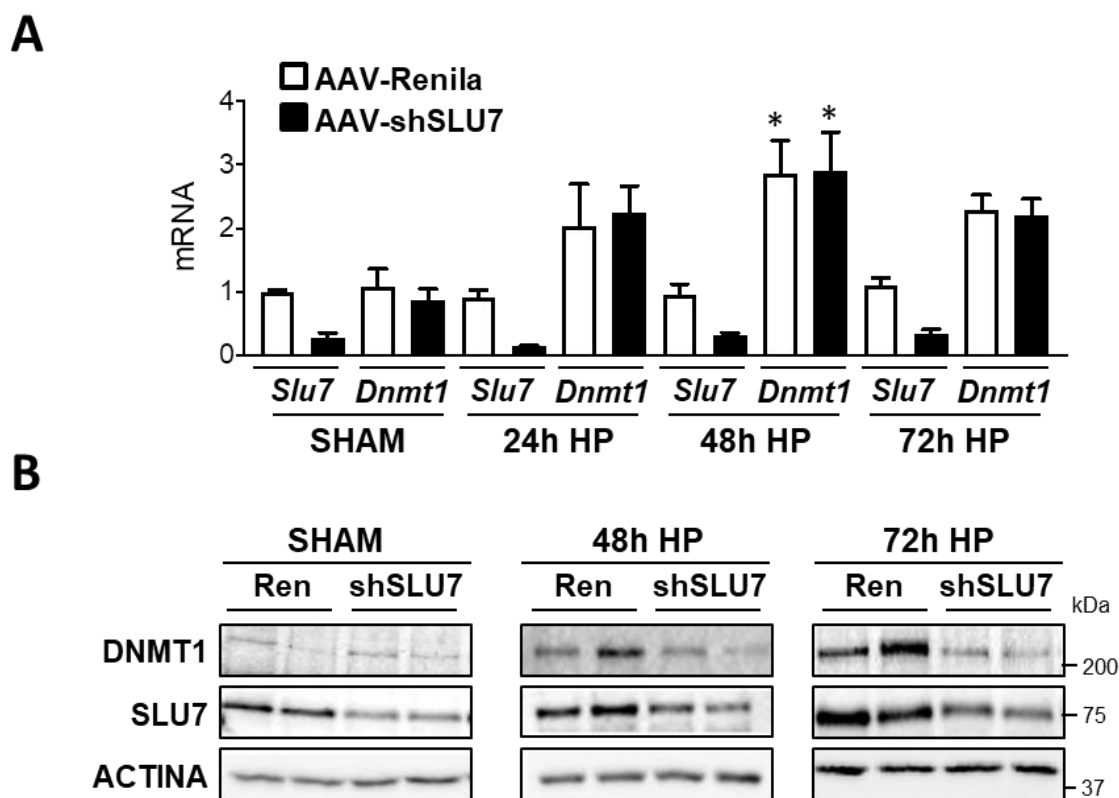


Figura 52. SLU7 es necesario para garantizar la estabilidad de la proteína DNMT1 hepática *in vivo* tras una hepatectomía parcial. (A) Análisis mediante PCR a tiempo real de los niveles de mRNA de *Slu7* y *Dnmt1* en el hígado de ratones 24, 48 y 72 horas después de la realización de una hepatectomía parcial (HP) del 70 % o una cirugía control (SHAM) en ratones con SLU7 silenciado en el hígado (AAV-shSLU7) o ratones control (AAV-Ren) a los 21 días de la inyección de los virus adenoasociados (AAV) (n = 5 ratones por grupo). La expresión de *Rplp0* fue utilizada como control. **(B)** Análisis por *Western blot* de los niveles de las proteínas DNMT1 y SLU7 en el hígado de los ratones AAV-shSLU7 y AAV-Ren a las 48 y 72 horas tras la realización de la hepatectomía parcial (HP) o las 48h de la operación control (SHAM). Se muestra la expresión de la actina como control de carga.

Con objeto de probar si esta alteración en la expresión de DNMT1 observada tras el silenciamiento de SLU7 tenía consecuencias funcionales, y en base a los resultados obtenidos *in vitro*, analizamos los niveles de expresión del gen de la impronta *H19* como ejemplo. De igual forma que observamos *in vitro* (Figura 28A), la expresión de *H19* se inducía en los ratones AAV-shSLU7 en comparación con los ratones control (Figura 53).

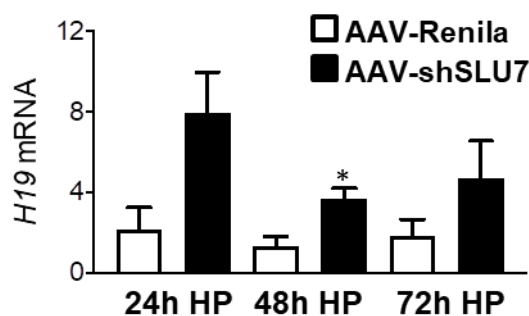


Figura 53. El silenciamiento de SLU7 *in vivo* induce la expresión de genes normalmente hipermetilados en el hígado. Expresión del mRNA del gen de la impronta *H19* analizada por PCR a tiempo real en el hígado de ratones AAV-Ren y AAV-shSLU7 24, 48 y 72 horas después de la realización de una hepatectomía parcial (HP) del 70 %. Utilizamos *Rplp0* como gen control de expresión constitutiva. * $P < 0,05$.

Estos datos muestran que SLU7 es necesario para mantener la estabilidad de la proteína DNMT1 y el correcto mantenimiento de la metilación del DNA durante la regeneración hepática inducida por una HP en ratones.

7.2. SLU7 es necesario para mantener los niveles proteicos de DNMT1 en modelos de daño hepático inducido por CCl₄.

Tras los resultados obtenidos en el modelo de regeneración tras hepatectomía parcial, decidimos estudiar la dependencia de la estabilidad de la proteína DNMT1 por la expresión de SLU7 en otros dos modelos de proliferación hepática asociados a la inducción de una lesión hepática aguda o crónica tras la administración de la hepatotoxina tetracloruro de carbono (CCl₄; Figura 15A y 15B). Este compuesto causa

estrés oxidativo y la muerte de los hepatocitos activando una respuesta inflamatoria y la regeneración de los hepatocitos^{258,259}. El daño agudo se generó a través de la administración de CCl₄ dos veces en una semana y el sacrificio de los ratones a las 24 horas de la segunda inyección, mientras que en el caso de la lesión hepática crónica la administración de CCl₄ se realizó dos veces por semana durante 5 semanas. La primera inyección de la hepatotoxina se realizó a los 15 días de la inhibición de la expresión de SLU7 con AAV-shSLU7 y AAV-Ren como control. Los ratones se sacrificaron a las 48 horas de recibir la última inyección de CCl₄.

Como podemos observar en la figura 54, tanto en la lesión hepática aguda como en la crónica, los niveles de la proteína DNMT1 se indujeron tras el tratamiento con CCl₄, pero esta inducción fue menor en los ratones en los que se silenció la expresión de SLU7 (AAV-shSLU7) comparada con los ratones control infectados con AAV-Ren. Estos resultados nos permiten confirmar el importante papel de SLU7 en el mantenimiento de la estabilidad proteica de DNMT1 en el contexto de la proliferación hepática *in vivo*.

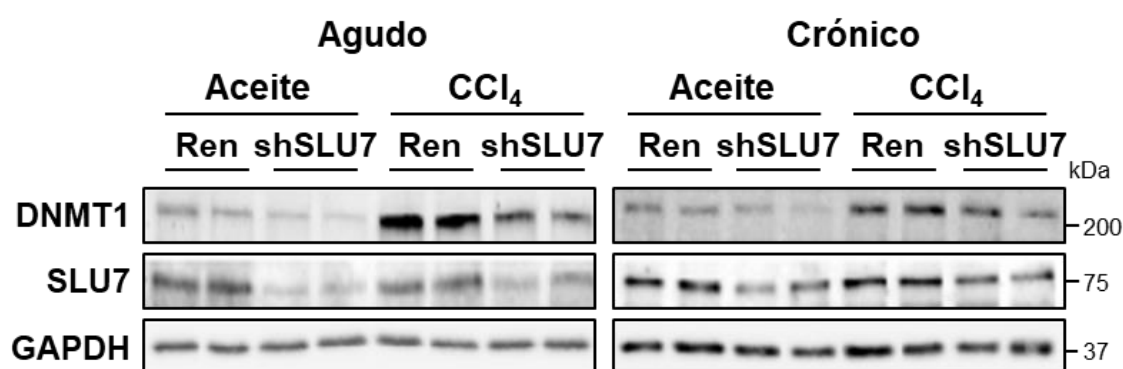


Figura 54. SLU7 es necesario para garantizar la estabilidad de la proteína DNMT1 *in vivo* durante el daño hepático agudo y crónico. Detección mediante *Western blot* de los niveles de proteína DNMT1 y SLU7 en el hígado de ratones AAV-shSLU7 y AAV-Ren después de la inducción de daño hepático agudo o crónico mediante la administración de CCl₄. La expresión de GAPDH se utiliza como control de carga.

7.3. SLU7, DNMT1 y HDAC1 interactúan *in vivo*

Tras confirmar que la disminución de la expresión de SLU7 repercute en la estabilidad de la proteína DNMT1 *in vivo*, decidimos evaluar si los mecanismos moleculares implicados estaban relacionados con los descritos *in vitro*.

Para ello, en primer lugar, comprobamos si DNMT1 y SLU7 interactuaban en el hígado en proliferación, tanto tras la realización de la hepatectomía parcial como tras el tratamiento agudo y crónico con CCl₄. Como se observa en la figura 55, los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados con muestras de hígado de ratón, no solo confirmaron esta interacción, sino que revelaron la interacción *in vivo* de ambas proteínas con HDAC1.

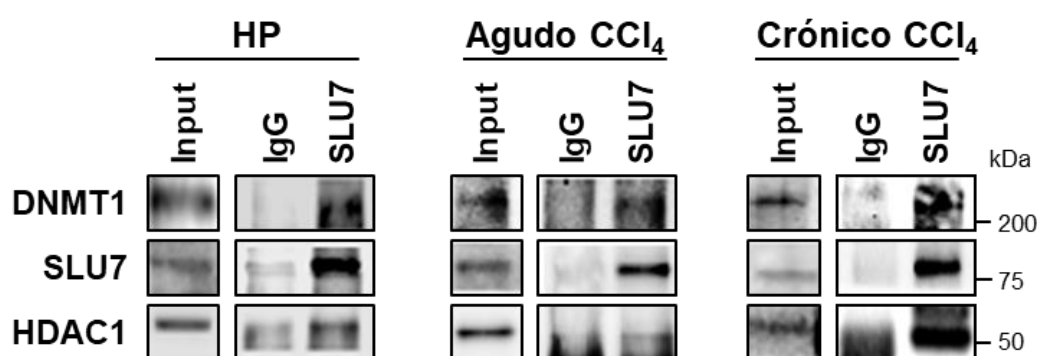


Figura 55. DNMT1, SLU7 y HDAC1 interactúan *in vivo* en distintos modelos de regeneración hepática. Ensayos de co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-SLU7 en el hígado de ratones tras la realización de una hepatectomía parcial (HP) del 70 % y la inducción de daño hepático agudo o crónico mediado por CCl₄. La inmunoprecipitación se reveló con anticuerpos anti-SLU7, anti-DNMT1 y anti-HDAC1. La inmunoprecipitación con IgG control de ratón y los inputs se muestran como control.

El conjunto de estos resultados muestra por primera vez que la presencia del factor de *splicing* SLU7 es esencial para asegurar los altos niveles de la proteína DNMT1 necesarios en distintos escenarios de proliferación *in vivo* y que SLU7 interactúa con DNMT1 y HDAC1 en estas situaciones.

DISCUSIÓN

Una correcta expresión génica es esencial para garantizar la identidad, función y viabilidad celular. Se trata de un proceso dinámico, específico en cada momento del tipo celular, que consta de diferentes etapas. Entre ellas, la remodelación epigenética, la transcripción, el procesamiento de los mRNA, la traducción a proteínas o las modificaciones postraduccionales. Así, los mecanismos de control de la expresión génica son procesos esenciales finamente regulados, coordinados e interconectados entre sí^{260,261}.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el factor de *splicing* SLU7 tiene un papel esencial y no redundante en la regulación de la expresión génica, actuando a varios niveles y a través de diferentes mecanismos que incluyen la regulación de la transcripción, el control de procesos de *splicing* y la regulación de la estabilidad de proteínas. Así, SLU7 controla el *splicing* del gen supresor tumoral *TP73*¹⁹², el transcrito *C13orf25*²²³, la *sororina*¹⁹⁴ y los factores de *splicing* *SRSF3* y *SRSF1*¹⁹⁴, entre otros; regula directamente la transcripción de genes activados por el AMPc¹⁹³; y favorece la estabilidad de la proteína HNF4 α , factor de transcripción fundamental en el mantenimiento del transcriptoma hepático^{193,200,202}. A través de este control del patrón de la expresión génica, hemos demostrado que SLU7 es necesario para asegurar la identidad y función del hígado¹⁹³, para garantizar una protección frente al estrés oxidativo²⁰² y para evitar la inducción de inestabilidad genómica¹⁹⁴. Además, SLU7 es esencial para la correcta regeneración hepática y para la supervivencia de células tumorales de distintos orígenes²²³.

Los resultados que forman parte de la presente tesis demuestran que SLU7 también regula la expresión génica a nivel epigenético, asegurando el correcto mantenimiento de la metilación del DNA. En concreto, nuestros datos muestran que el silenciamiento de la expresión de SLU7 resulta en una alteración del contenido total de 5-mC en células tumorales de distintos orígenes, similar a la observada al reducir los niveles de DNMT1. En este sentido, observamos una marcada hipometilación global del DNA, con una hipermetilación aberrante de determinadas CpGs. Sin embargo, aunque el número y distribución de las CpGs hipometiladas es similar tras los silenciamientos de ambos genes, cuando comparamos los genes y las CpGs

individuales afectadas, sorprendentemente observamos un solapamiento relativamente limitado. Esto podría explicarse por diferentes razones:

(i) En nuestro sistema trabajamos con transfecciones transitorias en cultivos celulares no sincronizados. Eso significa que en cada condición tenemos no sólo células en cualquier fase del ciclo celular, sino también una mezcla de células con expresión normal y silenciada de SLU7 o expresión normal y silenciada de DNMT1.

(ii) La desmetilación del DNA es un proceso pasivo que requiere la división celular, por lo que se produce de manera gradual. Esto se refleja, por ejemplo, cuando se utilizan agentes químicos desmetilantes como el 5-aza-citidina (AZA) o 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC). De hecho, en líneas celulares se ha descrito que el aumento del tiempo y la dosis de tratamiento con dichos agentes desmetilantes, corresponde a mayor inhibición global de la metilación del DNA²⁶², así se observa una reducción del contenido de 5-mC del 50 %, 60 % y 80 % tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento respectivamente²⁶³. De manera que en los casos en los que se pretende inhibir la metilación del DNA, la duración del tratamiento debe prolongarse en el tiempo. Nuestro ensayo de RRBS se realizó 72 horas después de la transfección transitoria con siRNAs dirigidos a SLU7 y DNMT1, ya que la viabilidad de las células siSLU7 se ve comprometida a tiempos posteriores²²³. Podemos especular que, con el tiempo, el solapamiento entre siSLU7 y siDNMT1 sería mayor.

(iii) En sintonía con nuestros resultados, diferentes estudios han demostrado que cuando duplicados experimentales de DNA son tratados con bisulfito, clonados y secuenciados existe una alta variabilidad en los niveles de metilación encontrados en las CpG individuales. Esta heterogeneidad se observa, por ejemplo, cuando las células se someten a condiciones desmetilantes como el tratamiento con AZA²⁶⁴ o el silenciamiento estable de DNMT1^{265,266} o cuando se comparan células en diferentes fases del ciclo celular²⁶⁷. De hecho, nuestros datos muestran el solapamiento entre las células siDNMT1 y siDNMT1+siDNMT3B es similar al encontrado entre las células siSLU7 y siDNMT1, confirmando que la desmetilación del DNA tras la eliminación de DNMT1 y/o DNMT3B es un proceso que se inicia de manera heterogénea.

(iv) Además, cabe destacar que el análisis bioinformático se realizó en condiciones muy restrictivas con el fin de identificar las alteraciones más consistentes. Sin embargo, esta estrategia puede estar limitando el solapamiento. Hemos considerado que una CpG estaba hipometilada en siSLU7 o siDNMT1 respecto al control (siGL), cuando la diferencia de metilación fue igual o superior a 0,6. Por el contrario, en muchos estudios publicados, consideran como metilación diferencial diferencias de 0,1 o 0,2 en el β -value. Así, al analizar nuestros datos del RRBS considerando una diferencia de metilación de 0,4, como era de esperar, encontramos un aumento en el solapamiento de las CpGs individuales y en los genes hipometilados entre las células silenciadas de SLU7 y las silenciadas de DNMT1.

El paralelismo entre el silenciamiento de SLU7 y DNMT1 se ve reforzado por el hecho de que en ambos casos detectamos un reducido porcentaje de CpGs hipermetiladas. Este sorprendente hallazgo de hipermetilación al silenciar DNMT1 ya había sido descrito anteriormente en diversos estudios donde se inhibió la actividad de DNMT1 por sobreexpresión de la proteína 14-3-3¹⁴⁰, se impidió la unión entre DNMT1 y UHRF1 mediante la adición del inhibidor del factor de transcripción LSF (*transcription factor CP2*)²⁶⁸ o incluso se eliminó genéticamente *Dnmt1*¹⁵⁰. Sin embargo, se requieren nuevos estudios para poder entender el mecanismo por el cual la inhibición de DNMT1 o SLU7 induce esta hipermetilación.

Como se ha descrito en la introducción, la metilación del DNA regula la expresión génica. De acuerdo con ello, describimos cómo la hipometilación observada tras el silenciamiento de SLU7 o DNMT1, induce la expresión de diferentes genes silenciados por metilación, como son *TRIM47*, *TFF3* o *DLG3*, el gen supresor de tumores *RASSF1A*, la enzima *GNMT*, genes implicados en inducción de la inmunidad innata y adaptativa o genes regulados por impronta genómica. Dada la heterogeneidad de los genes regulados por SLU7 a través de la metilación del DNA podemos especular que SLU7 controla la metilación del DNA de manera general y no específica o dirigida a un subgrupo concreto de genes. Además, sugiere que modular la expresión de SLU7 podría ser una estrategia para afectar a la expresión de múltiples genes, por ejemplo, para modular la inmunogeneidad.

Con respecto al mecanismo por el cual SLU7 regula la metilación del DNA, nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de SLU7 induce una marcada y rápida caída de los niveles proteicos de DNMT1, no sólo en células de hepatocarcinoma, sino también en células de múltiples orígenes. Inesperadamente, en contra de la función canónica de SLU7, hemos demostrado que esta regulación de DNMT1 no es ni a nivel transcripcional ni a nivel del procesamiento de su mRNA, sino que SLU7 es esencial para mantener la estabilidad de la proteína DNMT1.

De acuerdo con ello, existe un importante solapamiento entre los efectos fenotípicos asociados al silenciamiento de SLU7 y al silenciamiento de DNMT1. Así, DNMT1, al igual que SLU7, (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2385598#phenotypesTab>), es esencial para la supervivencia embrionaria²⁶⁹. Además, como hemos demostrado para SLU7^{193,194}, DNMT1 es necesario para mantener la estabilidad genómica y la madurez funcional de los hepatocitos durante el crecimiento y la regeneración postnatal del hígado¹⁵⁰. Asimismo, la reducción de los niveles de DNMT1 se ha asociado con la inducción de daño en el DNA, la parada del ciclo celular en la fase G2, defectos mitóticos, inestabilidad genómica y apoptosis¹⁴⁸. Como se ha mencionado en la introducción, todos estos eventos también ocurren cuando silenciamos SLU7^{193,194,223}. Aunque aparentemente SLU7 induce un fenotipo más rápido y más fuerte en comparación con el silenciamiento de DNMT1, no podemos excluir que algunos de los efectos observados al silenciar la expresión de SLU7 sean en parte debidos a la pérdida de DNMT1 en estas células.

DNMT1 es la enzima encargada de mantener la metilación del DNA tras la replicación durante la fase S del ciclo celular^{225,226}. De acuerdo con ello, cuando las células están en reposo y por tanto se encuentran fuera del ciclo celular (fase G0), presentan unos niveles mínimos de expresión de DNMT1¹⁴⁵; por el contrario, en escenarios de proliferación celular, cuando las CpGs del DNA recién sintetizado necesitan ser metiladas, la cantidad de DNMT1 se ve aumentada¹⁴⁵. Nuestros datos confirman este cambio en la cantidad de DNMT1 e identifican a SLU7 como esencial para estabilizar los niveles de proteína DNMT1 inducidos en las células en proliferación independientemente de la fase del ciclo celular y del tipo de célula. En este sentido,

demostramos que SLU7 estabiliza la proteína DNMT1 en un amplio panel de líneas celulares tumorales de diferentes orígenes y en la línea celular no transformada HEK293T en proliferación. Así, cuando paramos tanto las células transformadas (PLC/PRF/5) como las no transformadas (HEK293T) en la fase de reposo (fase G0) mediante el cultivo a alta confluencia y la deprivación de suero, no observamos cambios significativos en los niveles de DNMT1 tras el silenciamiento de SLU7.

Llegados a este punto, cabe destacar que existen diferentes estudios que han mostrado resultados discrepantes a cerca del efecto de la reducción de los niveles de DNMT1 sobre la metilación global del DNA^{148,232,270}. Así, se ha descrito un umbral relativamente bajo de la proteína DNMT1 por debajo del cual se produce la pérdida de metilación del DNA. Sin embargo, la reducción de los niveles de DNMT1 por encima de dicho umbral no genera cambios importantes en la metilación del DNA^{252,271}. Este contexto da especial relevancia a SLU7, ya que podemos especular que su silenciamiento provoca una disminución de la proteína DNMT1 en células proliferantes de diferentes orígenes por debajo del umbral, generando así consecuencias funcionales en el mantenimiento de la metilación del DNA y por tanto, en la expresión de genes.

Como se ha adelantado en la introducción, en el mantenimiento de la metilación del DNA, DNMT1 participa formando parte de un complejo proteico en el que también se encuentran UHRF1 y G9a^{92,97,251}. Se ha demostrado que la desarticulación del complejo provoca una hipometilación global del DNA²⁷². Nuestros resultados demuestran que SLU7 interacciona con este complejo proteico, siendo, además, esencial para mantener la integridad del mismo asociado a la cromatina. Asimismo, hemos demostrado que SLU7 no solo es necesario para preservar los niveles totales de DNMT1 sino también de UHRF1 y G9a. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de SLU7 distinguiéndolo del resto de miembros del complejo, ya que por ejemplo, el silenciamiento de G9a provoca la reducción de la metilación del DNA, sin tener ningún efecto sobre la localización o los niveles de la proteína DNMT1⁹⁷. Por otro lado, el silenciamiento de UHRF1 reduce la metilación del DNA y la asociación de DNMT1 a la cromatina⁹², sin afectar a los niveles globales de DNMT1. Por lo tanto, el conjunto de nuestros resultados demuestra un papel único para SLU7 en el

mantenimiento de la estabilidad de DNMT1, que aparentemente no depende únicamente de la integridad del complejo. Aunque, como se discute más adelante, hemos esclarecido los mecanismos moleculares por los que SLU7 regula la estabilidad de DNMT1, no podemos descartar otros mecanismos implicados en la integridad del propio complejo y en la estabilidad de los otros miembros del complejo (UHRF1 y G9a), como por ejemplo mecanismos de *splicing* alternativo o modificaciones postraduccionales. En cualquier caso, el papel de SLU7 en el mantenimiento no sólo de la estabilidad de DNMT1, sino de la integridad del complejo de metilación del DNA, junto con un posible papel en otros factores de metilación del DNA, como DNMT3A y DNMT3B, explican el enorme impacto del silenciamiento de SLU7 sobre la metilación del DNA.

Dado el interés por comprender la dinámica de la metilación del DNA, existen múltiples trabajos que han caracterizado diferentes mecanismos y distintas moléculas capaces de regular la expresión de DNMT1, revelando un escenario estrechamente regulado, muy complejo y dinámico^{108,123}. Entre ellos, destacan diferentes modificaciones postraduccionales que regulan la estabilidad y por tanto los niveles de la proteína DNMT1¹²⁵. De hecho, el aumento de DNMT1 que tiene lugar en la progresión tumoral se debe en gran medida a las alteraciones postraduccionales de la proteína DNMT1 más que a una inducción de la expresión de su mRNA^{273,274}. Entre las modificaciones postraduccionales descritas, las más estudiadas son la fosforilación¹²⁸, la metilación^{108,126,128} y la acetilación^{130,131,253}. Por ejemplo, como se ha descrito en apartados anteriores, la acetilación de DNMT1 impide su unión con USP7, de manera que esta no es capaz de desubiquitar DNMT1 y por tanto induce su degradación¹²⁹. De hecho, nuestros resultados demuestran que SLU7 interacciona con DNMT1 y permite su unión a la histona deacetilasa HDAC1, asegurando la desacetilación y estabilización de DNMT1²⁵⁴. Así, el silenciamiento de SLU7 promueve la acetilación de DNMT1, impidiendo su unión con USP7 e induciendo la degradación de DNMT1 mediada por el proteasoma. En este punto, es importante señalar que, a diferencia de la mayoría de los trabajos publicados, nuestras conclusiones se basan en datos de interacciones y mecanismos, identificados a través de las proteínas endógenas, sin recurrir a estrategias de sobre-expresión exógena.

Así, en esta tesis hemos descubierto un nuevo papel de SLU7 regulando de manera postraduccional el nivel de la proteína DNMT1, más concretamente regulando su acetilación. Aunque son escasos, otro ejemplo de un factor de *splicing* capaz de regular proteínas a nivel postraduccional, es el caso de *SRSF1* que interactúa con la proteína UBE21 (*Ubiquitin Conjugating Enzyme E2*) promoviendo la sumoilación de sustratos específicos²⁷⁵. Estos resultados revelan la existencia de factores de *splicing* pleiotrópicos que como SLU7 o *SRSF1* regulan la expresión génica a diferentes niveles.

Además, de forma relevante, hemos demostrado que esta dependencia de DNMT1 por los niveles de SLU7, y su regulación a través de la interacción con HDAC1 también tiene lugar *in vivo*. Nuestros resultados demuestran, utilizando diferentes modelos de proliferación hepática en ratón, como son la regeneración hepática inducida tras hepatectomía parcial (HP) o el daño agudo y crónico tras la administración de CCl₄, que SLU7 interacciona con DNMT1 y HDAC1 en el hígado. Además, en estas situaciones, el silenciamiento de SLU7 impide el aumento de expresión de la proteína DNMT1, sin afectar a la inducción de su mRNA.

En definitiva, en esta tesis hemos demostrado por primera vez que SLU7 es necesario para el mantenimiento de la correcta metilación del DNA. Revelando que SLU7 forma parte en la cromatina del complejo proteico implicado en la metilación del DNA, ya que interacciona físicamente con DNMT1, su proteína adaptadora UHRF1 y la histona metiltransferasa G9a. Además, demostramos que SLU7 es necesario para mantener la asociación de este complejo en la cromatina. Sorprendentemente, el conjunto de nuestros resultados demuestra que SLU7 es necesario para mantener los niveles de la proteína DNMT1 en las células proliferantes tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, el silenciamiento de SLU7 provoca la degradación de DNMT1 en múltiples líneas celulares de distinto origen e *in vivo* en modelos de regeneración hepática tras HP o daño hepático. Además, hemos indagado en el mecanismo, descubriendo que SLU7 es necesario para asegurar la unión de HDAC1 con DNMT1, para facilitar así la desacetilación de DNMT1 y su interacción con USP7, asegurando su desubiquitinación y su estabilización (Figura 56).

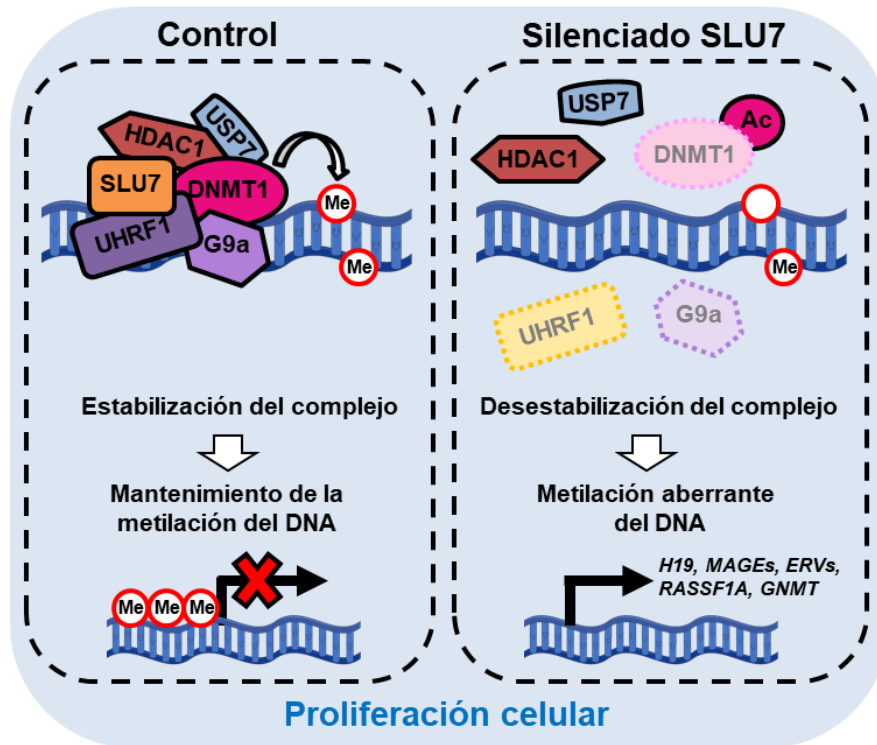


Figura 56. Representación esquemática de los mecanismos regulados por SLU7 en la metilación del DNA. SLU7 afecta a la metilación del DNA y por tanto a la expresión de genes regulados por metilación, ya que es esencial para asegurar la integridad del complejo proteico encargado del mantenimiento de la metilación del DNA (DNMT1, UHRF1 y G9a) y sus niveles proteicos totales. SLU7 es necesario para la interacción de DNMT1 con HDAC1 y USP7 evitando así su acetilación y posterior degradación. Adaptación de Recalde M y col. *Nucleic Acids Res* (2021).

En resumen, los resultados presentados en esta tesis revelan por primera vez, el papel fundamental y no redundante del factor de *splicing* SLU7 en el mantenimiento de la metilación del DNA. Nuestros hallazgos identifican a SLU7 como un factor pleiotrópico, con una función holística en la expresión génica, regulándola a diferentes niveles, incluyendo la remodelación epigenética del DNA, la modulación de la actividad transcripcional, el proceso de *splicing* del mRNA y la estabilidad de las proteínas.

CONCLUSIONES

1. El factor de *splicing* SLU7 es necesario para el mantenimiento de la metilación del DNA. De manera similar al silenciamiento de DNMT1, la reducción de los niveles de SLU7 provoca una drástica caída de los niveles globales de 5-metilcitosina como consecuencia de una hipometilación de CpGs dispersas a lo largo del genoma.
2. SLU7 regula la expresión de genes controlados por metilación del DNA. La hipometilación de CpGs inducida tras el silenciamiento de SLU7, conlleva la activación de la expresión de genes supresores de tumores típicamente silenciados por hipermetilación en cáncer, genes implicados en la inducción de la inmunidad innata y adaptativa y genes regulados por impronta genómica.
3. SLU7 asegura la correcta expresión de la proteína DNMT1 en las células en proliferación, independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encuentren.
4. SLU7 previene la degradación proteica de DNMT1 por el proteasoma en un amplio panel de líneas celulares de diferentes orígenes, incluyendo células no transformadas en proliferación.
5. SLU7 interacciona a nivel de la cromatina con DNMT1, UHRF1 y G9a que constituyen el complejo de mantenimiento de la metilación del DNA y de la H3K9.
6. SLU7 asegura la estabilidad del complejo DNMT1/UHRF1/G9a, su unión a la cromatina, y la estabilidad proteica no solo de DNMT1, sino también de UHRF1 y de G9a.
7. SLU7 permite que HDAC1 se una a DNMT1 para mantenerla desacetilada. DNMT1 desacetilada es capaz de unirse a la proteína USP7, para su desubiquitinización, evitando así su degradación mediada por el proteasoma.
8. El mantenimiento de los niveles normales de SLU7 en el hígado es necesario para asegurar la expresión adecuada de la proteína DNMT1 inducida en modelos de proliferación *in vivo*, regulando la expresión de genes controlados por metilación aparentemente por el mismo mecanismo descrito *in vitro*.
9. SLU7 representa un regulador central de la expresión génica a muy diferentes niveles, incluidos el epigenético, el transcriptómico, el *splicing* y la estabilidad de proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baylin, S. B. *et al.* Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 687–692 (2001).
2. Deutschman, C. S. Transcription. *Crit. Care Med.* **33**, (2005).
3. Schier, A. C. & Taatjes, D. J. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev.* **34**, 465–488 (2020).
4. Pope, S. D. & Medzhitov, R. Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Mol. Cell* **71**, 389–397 (2018).
5. Waddington, C. H. Genetic Assimilation of the Bithorax Phenotype. *Evolution (N. Y.)* **10**, 1 (1956).
6. Capell, B. C. & Berger, S. L. Genome-wide epigenetics. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1 (2013).
7. Cavalli, G. & Heard, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* **571**, 489–499 (2019).
8. Zhang, L., Lu, Q. & Chang, C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1253**, 3–55 (2020).
9. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).
10. Biswas, S. & Rao, C. M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* **837**, 8–24 (2018).
11. Riggs, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**, 9–25 (1975).
12. Holliday, R. & Pugh, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226–232 (1975).
13. Zhou, K., Gaullier, G. & Luger, K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 3 (2019).
14. Kimura, H. Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics* vol. 58 439–445 at <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66> (2013).
15. Zhang, Y. *et al.* Overview of Histone Modification. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1283**, 1–16 (2021).
16. Morgan, M. A. J. & Shilatifard, A. Reevaluating the roles of histone-modifying enzymes and their associated chromatin modifications in transcriptional regulation. *Nat. Genet.* **52**, 1271–1281 (2020).
17. Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L. & Huarte, M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 22 96–118 at <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9> (2021).
18. Dueva, R. *et al.* Neutralization of the Positive Charges on Histone Tails by RNA Promotes an Open Chromatin Structure. *Cell Chem. Biol.* **26**, 1436-1449.e5 (2019).
19. Mondal, T. *et al.* MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat. Commun.* **6**, (2015).

20. Schmitz, K. M., Mayer, C., Postepska, A. & Grummt, I. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev.* **24**, 2264 (2010).
21. Greenberg, M. V. C. & Bourc'his, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 590–607 (2019).
22. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38**, 23–38 (2013).
23. Ito, S. *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300–1303 (2011).
24. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935 (2009).
25. Kriaucionis, S. & Heintz, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929–930 (2009).
26. Pfeifer, G. P., Szabó, P. E. & Song, J. Protein Interactions at Oxidized 5-Methylcytosine Bases. *J. Mol. Biol.* **432**, 1718–1730 (2019).
27. He, Y. F. *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303–1307 (2011).
28. Wang, P., Yan, Y., Yu, W. & Zhang, H. Role of ten-eleven translocation proteins and 5-hydroxymethylcytosine in hepatocellular carcinoma. *Cell Prolif.* **52**, (2019).
29. Brien, G. L., Valerio, D. G. & Armstrong, S. A. Exploiting the Epigenome to Control Cancer-Promoting Gene-Expression Programs. *Cancer Cell* **29**, 464–476 (2016).
30. Cramer, P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* **573**, 45–54 (2019).
31. Ramanathan, A., Robb, G. B. & Chan, S. H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7511–7526 (2016).
32. Huh, H., Kim, D., Jeong, H.-S. & Park, H. Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells* **8**, 600 (2019).
33. Kornblihtt, A. R. *et al.* Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 153–165 (2013).
34. 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).
35. Wachtel, C. & Manley, J. L. Splicing of mRNA precursors: the role of RNAs and proteins in catalysis. *Mol. Biosyst.* **5**, 311–316 (2009).
36. Chua, K. & Reed, R. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* **402**, 207–210 (1999).
37. 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. *RNA* **2**, 707–717 (1996).
38. Frank, D. & Guthrie, C. An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice

- in yeast. *Genes Dev.* **6**, 2112–2124 (1992).
39. WANG, Y. *et al.* Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed. reports* **3**, 152–158 (2015).
 40. Berasain, C. *et al.* Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: mechanisms and consequences. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3091–3102 (2010).
 41. Black, D. L. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* **103**, 367–370 (2000).
 42. Besser, D. *et al.* DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett.* **269**, 358–362 (1990).
 43. Wang, H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680–1688 (2012).
 44. Luo, Z. & Lin, C. Enhancer, epigenetics, and human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **36**, 27–33 (2016).
 45. Sindhu, C., Samavarchi-Tehrani, P. & Meissner, A. Transcription factor-mediated epigenetic reprogramming. *J. Biol. Chem.* **287**, 30922–30931 (2012).
 46. Zhu, H., Wang, G. & Qian, J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 551–565 (2016).
 47. Stein, G. S. *et al.* Transcription factor-mediated epigenetic regulation of cell growth and phenotype for biological control and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* **50**, 160–167 (2010).
 48. Marchal, C. & Miotto, B. Emerging concept in DNA methylation: role of transcription factors in shaping DNA methylation patterns. *J. Cell. Physiol.* **230**, 743–751 (2015).
 49. Westendorf, J. J. *et al.* Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7982–7992 (2002).
 50. Schoenherr, C. J., Levorse, J. M. & Tilghman, S. M. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat. Genet.* **33**, 66–69 (2003).
 51. Stadler, M. B. *et al.* DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nat.* 2011 4807378 **480**, 490–495 (2011).
 52. Luco, R. F. *et al.* Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* **327**, 996–1000 (2010).
 53. Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R. & Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16–26 (2011).
 54. Agirre, E., Oldfield, A. J., Bellora, N., Segelle, A. & Luco, R. F. Splicing-associated chromatin signatures: a combinatorial and position-dependent role for histone marks in splicing definition. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
 55. Shayevitch, R., Askayo, D., Keydar, I. & Ast, G. The importance of DNA methylation of exons on alternative splicing. *RNA* **24**, 1351–1362 (2018).
 56. Lev Maor, G., Yearim, A. & Ast, G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.* **31**, 274–280 (2015).

57. Yearim, A. *et al.* HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Rep.* **10**, 1122–1134 (2015).
58. Shukla, S. *et al.* CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**, 74–79 (2011).
59. Sun, X., Tian, Y., Wang, J., Sun, Z. & Zhu, Y. Genome-wide analysis reveals the association between alternative splicing and DNA methylation across human solid tumors. *BMC Med. Genomics* **13**, (2020).
60. Zhang, J., Zhang, Y. Z., Jiang, J. & Duan, C. G. The Crosstalk Between Epigenetic Mechanisms and Alternative RNA Processing Regulation. *Front. Genet.* **11**, (2020).
61. Wang, X. *et al.* RNA-binding protein regulates plant DNA methylation by controlling mRNA processing at the intronic heterochromatin-containing gene IBM1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15467–15472 (2013).
62. Selvanathan, S. P. *et al.* EWS-FLI1 modulated alternative splicing of ARID1A reveals novel oncogenic function through the BAF complex. *Nucleic Acids Res.* **47**, 9619–9636 (2019).
63. Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E. & Kornblihtt, A. R. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11456–11460 (1997).
64. Nogués, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D. & Kornblihtt, A. R. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **277**, 43110–43114 (2002).
65. Shukla, S. & Oberdoerffer, S. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 673–683 (2012).
66. Kornblihtt, A. R., De La Mata, M., Fededa, J. P., Muñoz, M. J. & Nogués, G. Multiple links between transcription and splicing. *RNA* **10**, 1489–1498 (2004).
67. Furger, A., O’Sullivan, J. M., Binnie, A., Lee, B. A. & Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* **16**, 2792–2799 (2002).
68. Kwek, K. Y. *et al.* U1 snRNA associates with TFIID and regulates transcriptional initiation. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 800–805 (2002).
69. Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P. & Reed, R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**, 182–185 (2002).
70. Lois, S., Blanco, N., Martínez-Balbás, M. & de la Cruz, X. The functional modulation of epigenetic regulators by alternative splicing. *BMC Genomics* **8**, (2007).
71. Gordon, C. A., Hartono, S. R. & Chédin, F. Inactive DNMT3B splice variants modulate de novo DNA methylation. *PLoS One* **8**, (2013).
72. Weissbach, A. A Chronicle of DNA methylation (1948–1975). *EXS* **64**, 1–10 (1993).
73. Antequera, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1647–1658 (2003).
74. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**,

- 1010–1022 (2011).
75. A, R. & H, C. DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.* **55**, 173–175 (1991).
 76. Murphy, S. K. & Jirtle, R. L. Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays* **25**, 577–588 (2003).
 77. Chiappinelli, K. B. *et al.* Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* **162**, 974–986 (2015).
 78. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662–673 (2002).
 79. Ehrlich, M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J. Cell. Biochem.* **88**, 899–910 (2003).
 80. Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2395–2402 (2000).
 81. Probst, A. V., Dunleavy, E. & Almouzni, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 192–206 (2009).
 82. Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2571–2587 (2004).
 83. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–257 (1999).
 84. Goll, M. G. *et al.* Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**, 395–398 (2006).
 85. Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G. & Jeltsch, A. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J. Biol. Chem.* **280**, 13341–13348 (2005).
 86. Li, E. & Zhang, Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
 87. Yarychivska, O., Shahabuddin, Z., Comfort, N., Boulard, M. & Bestor, T. H. BAH domains and a histone-like motif in DNA methyltransferase 1 (DNMT1) regulate de novo and maintenance methylation in vivo. *J. Biol. Chem.* **293**, 19466–19475 (2018).
 88. Ishiyama, S. *et al.* Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance. *Mol. Cell* **68**, 350-360.e7 (2017).
 89. Chuang, L. S. H. *et al.* Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**, 1996–2000 (1997).
 90. Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T. H. & Patel, D. J. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science* **331**, 1036–1040 (2011).
 91. Maresca, A., Zaffagnini, M., Caporali, L., Carelli, V. & Zanna, C. DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front. Genet.* **6**, (2015).

92. Bostick, M. *et al.* UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**, 1760–1764 (2007).
93. Nishiyama, A. *et al.* Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
94. Li, T. *et al.* Structural and mechanistic insights into UHRF1-mediated DNMT1 activation in the maintenance DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **46**, 3218–3231 (2018).
95. Bronner, C., Alhosin, M., Hamiche, A. & Mousli, M. Coordinated Dialogue between UHRF1 and DNMT1 to Ensure Faithful Inheritance of Methylated DNA Patterns. *Genes (Basel)*. **10**, (2019).
96. Sharif, J. *et al.* The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**, 908–912 (2007).
97. Estève, P. O. *et al.* Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev.* **20**, 3089–3103 (2006).
98. Poulard, C., Noureddine, L. M., Pruvost, L. & Le Romancer, M. Structure, Activity, and Function of the Protein Lysine Methyltransferase G9a. *Life (Basel, Switzerland)* **11**, (2021).
99. Methot, S. P. *et al.* H3K9me selectively blocks transcription factor activity and ensures differentiated tissue integrity. *Nat. Cell Biol.* **23**, 1163–1175 (2021).
100. Karagianni, P., Amazit, L., Qin, J. & Wong, J. ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 705–717 (2008).
101. Xie, S., Jakoncic, J. & Qian, C. UHRF1 double tudor domain and the adjacent PHD finger act together to recognize K9me3-containing histone H3 tail. *J. Mol. Biol.* **415**, 318–328 (2012).
102. Kim, J. K., Estève, P. O., Jacobsen, S. E. & Pradhan, S. UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, 493–505 (2009).
103. Liu, X. *et al.* UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
104. Hermann, A., Goyal, R. & Jeltsch, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* **279**, 48350–48359 (2004).
105. Nguyen, C. T. *et al.* Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **62**, 6456–6461 (2002).
106. McGarvey, K. M. *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res.* **66**, 3541–3549 (2006).
107. Wozniak, R. J., Klimecki, W. T., Lau, S. S., Feinstein, Y. & Futscher, B. W. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3

- K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* **26**, 77–90 (2007).
108. Kar, S. *et al.* An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function. *Epigenetics* vol. 7 994–1007 at <https://doi.org/10.4161/epi.21568> (2012).
109. Kinney, S. R. M. & Pradhan, S. Regulation of expression and activity of DNA (Cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 101 311–333 (Elsevier B.V., 2011).
110. Rouleau, J., MacLeod, A. R. & Szyf, M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 1595–1601 (1995).
111. McCabe, M. T., Davis, J. N. & Day, M. L. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res.* **65**, 3624–3632 (2005).
112. Peterson, E. J., Böglér, O. & Taylor, S. M. p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res.* **63**, 6579–6582 (2003).
113. Lu, R. *et al.* Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 12249–12259 (2007).
114. Papageorgis, P. *et al.* Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res.* **70**, 968–978 (2010).
115. Campbell, P. M. & Szyf, M. Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway. *Carcinogenesis* **24**, 17–24 (2003).
116. He, S. S. *et al.* Expression of DNMT1 and DNMT3a are regulated by GLI1 in human pancreatic cancer. *PLoS One* **6**, (2011).
117. Sun, L. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway stabilizes DNA methyltransferase I protein and maintains DNA methylation. *Cell. Signal.* **19**, 2255–2263 (2007).
118. Pan, W. *et al.* MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J. Immunol.* **184**, 6773–6781 (2010).
119. Huang, J., Wang, Y., Guo, Y. & Sun, S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology* **52**, 60–70 (2010).
120. Zhang, Z. *et al.* MiR-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. *Mol. Cancer* **10**, (2011).
121. Zhao, S. *et al.* MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum.* **63**, 1376–1386 (2011).
122. Svedruzic, Z. Mammalian cytosine DNA methyltransferase Dnmt1: enzymatic mechanism, novel mechanism-based inhibitors, and RNA-directed DNA methylation.

- Curr. Med. Chem.* **15**, 92–106 (2008).
123. Lin, R. K. & Wang, Y. C. Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer. *Cell Biosci.* **4**, (2014).
 124. Di Ruscio, A. *et al.* DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature* **503**, 371–376 (2013).
 125. Scott, A., Song, J., Ewing, R. & Wang, Z. Regulation of protein stability of DNA methyltransferase 1 by post-translational modifications. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **46**, 199–203 (2014).
 126. Designed Research, S. P. *Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells DNMT1 [3 H] H3 H4*. vol. 106
www.pnas.org/cgi/content/full/0810362106/DCSupplemental.www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0810362106 (2009).
 127. Denis, H., Ndlovu, M. N. & Fuks, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.* **12**, 647–656 (2011).
 128. Estéve, P. O. *et al.* A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 42–49 (2011).
 129. Du, Z. *et al.* DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci. Signal.* **3**, (2010).
 130. Peng, L. *et al.* SIRT1 Deacetylates the DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein and Alters Its Activities. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4720–4734 (2011).
 131. Cheng, J. *et al.* Molecular mechanism for USP7-mediated DNMT1 stabilization by acetylation. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
 132. Qin, W., Leonhardt, H. & Spada, F. Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1. *J. Cell. Biochem.* **112**, 439–444 (2011).
 133. Lee, B. & Muller, M. T. SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity. *Biochem. J.* **421**, 449–461 (2009).
 134. Qin, W., Leonhardt, H. & Pichler, G. Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. *Nucleus* vol. 2 at
<https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17928> (2011).
 135. Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R. & Kouzarides, T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2305–2312 (2003).
 136. Kimura, H. & Shiota, K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J. Biol. Chem.* **278**, 4806–4812 (2003).
 137. Robertson, K. D. *et al.* DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* **25**, 338–342 (2000).
 138. Pradhan, S. & Kim, G. Do. The retinoblastoma gene product interacts with maintenance

- human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity. *EMBO J.* **21**, 779–788 (2002).
139. Hervouet, E., Vallette, F. M. & Cartron, P. F. Dnmt1/Transcription factor interactions: an alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes Cancer* **1**, 434–443 (2010).
 140. Estève, P. O. *et al.* Binding of 14-3-3 reader proteins to phosphorylated DNMT1 facilitates aberrant DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1642–1656 (2016).
 141. Jeltsch, A. & Jurkowska, R. Z. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - A new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Research* vol. 44 8556–8575 at <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723> (2016).
 142. Syeda, F. *et al.* The replication focus targeting sequence (RFTS) domain is a DNA-competitive inhibitor of Dnmt1. *J. Biol. Chem.* **286**, 15344–15351 (2011).
 143. Mishima, Y. *et al.* RFTS-dependent negative regulation of Dnmt1 by nucleosome structure and histone tails. *FEBS J.* **284**, 3455–3469 (2017).
 144. Pradhan, M. *et al.* CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry* **47**, 10000–10009 (2008).
 145. Kheir, T. B. & Lund, A. H. Epigenetic dynamics across the cell cycle. *Essays Biochem.* **48**, 107–120 (2010).
 146. Robertson, K. D., Keyomarsi, K., Gonzales, F. A., Velicescu, M. & Jones, P. A. *Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G 0/G 1 to S phase transition in normal and tumor cells. Nucleic Acids Research* vol. 28 (2000).
 147. Brown, S. E., Fraga, M. F., Weaver, I. C. G., Berdasco, M. & Szyf, M. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics* **2**, 54–65 (2007).
 148. Chen, T. *et al.* Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat. Genet.* **39**, 391–396 (2007).
 149. Takebayashi, S., Tamura, T., Matsuoka, C. & Okano, M. Major and Essential Role for the DNA Methylation Mark in Mouse Embryogenesis and Stable Association of DNMT1 with Newly Replicated Regions. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8243–8258 (2007).
 150. Kaji, K. *et al.* DNMT1 is a required genomic regulator for murine liver histogenesis and regeneration. *Hepatology* **64**, 582–598 (2016).
 151. Baylin, S. B. & Jones, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 726–734 (2011).
 152. Kanai, Y. & Hirohashi, S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis* **28**, 2434–2442 (2007).
 153. Arechederra, M. *et al.* Hypermethylation of gene body CpG islands predicts high dosage of functional oncogenes in liver cancer. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 154. Hoffmann, M. J. & Schulz, W. A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in

- human cancer. *Biochem. Cell Biol.* **83**, 296–321 (2005).
155. Ehrlich, M. & Lacey, M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **754**, 31–56 (2013).
 156. Ehrlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* **1**, 239–259 (2009).
 157. Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. & Jaenisch, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **395**, 89–93 (1998).
 158. Hama, N. *et al.* Epigenetic landscape influences the liver cancer genome architecture. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 159. Costello, J. F. *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* **24**, 132–138 (2000).
 160. McCabe, M. T., Brandes, J. C. & Vertino, P. M. Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical Cancer Research* vol. 15 3927–3937 at <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2784> (2009).
 161. Robertson, K. D. *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2291–2298 (1999).
 162. Ahluwalia, A., Hurteau, J. A., Bigsby, R. M. & Nephew, K. P. DNA methylation in ovarian cancer. II. Expression of DNA methyltransferases in ovarian cancer cell lines and normal ovarian epithelial cells. *Gynecol. Oncol.* **82**, 299–304 (2001).
 163. Lin, R. K. *et al.* Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5′CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* **55**, 205–213 (2007).
 164. Colyn, L. *et al.* Dual Targeting of G9a and DNA Methyltransferase-1 for the Treatment of Experimental Cholangiocarcinoma. *Hepatology* **73**, 2021 (2020).
 165. Bárcena-Varela, M. *et al.* Dual Targeting of Histone Methyltransferase G9a and DNA-Methyltransferase 1 for the Treatment of Experimental Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **69**, (2019).
 166. Xie, S. *et al.* Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236**, 87–95 (1999).
 167. Jan, S. *et al.* Targeting EHMT2/ G9a for cancer therapy: Progress and perspective. *Eur. J. Pharmacol.* **893**, (2021).
 168. Sidhu, H. & Capalash, N. UHRF1: The key regulator of epigenetics and molecular target for cancer therapeutics. *Tumour Biol.* **39**, 1–11 (2017).
 169. Łuczak, M. W. & Jagodziński, P. P. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem. Cytobiol.* **44**, 143–154 (2006).
 170. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
 171. Ilango, S., Paital, B., Jayachandran, P., Padma, P. R. & Nirmaladevi, R. Epigenetic alterations in cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **25**, 1058–1109 (2020).

172. Rodríguez-Sanabria, J. S., Escutia-Gutiérrez, R., Rosas-Campos, R., Armendáriz-Borunda, J. S. & Sandoval-Rodríguez, A. An Update in Epigenetics in Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Front. Med.* **8**, 770504 (2021).
173. Braghini, M. R. *et al.* Epigenetic remodelling in human hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **41**, (2022).
174. Ajoollabady, A., Aslkhodapasandhokmabad, H., Zhou, Y. & Ren, J. Epigenetic modification in alcohol-related liver diseases. *Med. Res. Rev.* (2022) doi:10.1002/MED.21881.
175. Arechederra, M. *et al.* Epigenetic Biomarkers for the Diagnosis and Treatment of Liver Disease. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–15 (2021).
176. Yang, L. *et al.* New advances of DNA/RNA methylation modification in liver fibrosis. *Cell. Signal.* **92**, (2022).
177. Barcena-Varela, M. *et al.* Epigenetic mechanisms and metabolic reprogramming in fibrogenesis: Dual targeting of G9a and DNMT1 for the inhibition of liver fibrosis. *Gut* **70**, 388–400 (2021).
178. Argemi, J. *et al.* Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
179. El-Bendary, M., Nour, D., Arafa, M. & Neamatallah, M. Methylation of tumour suppressor genes RUNX3, RASSF1A and E-Cadherin in HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Br. J. Biomed. Sci.* **77**, 35–40 (2020).
180. Berasain, C. *et al.* Methylthioadenosine phosphorylase gene expression is impaired in human liver cirrhosis and hepatocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* **1690**, 276–284 (2004).
181. Jain, S. *et al.* Differential methylation of the promoter and first exon of the RASSF1A gene in hepatocarcinogenesis. *Hepatol. Res.* **45**, 1110–1123 (2015).
182. Meunier, L. *et al.* DNA Methylation Signatures Reveal the Diversity of Processes Remodeling Hepatocellular Carcinoma Methylomes. *Hepatology* **74**, 816–834 (2021).
183. Hernandez-Meza, G. *et al.* DNA Methylation Profiling of Human Hepatocarcinogenesis. **74**, 2021 (2020).
184. Jones, M. H., Frank, D. N. & Guthrie, C. Characterization and functional ordering of Slu7p and Prp17p during the second step of pre-mRNA splicing in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9687–9691 (1995).
185. Fourmann, J. B. *et al.* Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system. *Genes Dev.* **27**, 413–428 (2013).
186. Chua, K. & Reed, R. *Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing.* www.genesdev.org (1999).
187. Umen, J. G. & Guthrie, C. Prp16p, Slu7p, and Prp8p interact with the 3' splice site in two distinct stages during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**, 584–597 (1995).

188. D, F., B, P. & C, G. Synthetic lethal mutations suggest interactions between U5 small nuclear RNA and four proteins required for the second step of splicing. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5197–5205 (1992).
189. Shomron, N., Reznik, M. & Ast, G. Splicing Factor hSlu7 Contains a Unique Functional Domain Required to Retain the Protein within the Nucleus □ D. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3782–3795 (2004).
190. Zhang, X. *et al.* An Atomic Structure of the Human Spliceosome. *Cell* **169**, 918-929.e14 (2017).
191. 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).
192. Castillo, J. *et al.* Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology* **137**, (2009).
193. Elizalde, M. *et al.* Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 2909–2920 (2014).
194. Jiménez, M. *et al.* Splicing events in the control of genome integrity: Role of SLU7 and truncated SRSF3 proteins. *Nucleic Acids Res.* **47**, 3450–3466 (2019).
195. 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).
196. Janowicz, A., Michalak, M. & Krebs, J. Stress induced subcellular distribution of ALG-2, RBM22 and hSlu7. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1045–1049 (2011).
197. Costa, R. H., Kalinichenko, V. V., Holterman, A. X. L. & Wang, X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* **38**, 1331–1347 (2003).
198. Berasain, C. & Avila, M. A. Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3831–3851 (2015).
199. Sen, S., Jumaa, H. & Webster, N. J. G. Splicing factor SRSF3 is crucial for hepatocyte differentiation and metabolic function. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
200. Hayhurst, G. P., Lee, Y.-H., Lambert, G., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1393–1403 (2001).
201. Jitrapakdee, S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 33–45 (2012).
202. Gárate-Rascón, M. *et al.* Splicing Factor SLU7 Prevents Oxidative Stress-Mediated Hepatocyte Nuclear Factor 4α Degradation, Preserving Hepatic Differentiation and Protecting From Liver Damage. *Hepatology* **74**, 2791–2807 (2021).
203. Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D. C. & Roudot-Thoraval, F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J. Hepatol.* **58**, 593–608 (2013).
204. Cordero-Espinoza, L. & Huch, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration

- versus fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 85–96 (2018).
205. Michalopoulos, G. K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* **65**, 1384–1392 (2017).
 206. Michalopoulos, G. K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.* **3**, 485–513 (2013).
 207. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 425–456 (2011).
 208. Trevisani, F., Cantarini, M. C., Wands, J. R. & Bernardi, M. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **29**, 1299–1305 (2008).
 209. Llovet, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **7**, (2021).
 210. 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).
 211. Okabe, H. *et al.* Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* **61**, 2129–2137 (2001).
 212. Berasain, C. *et al.* Expression of Wilms' tumor suppressor in the liver with cirrhosis: relation to hepatocyte nuclear factor 4 and hepatocellular function. *Hepatology* **38**, 148–157 (2003).
 213. Perugorria, M. J. *et al.* Wilms' tumor 1 gene expression in hepatocellular carcinoma promotes cell dedifferentiation and resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* **69**, 1358–1367 (2009).
 214. 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).
 215. Becker, D. *et al.* Genetic signatures shared in embryonic liver development and liver cancer define prognostically relevant subgroups in HCC. *Mol. Cancer* **11**, (2012).
 216. Perugorria, M. J. *et al.* The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology* **48**, 1251–1261 (2008).
 217. Berasain, C. *et al.* Inflammation and liver cancer: new molecular links. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1155**, 206–221 (2009).
 218. Berasain, C., Castillo, J., Perugorria, M. J., Prieto, J. & Avila, M. A. Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* **254**, 30–41 (2007).
 219. Panasyuk, G. *et al.* PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat. Commun.* **3**, (2012).
 220. Wong, C. C. L. *et al.* Switching of pyruvate kinase isoform L to M2 promotes metabolic reprogramming in hepatocarcinogenesis. *PLoS One* **9**, (2014).
 221. Tannapfel, A. *et al.* Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice

- expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis* **29**, 211–218 (2008).
222. Müller, M. *et al.* TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* **12**, 1564–1577 (2005).
 223. 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).
 224. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* vol. 16 6–21 at <https://doi.org/10.1101/gad.947102> (2002).
 225. Hervouet, E., Nadaradjane, A., Gueguen, M., Vallette, F. M. & Cartron, P.-F. Kinetics of DNA methylation inheritance by the Dnmt1-including complexes during the cell cycle. *Cell Div.* **7**, (2012).
 226. Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S. & Patel, D. J. Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation. *Science (80-.)*. **335**, 709–712 (2012).
 227. Gaudet, F. *et al.* Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* **300**, 489–492 (2003).
 228. Papamichos-Chronakis, M. & Peterson, C. L. Chromatin and the genome integrity network. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 62–75 (2013).
 229. Bowler, E. H. *et al.* Deep proteomic analysis of Dnmt1 mutant/hypomorphic colorectal cancer cells reveals dysregulation of epithelial-mesenchymal transition and subcellular re-localization of Beta-Catenin. *Epigenetics* **15**, 107–121 (2020).
 230. Meissner, A. *et al.* Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5868–5877 (2005).
 231. Stockwell, P. A., Chatterjee, A., Rodger, E. J. & Morison, I. M. DMAP: differential methylation analysis package for RRBS and WGBS data. *Bioinformatics* **30**, 1814–1822 (2014).
 232. Rhee, I. *et al.* CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **404**, 1003–1007 (2000).
 233. 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**, (2013).
 234. Zolotukhin, S. *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**, 973–985 (1999).
 235. Berasain, C. *et al.* Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* **128**, 424–432 (2005).
 236. Berasain, C. *et al.* Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J. Biol. Chem.* **280**, 19012–19020 (2005).
 237. Hesson, L. B., Cooper, W. N. & Latif, F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis. Markers* **23**, 73–87 (2007).

238. Huidobro, C. *et al.* A DNA methylation signature associated with the epigenetic repression of glycine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinoma. *J. Mol. Med.* **91**, 939–950 (2013).
239. Botezatu, A. *et al.* Epigenetic Silencing of GNMT Gene in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* **12**, 21–30 (2015).
240. Jones, P. A., Ohtani, H., Chakravarthy, A. & De Carvalho, D. D. Epigenetic therapy in immune-oncology. *Nature Reviews Cancer* vol. 19 151–161 at <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0109-9> (2019).
241. De Smet, C. & Loriot, A. DNA hypomethylation and activation of germline-specific genes in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **754**, 149–166 (2013).
242. Lavie, L., Kitova, M., Maldener, E., Meese, E. & Mayer, J. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J. Virol.* **79**, 876–883 (2005).
243. Siebenkäs, C. *et al.* Inhibiting DNA methylation activates cancer testis antigens and expression of the antigen processing and presentation machinery in colon and ovarian cancer cells. *PLoS One* **12**, (2017).
244. Barlow, D. P. & Bartolomei, M. S. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
245. Torrisani, J., Unterberger, A., Tendulkar, S. R., Shikimi, K. & Szyf, M. AUF1 cell cycle variations define genomic DNA methylation by regulation of DNMT1 mRNA stability. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 395–410 (2007).
246. Rao, S. *et al.* Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7797–7802 (1999).
247. Baranovskiy, A. G. *et al.* Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. *Nucleic Acids Res.* **42**, 14013–14021 (2014).
248. Jackman, J. & O'Connor, P. M. Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **00**, (1998).
249. Schneider-Poetsch, T. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 209–217 (2010).
250. Han, Y. H., Moon, H. J., You, B. R. & Park, W. H. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol. Rep.* **22**, 215–221 (2009).
251. Schermelleh, L. *et al.* Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4301–4312 (2007).
252. Cai, Y. *et al.* Critical threshold levels of DNA methyltransferase 1 are required to maintain DNA methylation across the genome in human cancer cells. *Genome Res.* **27**, 533–544 (2017).
253. Hong, Q. & Shao, Z. M. Ubiquitination/deubiquitination and acetylation/deacetylation:

- Making DNMT1 stability more coordinated. *Acta Pharmacol. Sin.* **32**, 139–140 (2011).
254. Zhou, Q., Agoston, A. T., Atadja, P., Nelson, W. G. & Davidson, N. E. Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **6**, 873–883 (2008).
255. Michalopoulos, G. K. Advances in liver regeneration. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 897–907 (2014).
256. Forbes, S. J. & Newsome, P. N. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 473–485 (2016).
257. Wang, S. *et al.* Epigenetic Compensation Promotes Liver Regeneration. *Dev. Cell* **50**, 43–56.e6 (2019).
258. Weber, L. W. D., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* **33**, 105–136 (2003).
259. Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C. & Weiskirchen, R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* **49**, 4–11 (2015).
260. Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A. M., Graveley, B. R. & Blencowe, B. J. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* **152**, 1252–1269 (2013).
261. André, K. M., Sipos, E. H. & Soutourina, J. Mediator Roles Going Beyond Transcription. *Trends Genet.* **37**, 224–234 (2021).
262. Lemaire, M. *et al.* Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer. *BMC Cancer* **8**, (2008).
263. Costa, G., Barra, V., Lentini, L., Cilluffo, D. & Di Leonardo, A. DNA demethylation caused by 5-Aza-2'-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy. *Oncotarget* **7**, 3726–3739 (2016).
264. Fleury, L., Gerus, M., Lavigne, A. C., Richard-Foy, H. & Bystricky, K. Eliminating epigenetic barriers induces transient hormone-regulated gene expression in estrogen receptor negative breast cancer cells. *Oncogene* **27**, 4075–4085 (2008).
265. Bai, J. *et al.* Silencing DNA methyltransferase 1 (DNMT1) inhibits proliferation, metastasis and invasion in ESCC by suppressing methylation of RASSF1A and DAPK. *Oncotarget* **7**, 44129–44141 (2016).
266. Minoguchi, S. & Iba, H. Instability of Retroviral DNA Methylation in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 1166–1173 (2008).
267. He, S. *et al.* Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* **292**, 18542–18555 (2017).
268. Chin, H. G. *et al.* Transcription factor LSF-DNMT1 complex dissociation by FQI1 leads to aberrant DNA methylation and gene expression. *Oncotarget* vol. 7 www.impactjournals.com/oncotarget/ (2016).
269. Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene

- results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915–926 (1992).
270. Robert, M. F. *et al.* DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.* **33**, 61–65 (2003).
271. Patel, K. *et al.* Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4313–4324 (2010).
272. Pacaud, R. *et al.* The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
273. Agoston, A. T. *et al.* Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **280**, 18302–18310 (2005).
274. De Marzo, A. M. *et al.* Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* **59**, 3855–3860 (1999).
275. Pelisch, F. *et al.* The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16119–16124 (2010).

ANEXOS

Anexo 1. Cebadores utilizados

Gen	Uso	Especie	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	Temperatura de hibridación
<i>TRIM47</i>	PCR a tiempo real	humano	GTCCAAAGTCCTGAGCGCC	CCTCCTCGATGAAGCCCAGC	62 °C
<i>TRIM47_M</i>	PCR específica de metilación	humano	AAAGATTTTTAGGTTAGAGGAGG	CGCTAAAACAAAAACGCGCGC	60 °C
<i>TRIM47_U</i>	PCR específica de metilación	humano	AAAGATTTTTAGGTTAGAGGAGG	CACTAAAACAAAAACACACAC	57 °C
<i>TFF3_M</i>	PCR específica de metilación	humano	GTGTTTCGAGTTTCGTATTTTTCG	CTTA ACTATTCCCCATATAATA	52 °C
<i>TFF3_U</i>	PCR específica de metilación	humano	GTGTTTGGAGTTTGTATTTTTGG	CTTA ACTATTCCCCATATAATA	52 °C
<i>DLG3</i>	PCR a tiempo real	humano	TGAACAGCAGCATGAGCTCTGG	CGTCCTGGCATGGA ACTTCACAG	62 °C
<i>DLG3_M</i>	PCR específica de metilación	humano	GTTAGTGTTGGAGGGGGAGT	CGCCACC GCCGCCACCACCGC	56 °C
<i>DLG3_U</i>	PCR específica de metilación	humano	GTTAGTGTTGGAGGGGGAGT	CACCACCACCACCACCACCAC	56 °C
<i>RASSF1A</i>	PCR a tiempo real	humano	TTGGAGACCCTGCAAACAGAACAG	GAAGCATTAAGGCACATGCTGTAC	62 °C
<i>RASSF1A_M</i>	PCR específica de metilación	humano	GTCTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGCAACTAAAAACGA	58 °C
<i>RASSF1A_U</i>	PCR específica de metilación	humano	TTGGTTGCAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCACAAACTAAAAACAA	58 °C
<i>GNMT</i>	PCR a tiempo real	humano	AAGAGGGCTTCAGTGTGACG	AGGCTTGAAGTCGCCAGGA	60 °C
<i>GNMT_M</i>	PCR específica de metilación	humano	TTGGGTTGTTGCGTTAGTAC	CCGCGCAATACAAACTAA	60 °C
<i>GNMT_U</i>	PCR específica de metilación	humano	TGTTTGGGTTGTTGTGTTAGTAT	CCACACAATACAAACTAAAAACAAA	60 °C
<i>DNMT1 ex1</i>	PCR	humano	ATGCCGGCGCGTACCGCCCCAG		60 °C
<i>DNMT1 ex2</i>	PCR	humano	CTCAAAGATTTGGAAAGAGACAGC		64 °C
<i>DNMT1 ex6</i>	PCR	humano		TGCAAAATGAGATGTGATGGTGG	64 °C
<i>DNMT1 ex13</i>	PCR, PCR a tiempo real	humano	GAGGCCCGAAGAAAAAGAAC		60 °C
<i>DNMT1 ex17</i>	PCR, PCR a tiempo real	humano		TGAAGCAGGTCAGTTTGTGC	60 °C
<i>DNMT1</i>	PCR a tiempo real	ratón	CTTCGACGTCACACCAGAGA	CGGGATCACACTTTTGCTTT	60 °C
<i>DNMT3A</i>	PCR a tiempo real	humano	GGGGACGTCCGCAGCGTCACA	CAGGGTTGGACTCGAGAAATCGC	60 °C
<i>DNMT3B</i>	PCR a tiempo real	humano	TCAGGATGGGAAGGAGTTTG	GGTCCTCCAATGAGTCTCCA	60 °C
<i>RPLP0</i>	PCR a tiempo real	humano, ratón	AACATCTCCCCCTTCTCCTT	GAAGGCCTTGACCTTTTCAG	60 °C
<i>SLU7</i>	PCR a tiempo real	humano, ratón	GAAGAAGGAGCTAGAAGAACAG	CTTCCCATCATAGTCAAACATCAG	60 °C
<i>MAGE-A1</i>	PCR a tiempo real	humano	AGGCCACAGAGGAGCACCA	GGATCTGTTGACCCAGCAGTG	64 °C
<i>MAGE-A7</i>	PCR a tiempo real	humano	TGCCTTGAGGCCCAAGGACAG	CAGGTGAGCGGGGTGTGTCT	64 °C
<i>envF_{c2}</i>	PCR a tiempo real	humano	CTCCATTAGTAGCAGTTCCT	GAGAATAGTGGGACCTGTCTTT	64 °C
<i>H19</i>	PCR a tiempo real	humano	TGCCTCAGCGTTCGGGCTGG	GACCCGCTTCTTGCCGCAGC	62 °C
<i>H19</i>	PCR a tiempo real	ratón	GAATCTGCTCCAAGGTGAAGC	CAAAGCTATCTCCGGGACTC	62 °C

Anexo 2. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Método	Casa comercial	Referencia
5-methylCytosine	IF (1º)	<i>Eurogentec</i>	BI-MECY 0100
Actin	WB (1º)	<i>Sigma-Aldrich</i>	A2066
Ciclina A (H-432)	WB (1º)	<i>Santa Cruz</i>	SC751
DNMT1	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	50325
DNMT1	WB (1º), IP	<i>abcam</i>	AB13537
DNMT3A	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	672595
DNMT3B	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	3598
G9A	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	33065
GAPDH	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	21185
H3K9ac	WB (1º)	<i>Millipore</i>	06-911
H3S10P	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	97015
HAUSP (USP7)	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	433S
HDAC1	WB (1º)	<i>Santa Cruz</i>	7872
Histona 3	WB (1º)	<i>Millipore</i>	05-928
igG ratón	IP	<i>Santa Cruz</i>	SC2025
Lisina-acetilada	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	9441S
PCNA	WB (1º)	<i>Santa Cruz</i>	SC56
SLU7	WB (1º)	<i>Novus Biologicals</i>	NBP2-20403
SLU7	IP	<i>BD Bioscience</i>	612604
UHRF1	WB (1º)	<i>Cell Signaling</i>	123875
α-igG-conejo-HRP	WB (2º)	<i>Sigma-Aldrich</i>	A0545
α-IgG-ratón-HRP	WB (2º)	<i>Sigma-Aldrich</i>	A0168
α-ratón-AlezaFluor 488	IF (2º)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	AS21202

The splicing regulator SLU7 is required to preserve DNMT1 protein stability and DNA methylation

Miriam Recalde¹, María Gárate-Rascón¹, María Elizalde¹, María Azkona¹, M. Ujue Latasa^{1,2}, Marina Bárcena-Varela¹, Bruno Sangro^{2,3,4}, Maite G. Fernández-Barrena^{1,2,3}, Matías A. Ávila^{1,2,3}, María Arechederra^{1,2,*} and Carmen Berasain^{1,2,3,*}

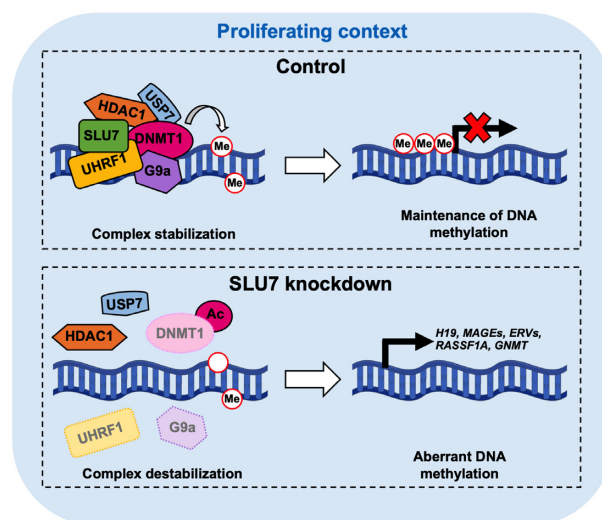
¹Program of Hepatology, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona 31008, Spain, ²IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona 31008, Spain, ³National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd, Carlos III Health Institute), Madrid 28029, Spain and ⁴Hepatology Unit, Navarra University Clinic, Pamplona 31008, Spain

Received March 22, 2021; Revised July 01, 2021; Editorial Decision July 19, 2021; Accepted July 21, 2021

ABSTRACT

Gene expression is finely and dynamically controlled through the tightly coordinated and interconnected activity of epigenetic modulators, transcription and splicing factors and post-translational modifiers. We have recently identified the splicing factor SLU7 as essential for maintaining liver cell identity and genome integrity and for securing cell division both through transcriptional and splicing mechanisms. Now we uncover a new function of SLU7 controlling gene expression at the epigenetic level. We show that SLU7 is required to secure DNMT1 protein stability and a correct DNA methylation. We demonstrate that SLU7 is part in the chromatin of the protein complex implicated in DNA methylation maintenance interacting with and controlling the integrity of DNMT1, its adaptor protein UHRF1 and the histone methyl-transferase G9a at the chromatin level. Mechanistically, we found that SLU7 assures DNMT1 stability preventing its acetylation and degradation by facilitating its interaction with HDAC1 and the desubiquitinase USP7. Importantly, we demonstrate that this DNMT1 dependency on SLU7 occurs in a large panel of proliferating cell lines of different origins and in *in vivo* models of liver proliferation. Overall, our results uncover a novel and non-redundant role of SLU7 in DNA methylation and present SLU7 as a holistic regulator of gene expression.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Multiple mechanisms are involved in the different - but interconnected- regulatory layers of gene expression, switching on and off transcription and widening the diversity of gene transcripts in a tissue and temporal manner. Among them, epigenetic marks are reversible modifications that without altering gene sequence determine chromatin structure and accessibility, resulting in transcription activation or repression (1,2). DNA methyltransferases (DNMTs) are the enzymes that add methyl groups to the 5' position of cytosine residues of CpG dinucleotides (3). CpG islands (CGIs) are generally located at promoter regions and when methylated interfere with transcription factor binding and recruit repressor complexes (1). DNA methylation patterns are faithfully inherited from the mother DNA molecule to

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 948194700; Fax: +34 948194717; Email: cberasain@unav.es
Correspondence may also be addressed to María Arechederra. Tel: +34 948194700; Fax: +34 948194717; Email: macalderon@unav.es

the daughters after each cell division (3,4). In particular, the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is the enzyme responsible for maintaining DNA methylation patterns during the S-phase of the cell cycle (5,6). Moreover, it is well established that DNA methylation plays a relevant role in maintaining genome stability (7–9). Indeed, deregulated DNA methylation is one of the early events in cell transformation (10,11), being DNMT1 essential for cancer cell proliferation and survival (12). In this context, DNMT1 levels are dynamically controlled by multiple mechanisms which mainly include allosteric interactions and post-translational modifications (13,14). DNMT1 phosphorylation, methylation and/or acetylation, among others, affect protein interactions, location and stability (13–15) in a dynamic and finely tuned fashion.

We have identified the splicing factor SLU7 as essential for maintaining the gene expression patterns required for securing differentiation, quiescence and metabolic function of the liver (16). In this context, SLU7 is controlling not only alternative splicing mechanisms but also the activity of transcriptional complexes, interacting with the RNA-polymerase and cAMP responsive proteins such as CREB and CBP (15). Moreover, we have demonstrated that SLU7 is required to preserve genome integrity and to secure correct cell division preventing the accumulation of R-loops, DNA damage and errors in chromosome segregation (17). Accordingly, the inhibition of SLU7 expression in pathological situations, such as liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC) (18), would contribute to the process of hepatocarcinogenesis. On the other side, we have demonstrated that SLU7 knockdown in transformed cells represents a cancer cell vulnerability. Our results show that the viability of tumor cells of multiple origins is compromised by the induction of mitotic stress upon SLU7 silencing (19).

Altogether our results and other published data demonstrate that SLU7 and DNMT1 control gene expression at different levels, but both play essential roles maintaining genome integrity, cell proliferation and cell survival. Recent results have demonstrated a narrow connection and interplay between the different mechanisms implicated in the regulation of gene expression including DNA methylation and alternative splicing (20,21). Having demonstrated that SLU7 regulates both splicing and transcription, we decided to investigate whether SLU7 also regulates DNA methylation, representing a new hub integrating different levels of gene expression regulation.

In the present work, we demonstrate for the first time that SLU7 is required for DNA methylation maintenance. We found that SLU7 is part in the chromatin of the protein complex implicated in maintaining DNA methylation as it physically interacts at the chromatin level with DNMT1, its adaptor protein ubiquitin-like with PHD and RING finger domains-1 (UHRF1) and the histone methyl-transferase G9a. Moreover, we demonstrate that SLU7 is needed to maintain the association of the complex with chromatin. Interestingly, our results demonstrate that SLU7 is required to maintain DNMT1 protein levels in proliferating cells, both *in vitro* and *in vivo*. In fact, SLU7 knockdown induced DNMT1 degradation in multiple cell lines of different origin and *in vivo* in models of liver regeneration after partial hepatectomy or liver damage. Mechanistically we found

that SLU7 is needed for the binding of histone deacetylase 1 (HDAC1) to DNMT1, preventing DNMT1 acetylation, and securing DNMT1 interaction with the deubiquitinating enzyme Ubiquitin-Specific Protease 7 (USP7) to stabilize DNMT1 protein. In summary, our present work demonstrates for the first time a role of SLU7 in DNA methylation, being essential to maintain the stability of DNMT1 protein regulating its post-translation modifications. These results uncover an unexpected function of SLU7 and demonstrate that SLU7 represents a regulator of gene expression with pleiotropic functions.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatments

All cell lines were obtained from the ATCC. The HCT116 *DNMT1*^{-/-} cell line was kindly provided by Dr Rob M. Ewing (Southampton, UK) and described in (22). Human HCC cell lines PLC/PRF/5 and HepG2, human cervical carcinoma cell line HeLa, human melanoma cell line A375 and human embryonic kidney immortalized cell line HEK293T were grown in DMEM (Gibco-Life Technology, Madrid, Spain) supplemented with 10% FBS, glutamine and antibiotics. Human non-small cell lung cancer cell line H358 and human adenocarcinoma cell line A549 were grown in RPMI (Gibco-Life Technology) supplemented with 10% FBS, glutamine and antibiotics. Human colon cancer cell line HCT116 and HCT116 *DNMT1*^{-/-} were grown in McCoy's 5A (Gibco-Life Technology) supplemented with 10% FBS, glutamine and antibiotics. Human breast cancer cell line MCF7 was grown in MEM (Gibco-Life Technology) supplemented with 10% FBS, insulin and antibiotics. Human glioblastoma cell line U87 was grown in DMEM/F12 (Gibco-Life Technology) supplemented with 10% FBS and antibiotics. All cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Where indicated, cells were treated before harvesting with the proteasome inhibitor 10 μM MG-132 (Calbiochem, CA, USA, 474790) for the last 20 h or with 20 μM MG-132 for the last 12 h; with the protein synthesis inhibitor 10 μg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich, MO, USA, C-7698) for 8 h and 12 h; with cell cycle drugs 20 μM lovastatin (Sigma-Aldrich PHR1285) or 2 μg/ml aphidicolin (Sigma-Aldrich A078) for 60 h or with 330 nM nocodazole (Sigma-Aldrich M1404) for 12 h or 60 h; with the demethylating agent 10 μM 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma, St. Louis, MO, USA) during 7 days.

siRNAs and plasmids transfections

Transfections with siRNAs were performed with Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Individual siRNAs were used at 75 nM. In those cases where combined siRNAs transfections were performed, each specific siRNA was used at 56.25 nM. Sequence of siRNAs will be provided upon request. Human siSLU7-2 and siSLU7-3 are two independent siRNAs directed to 2 different regions of SLU7. For overexpression experiments, plasmids were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following

the manufacturer's instructions. pcDNA6.1A-SLU7 plasmid was from GenScript BioTech (Piscataway, NJ, USA) and pcDNA3.1-HDAC1-Flag was kindly provided by Dr Donald E. Ayer (University of Utah, USA).

Total DNA isolation

Total DNA from cell lines was extracted using the automated Maxwell RSC Instrument with cultured cells DNA kit (Promega, Madison, WI, USA). DNA purity and concentration were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS)

Genome-wide DNA methylation analysis was carried out using the reduced representation bisulfite sequencing method (23) by Active Motif (Carlsbad, CA, USA). One μg of genomic DNA from 72 h PLC/PRF/5 siGL, siSLU7 and siDNMT1 transfected cells was sent for RRBS analysis. Briefly, DNA was digested with the methylation insensitive restriction enzyme MspI, which cleaves DNA at CCGG sites creating fragments with high CpG content. Samples were then end-repaired and A-tails were added according to manufacturer's conditions. Once the adapters were ligated, DNA was loaded on an agarose gel, and 40–220 bp length fragments were isolated for bisulfite conversion. The bisulfite converted DNA was amplified by PCR (library preparation) and sequenced on the Illumina HiSeq™ instrument. Upon bioinformatic analysis, reads were mapped to the human reference genome hg38 and the differential methylation analysis was generated using DMAP (24). The resulting regions were then annotated using the HOMER software package (25). The subsequent analyses only include CpGs covered by 3 or more unique reads. Chi-squared test was then applied. CpG sites were considered differentially methylated when the methylation difference between siSLU7 or siDNMT1 compared to siGL sample was higher than 0.6. CpGs were localized within or outside a CGI using the CpG island bedfile identification (UCSC website; <https://genome.ucsc.edu/>).

Methylation-specific PCR

One μg of genomic DNA was modified upon bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following manufacturer instructions. Methylation-specific PCR (MSP) was performed with 1/10 bisulfite-converted DNA, the Phusion U Hot Start DNA Polymerase kit (F-555S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and specific methylated (M) and unmethylated (U) primers for the targeted regions of *TRIM47*, *TFF3*, *DLG3*, *RASSF1A* and *GNMT*. PCR products were electrophoresed and visualized in GelRed Nucleic Acid (Biotium, Fremont, CA, USA) stained gels (2% agarose) under UV light. The sequence of primers used in the study will be provided upon request.

Methylation quantification ELISA kit

Quantification of global levels of 5-methylcytosine (5-mC) was performed using the MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) (Epigentek,

Farmingdale, NY, USA) following manufacturer's instructions, including a previous DNA denaturation step at 98°C for 5 min.

Total RNA isolation and PCRs

Total RNA from cell lines and tissues was extracted using the Maxwell RSC Instrument with simplyRNA tissue kit (Promega). RNA samples were treated with DNase to degrade all possible traces of contaminating genomic DNA (gDNA). Reverse transcription was performed as previously described (26). Real-time PCRs were performed using an iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) as previously described (27). To monitor the specificity final PCR products were analyzed by melting curves and the amount of each transcript was expressed relative to the housekeeping gene *RPLP0* as $2^{-\Delta\text{Ct}}$, where ΔCt represents the difference in threshold cycle between the control and target genes, as described (28). To analyze HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells, PCR using primers located on different exons of *DNMT1* and gel electrophoresis was performed. The sequence of primers used in the study will be provided upon request.

Immunofluorescence

For immunofluorescence, cells were cultured on coverslips and 72 h after transfection with siGL and siSLU7 were fixed with ice-cold methanol for 15 min at room temperature and washed twice with PBS. Quenching was performed with 50 mM NH₄Cl in PBS for 10 min. After washing three times with PBS, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min at 4°C and DNA was denatured with 4 M HCl for 15 min followed by 100 mM Tris-HCl pH 8.5 for 10 min. After washing, coverslips were blocked with Superblocking buffer (Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with anti-5-methylCytosine (Eurogentec, Seraing, Belgium BI-MECY 0100) diluted in 1% BSA in PBS. After washing, cells were incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies in 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature, washed and stained with vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing DAPI. Images were obtained using the Zeiss Axio Imager.M1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Protein extraction and Western blot analysis

For protein extraction, all cell lines were lysed in RIPA buffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, protease inhibitor cocktail Complete (Roche, Basel, Switzerland), 1 mM orthovanadate, 10 mM NaF, 100 mM β -glycerophosphate and sonicated. Lysates were cleared by centrifugation at 12 000 rpm for 20 min at 4°C. Protein concentration was measured using the BCA assay (Pierce Technologies, Rockford, IL, USA) according to manufacturer's specifications. Protein extracts were subjected to Western blot analyses as reported (26). Antibodies used were SLU7 (Novus, Biologicals, Centennial, CO, USA NBP2-20403; 1:1000), DNMT1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA 50325; 1:1000), DNMT1

(Abcam, Cambridge, UK ab13537; 1:1000), DNMT3B (Cell Signaling, 3598; 1:1000), DNMT3A (Cell Signaling, 672595; 1:1000), PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA SC56; 1:1000), H3S10P (Cell Signaling, 97015; 1:1000), HDAC1 (Santa Cruz, 7872; 1:1000), G9a (Cell Signaling, 33065; 1:1000), UHRF1 (Cell Signaling, 123875; 1:1000), Acetylated-lysine (Cell Signaling, 9441S; 1:1000), HAUSP (USP7) (Cell Signaling, 4833S; 1:1000), Histone 3 (Millipore, Burlington, MA, USA, 05-928; 1:3000), Cyclin A (Santa Cruz, sc-751; 1:1000), H3K9ac (Millipore, 06-911; 1:2000). Blots were probed with anti-ACTIN (Sigma-Aldrich, A2066; 1:6000) or anti-GAPDH (Cell Signaling, 21185; 1:6000), or stained with Ponceau S solution (Sigma-Aldrich) to demonstrate equal protein loading. Representative images are shown throughout the study.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation (IP) assays, cells were lysed in IP buffer with protease-phosphatase inhibitors (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40 and 2 mM EDTA) at 4°C for 30 min under constant rotation. Lysates were cleared by centrifugation at 12 000 rpm for 20 min at 4°C. Protein concentration was determined and 800–1000 µg of proteins were pre-cleared with 25 µl of Dynabeads G (Invitrogen) for 2 h under constant rotation at 4°C. In parallel, 5 µg of primary antibody and the corresponding control IgG were incubated with 20 µl of Dynabeads G for 2 h under constant rotation at room temperature. Finally, the Dynabeads with the antibodies were washed three times with citrate phosphate pH5 buffer with 0,01% Tween-20 and incubated with the pre-cleared samples overnight at 4°C under constant rotation. The day after, samples were washed three times with PBS (Gibco-Life Technology, Waltham, MA, USA) with proteases and phosphatases inhibitors and boiled in Laemmli buffer at 95°C for 5 min. Pelleted beads were separated using a magnetic separation rack and the supernatants were used for subsequent Western blot analysis. Antibodies used were: SLU7 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA 612604; 5 µg), DNMT1 (Abcam, ab13537; 5 µg), IgG mouse (Santa Cruz, SC2025; 5 µg).

Subcellular fractionation

Subcellular fractionation was performed to separate cytoplasm, nucleoplasm and chromatin-bound fraction for subsequent immunoprecipitation analysis. It was carried out using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Thermo Fisher Scientific, #78835) following manufacturer's instructions. Nuclear extracts were incubated in NP40 buffer (15 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0,1% NP40 and protease-phosphatase inhibitors) at 4°C for 30 min under constant rotation. The nucleoplasm and the chromatin bound fraction were separated by centrifugation at 2500 rpm for 10 min at 4°C. Chromatin bound fraction was then treated with 250 U/ul benzonase (Sigma-Aldrich) in a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% NP40 and protease-phosphatase inhibitors, at 4°C for 30 min and then cen-

trifuged at 13 000 rpm for 10 min at 4°C to get the supernatant.

Histone extraction

Histones were isolated as previously described (29). Briefly, cells were lysed in a buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl and 3 mM MgCl₂. After centrifugation at 2500 rpm for 10 min at 4°C supernatants were removed and pellets were lysed in the previous buffer but containing 0.5% NP40 on ice for 10 min with gentle stirring. Nuclei were pelleted by centrifugation at 2500 rpm for 10 min at 4°C and resuspended in 5 mM MgCl₂ and 0.8 M HCl. Nuclei were incubated in this buffer during 30 min at 4°C to extract the histones. Samples were then centrifuged at 14 000 rpm for 10 min at 4°C to pellet debris and supernatants were transferred to a clean tube where trichloroacetic acid (TCA) 50% was added to precipitate the histones. After washing the pellets with acetone, they were air-dried and resuspended in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA and 1% SDS. The histone concentration in the extract was measured using the BCA assay (Pierce Technologies, Rockford, IL, USA) according to manufacturer's specifications.

Animal experiments

All animal used received humane care according to the criteria outlined in the 'Guide for the care and Use of Laboratory Animals' prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985). Protocols were also approved and performed according to the guidelines of the Ethics Committee for Animal Testing of the University of Navarra (CEEA-062/16) and Navarra Government (GN 2016/325511).

C57BL/6J 8-week-old male mice (Harlan, Indianapolis, IN, USA) were injected i.v. with control (AAV-Ren) and liver expressing shSLU7 (AAV-shSLU7) adenoassociated virus (1×10^{11} pfu) constructed, produced and purified as described (16). Experiments were performed 15 days after AAV injection with at least 5 animals per group and were repeated at least twice. Mice were maintained under fed conditions with regular chow. Two-thirds partial hepatectomy (PH) and sham operations were performed as described previously (28). Animals were killed 24, 48 or 72 h after surgery. For induction of acute and chronic liver damage, mice were i.p. injected with a 1:1 mixture of CCl₄ in corn oil (0,6 µL CCl₄/g body weight, i.p.) twice a week during 1 week or during 5 weeks, respectively as described (30,31). Twenty-four or forty-eight hours after the last injection mice were humanely sacrificed and livers were collected for RNA and protein extraction.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 8). Data were represented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistically significant differences were estimated by applying two-sided unpaired Student's *t*-test or Mann-Whitney *U*-test according to sample distribution. All experiments were performed

at least three times in duplicate. A *P*-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

SLU7 knockdown leads to aberrant DNA methylation

In view of the fundamental roles played by SLU7 in the preservation of genome integrity and the correct cell cycle division, we decided to explore whether this factor could also impact on DNA methylation inheritance. We first measured the levels of 5-methylcytosine (5-mC) in control and SLU7 depleted cancer cell lines using a global DNA methylation assay. Remarkably, SLU7 knockdown significantly decreased global 5-mC content in the hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and HepG2, the colorectal carcinoma cell line HCT116 and the lung cancer cell line H358 (Figure 1A). The loss of 5-mC upon SLU7 knockdown was confirmed by immunofluorescence, using a labeled anti-5-mC antibody, in PLC/PRF/5 and HepG2 SLU7 cells (Figure 1B). To better characterize the effect of SLU7 knockdown on DNA methylation we performed reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) to determine genome-wide CpG sites methylation changes. DNMT1 knockdown was performed in parallel as control and for comparison (Supplementary Figure S1A). Considering a methylation difference higher than 0.6 we identified a total of 13,128 and 9,143 differentially methylated CpGs in siDNMT1 and siSLU7 transfected PLC/PRF/5 cells respectively (Figure 1C and D). In both cases, these CpGs were homogeneously distributed amongst all the autosomal and sex chromosome pairs (Supplementary Figure S1B). According with published data on DNMT1 activity inhibition (32) or even *Dnmt1* knockout (33), among the differentially methylated CpGs, 84% were hypomethylated and 16% hypermethylated in the absence of DNMT1 (Figure 1C). Those percentages were 62% and 38% respectively in the absence of SLU7 (Figure 1D). Interestingly, the knockdown of both genes induced the hypomethylation of scattered CpGs distributed along the genome, with a ratio of ~1.2 CpGs per gene (Figure 1E). Moreover, although only a small proportion of CpGs were located within CpG islands (CGIs; Figure 1E), 63% in siSLU7 and 46% in siDNMT1 were at promoter regions. When we compared the list of genes hypomethylated after SLU7 and DNMT1 knockdown we found 2,104 common genes (Figure 1F, top). However, the overlap of single hypomethylated CpGs only included 993 sites (Figure 1F, bottom). Altogether, these findings suggest that SLU7 is important for DNA methylation process. More specifically, the transient depletion of SLU7 results in a bulk hypomethylation of scattered single CpGs along the genome, apparently without impacting on specific gene regions, comparable to what is found in DNMT1 depleted cells.

SLU7 knockdown activates gene expression silenced by DNA methylation

As mentioned above, the majority of the differentially methylated CpGs were scattered along the genome, however, bioinformatic analyses identified a set of genes for

which more than 6–9 CpGs within the same genomic region were hypomethylated in both siSLU7 and siDNMT1 PLC/PRF/5 cells. This was the case of the E3 ubiquitin-protein ligase *TRIM47* a member of the tripartite motif-containing (TRIM) proteins superfamily, the trefoil factor *TFF3*, and the membrane-associated guanylate kinase protein disc large homolog *DLG3* (Figure 2A). To validate these RRBS results, we carried out methylation-specific PCR (MSP) analyses at these identified regions. As shown in Figure 2B, we confirmed the loss of DNA methylation in *TRIM47* and *DLG3* and the increase of DNA demethylation in *TFF3* upon both SLU7 and DNMT1 knockdown in PLC/PRF/5 cells. Among the three regions analyzed, those from *TRIM47* and *DLG3* were located within CGIs in the promoter and exon 1, whereas that of *TFF3* was at the gene body and not within a CGI (Supplementary Figure S2A). Promoter hypermethylation is associated with gene silencing whereas promoter demethylation is linked to gene activation (34). To further validate the extent of SLU7 impact on DNA methylation, we tested whether SLU7 knockdown may also activate the expression of methylated genes. We thus tested the expression of *TRIM47* and *DLG3* and found that SLU7 silencing resulted in the upregulation of both mRNAs (Figure 2C).

We next studied the impact of SLU7 knockdown in the regulation of genes characteristically hypermethylated and silenced in cancer such as *RASSF1A* (35) and *GNMT* (36,37). SLU7 silencing in PLC/PRF/5 cells induced DNA demethylation and gene upregulation of both genes (Figure 2D and E). *GNMT* promoter demethylation and gene reactivation after SLU7 knockdown were also confirmed in HepG2 and HCT116 cells (Figure 2F and G). Furthermore, it has been described that global DNA hypomethylation induces innate and acquired immunity (38) through different mechanisms, including the induction of expression of endogenous retroviruses (ERVs) (39) and cancer-testis antigens (CTAs) (40). Interestingly, we observed the induction of *MAGE-A1*, *MAGE-A7* and *envFc2* upon SLU7 silencing in the four human cancer cell lines analyzed (Figure 2H). Similarly, up-regulation of the *H19* imprinted gene was also observed upon SLU7 knockdown (Figure 2H). Comparable data were observed in PLC/PRF/5 cells treated with the demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine (Supplementary Figure S2B).

Collectively, these findings demonstrate that SLU7 knockdown is associated with the up-regulation of genes transcriptionally silenced by DNA methylation, and therefore highlight the contribution of SLU7 to epigenetic regulation of gene expression.

SLU7 knockdown reduces DNMT1 protein levels in proliferating cells

Next, we set out to characterize the mechanisms involved in the regulation of DNA methylation by SLU7. As SLU7 silencing mimics DNMT1 knockdown, we decided to evaluate the level of expression of DNMT1 upon SLU7 knockdown. Interestingly, depletion of SLU7 in PLC/PRF/5 cells resulted in a dramatic and consistent decrease of DNMT1 protein levels, reaching a 60% reduction as soon as 24h after siSLU7 transfection, an effect that was maintained

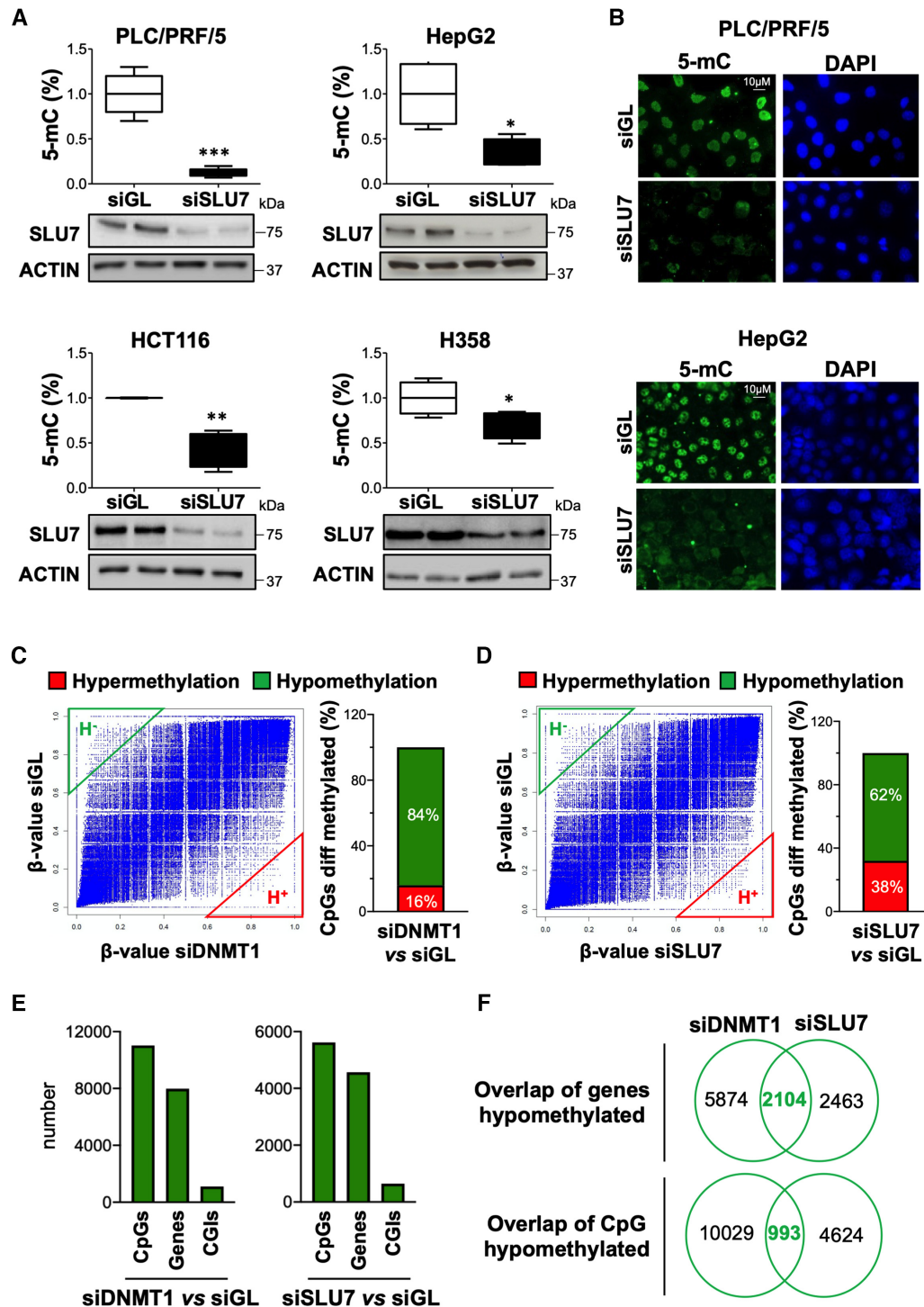


Figure 1. SLU7 knockdown compromises DNA methylation. (A) SLU7 knockdown induces a decrease in 5-methyl-cytosine (5-mC) content. DNA methylation levels were analyzed by ELISA 72 h after transfection with siSLU7 or control siGL in the human hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and HepG2, the colorectal carcinoma cell line HCT116 and the lung cancer cell line H358. The percentage of 5-mC content is indicated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Western blot analysis confirms SLU7 knockdown. ACTIN was used as loading control. At least three independent experiments in duplicate were performed for each cell line. (B) Representative images of 5-methyl cytosine (5-mC) immunodetection (in green) in PLC/PRF/5 (top) and HepG2 (bottom) cells 72 h after transfection with siSLU7 or control siGL. Nuclei were stained with DAPI (in blue). Scale bar: 10 µm. (C, D) Scatter plots of reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) DNA methylation β -values of siGL versus siDNMT1 (C) or siGL versus siSLU7 (D) PLC/PRF/5 cells 72 h after transfection. Fold change methylation differences higher than 0.6 were highlighted within a green triangle (hypomethylated) or a red triangle (hypermethylated). Graphs represent the percentage of hypomethylated (FC < 0.6) and hypermethylated (FC > 0.6) CpGs. (E) Number of single CpGs, genes with CpGs and CpGs within CpG islands (CGIs) found hypomethylated (FC < 0.6) in PLC/PRF/5 cells 72 h after transfection with siDNMT1 (left) or siSLU7 (right) compared to control siGL cells. (F) Venn diagram of the overlap between genes (top) or CpGs (bottom) found hypomethylated (FC < 0.6) in siSLU7 and siDNMT1 PLC/PRF/5 transfected cells when compared with control siGL cells.

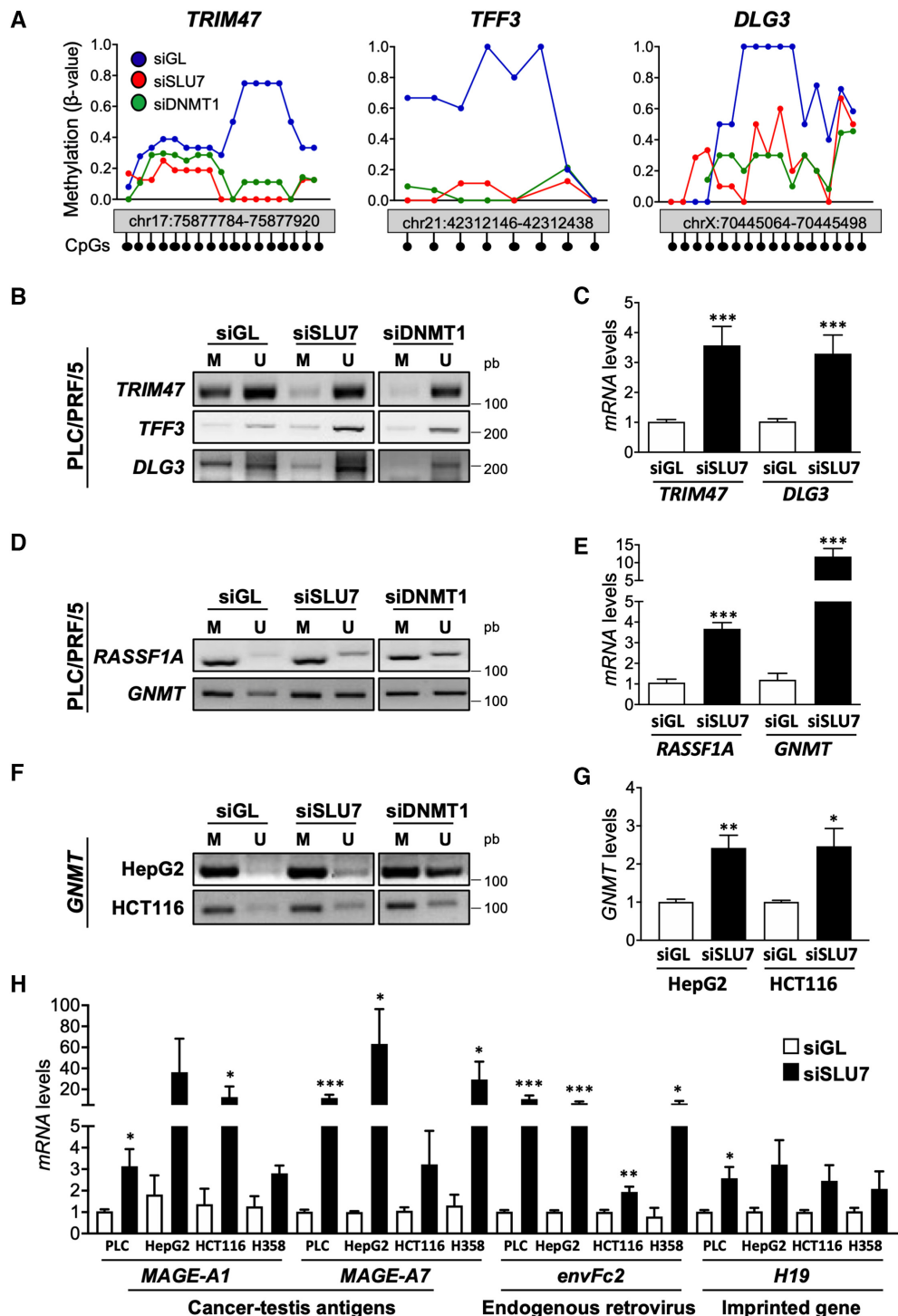


Figure 2. SLU7 knockdown activates transcription of genes silenced by DNA methylation. (A) Graphs reporting DNA methylation levels (β -values obtained by Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) analysis) of *TRIM47*, *TFF3* and *DLG3* gene regions found hypomethylated in both SLU7 (siSLU7, in red) and DNMT1 (siDNMT1, in green) knockdown PLC/PRF/5 cells compared to control siGL (in blue) cells 72 h after transfection. (B) Representative methylation-specific PCR (MSP) results for DNA methylation analysis of *TRIM47*, *TFF3* and *DLG3* regions shown in (A). U: unmethylated and M: methylated. (C) Expression by RT-qPCR of *TRIM47* and *DLG3* in PLC/PRF/5 cells 72 h after transfection with siSLU7 or control siGL. (D, E) DNA methylation analysis by MSP of *RASSF1A* and *GNMT* promoter regions (D) and *RASSF1A* and *GNMT* expression by RT-qPCR (E) in PLC/PRF/5 cells 72 h after transfection with siSLU7, siDNMT1 or control siGL. U: unmethylated and M: methylated. (F, G) DNA methylation analysis by MSP of *GNMT* promoter region (F) and *GNMT* expression by RT-qPCR (G) in HepG2 and HCT-116 cells 72 h after transfection with siSLU7, siDNMT1 or control siGL. U: unmethylated and M: methylated. (H) Expression by RT-qPCR of cancer testis antigens (*MAGE-A1* and *MAGE-A7*), endogenous retroviruses (*envFc2*) and imprinted genes (*H19*) in PLC/PRF/5, HepG2, HCT116 and H358 cells 72 h after transfection with siSLU7 or control siGL. *RPLP0* expression was used as housekeeping gene in (C, E, G, H). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.

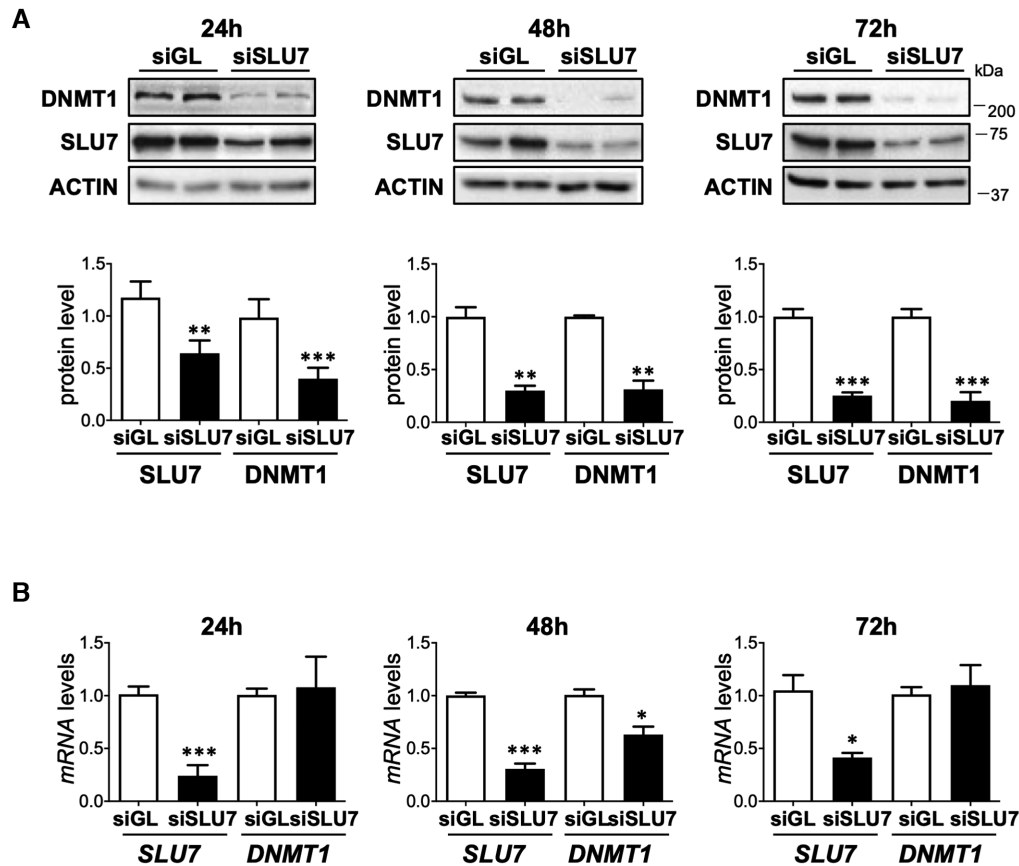


Figure 3. SLU7 knockdown decreases DNMT1 protein levels in proliferating cells. (A) Representative Western blots (top) of DNMT1 and SLU7 in PLC/PRF/5 cells 24, 48 and 72 h after transfection with siSLU7 or control siGL. ACTIN expression was shown as loading control. SLU7 and DNMT1 protein levels were quantified using Image J software from at least three independent experiments with biological duplicates per condition (bottom). (B) Histograms reporting *SLU7* and *DNMT1* mRNA levels by real time PCR in the same experiments analyzed in panel A. *RPLP0* expression was used as housekeeping gene in (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

or even increased after 48h and 72h (Figure 3A). Quantitative RT-PCR analysis showed that the quick reduction of DNMT1 protein was not associated with a decrease in *DNMT1* mRNA levels (Figure 3B), suggesting that SLU7 directly impacts on DNMT1 protein stability. We also evaluated the levels of the other known DNA methyltransferases, DNMT3A and DNMT3B, and found that changes in DNMT3A and DNMT3B mRNA and/or protein levels upon SLU7 depletion were less consistent and occurred at later time points (Supplementary Figure S3A and B). Based on these results, we decided to focus our study on the regulation of DNMT1 by SLU7.

As mentioned before, SLU7 is a splicing regulator essential in the second catalytic step during the pre-mRNA splicing process (41). Furthermore, we have recently shown that reduced SLU7 expression may lead to the emergence of truncated protein forms due to splicing alterations (17). Therefore, it was important to rule out the possibility that the reduced levels of DNMT1 protein observed after SLU7 knockdown were associated with the generation of smaller DNMT1 protein forms by alternative splicing. Both, the PCR analysis performed with primers located on exon 1 and exon 17, and the Western blot analyses performed with antibodies directed against two different epitopes of DNMT1

protein (Supplementary Figure S3C and D), revealed the absence of truncated DNMT1 isoforms after SLU7 silencing.

These observations suggested the involvement of other mechanisms apparently independent of the activity of SLU7 as a splicing regulator. It has been described a cell-cycle phase-dependent regulation of DNMT1 levels (42,43) and we have previously shown that SLU7 knockdown induces a significant cell cycle arrest at G2/M phase in cancer cell lines of different origins (17). We therefore wondered whether the observed reduction in DNMT1 upon SLU7 knockdown might be attributable to the arrest of the cells at G2/M phase. However, we did not observe changes in DNMT1 protein in PLC/PRF/5 cells arrested at G2/M after overnight nocodazole treatment (Supplementary Figure S4A). This allowed us to conclude that the reduction in DNMT1 protein levels observed upon SLU7 knockdown is independent of SLU7-induced G2/M arrest. We then evaluated whether DNMT1 reliance on SLU7 expression was maintained along the different phases of the cell cycle. To do so, we arrested PLC/PRF/5 cells at G1, S and G2/M phases by lovastatin, aphidicolin and nocodazole treatment, respectively (Supplementary Figure S4B). Similar to non-synchronized cells, decreased level of DNMT1

protein was found at G1, S and G2/M arrested cells upon SLU7 depletion (Supplementary Figure S4C). We also arrested cells at G0 resting phase through cell contact inhibition by confluence together with FBS starvation before siGL and siSLU7 transfection. As already described (42), it is important to note that DNMT1 levels were significantly reduced when cells were arrested at G0 (Supplementary Figure S4D). However, in this condition, SLU7 knockdown did not significantly affect DNMT1 levels (Supplementary Figure S4D). Finally, to discriminate whether DNMT1 loss triggered by SLU7 depletion was linked to the transformed status of PLC/PRF/5 cells, or whether it was associated with the proliferating state of the cells, we tested DNMT1 levels after SLU7 knockdown in the widely used non-transformed HEK293T cell line. Similar to cycling PLC/PRF/5 cells, we observed a significant reduction in DNMT1 protein contents in HEK293T cells after SLU7 knockdown (Supplementary Figure S4E). Moreover, when HEK293T cells were arrested at G0, SLU7 depletion did not affect DNMT1 levels (Supplementary Figure S4E). All these data demonstrate that DNMT1 protein dependency on SLU7 levels is a general event in proliferating cells.

SLU7 is required to maintain DNMT1 protein stability in proliferating cells of very different origins

We next studied whether DNMT1 dependency on SLU7 levels might occur in different cell types. To this end, we analyzed DNMT1 protein levels after SLU7 knockdown in a wide panel of human cancer cell lines from different origins, including the hepatoma cell line HepG2, the colorectal carcinoma cell line HCT116, the lung cancer cell lines H358 and A549, the cervical carcinoma cell line HeLa, the breast carcinoma cell line MCF7, the glioblastoma cell line U87 and the melanoma cell line A375. In all the cell lines examined, independently of their origin, SLU7 knockdown drastically reduced DNMT1 protein levels (Figure 4A). To confirm specificity, these data were confirmed using two independent SLU7 siRNAs in a set of cell lines (Supplementary Figure S5A). Again, and in agreement with Figure 3B, *DNMT1* mRNA levels were not affected by SLU7 knockdown (Supplementary Figure S5B). On the other hand, ectopic overexpression of SLU7 resulted in the elevation of DNMT1 protein contents in PLC/PRF/5, HepG2 and HCT116 cells (Figure 4B and Supplementary Figure S5C), and had no effect on DNMT1 mRNA levels (Figure 4C).

Next, we conducted a series of experiments to elucidate the fundamental processes through which SLU7 could control DNMT1 protein steady state levels. First, we tested if reduced SLU7 expression could lead to DNMT1 protein degradation. To this end, we treated different cell lines with the proteasome inhibitor MG-132 in the face of SLU7 knockdown. We observed that the decrease in DNMT1 protein observed after SLU7 silencing was blunted by the addition of MG-132 in all the cell lines analyzed (PLC/PRF/5, HCT116 and HEK293T; Figure 4D). On the other hand, in order to exclude that SLU7 was required for DNMT1 protein synthesis, we treated siGL and siSLU7 cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide. We found that SLU7 knockdown resulted in DNMT1 downregulation

even when protein synthesis was inhibited (Supplementary Figure S5D). Taken together, these data indicate that SLU7 enhances DNMT1 protein stability, preventing its degradation, through mechanisms that are conserved among cell lines of different origins, including non-transformed cells.

SLU7 is a new partner essential for the stability of the DNMT1/UHRF1/G9a complex

Our results so far demonstrate that SLU7 is required to secure DNMT1 protein stability and function. As a first step towards understanding the mechanism by which SLU7 stabilizes DNMT1, we sought whether SLU7 and DNMT1 could physically interact. As illustrated in Figure 5A, co-immunoprecipitation assays performed in different cell lines, both with anti-SLU7 and anti-DNMT1 antibodies, revealed the interaction between endogenous SLU7 and DNMT1 proteins (Figure 5A). Moreover, and considering that upon SLU7 silencing the 5-mC levels drastically fell down (Figure 1), we analyzed SLU7/DNMT1 interaction at the chromatin level, as well as the interaction of SLU7 with other members of the chromatin protein complex responsible of DNA methylation maintenance which include the adaptor protein UHRF1 and the histone methyl-transferase G9a (44–46). Firstly, we prepared different cellular fractions, including cytoplasm, nucleoplasm and chromatin-bound fractions. As expected, we found that all the proteins analyzed were predominantly localized at the chromatin-bound fraction (Figure 5B input). Co-immunoprecipitation assay on chromatin fraction confirmed the interaction between SLU7 and DNMT1, and strikingly revealed that, as observed for DNMT1, SLU7 also interacted with G9a and UHRF1 (Figure 5B). Since SLU7 knockdown reduced DNMT1 protein levels, we wondered whether the level of the other members of the complex would also depend on SLU7. We therefore analyzed the levels of DNMT1, G9a, UHRF1, together with PCNA and histone H3 as controls in the chromatin-bound fraction, and found that knockdown of SLU7 markedly reduced the association of DNMT1, G9a and UHRF1 with the chromatin (Figure 5C). These results show that SLU7 not only interacts with DNMT1, G9a and UHRF1 in the chromatinome but also that SLU7 is required to maintain their association with chromatin.

To further explore the relevance of SLU7 in maintaining DNMT1 levels, we next examined whether DNMT1 stability was also governed by other members of the complex. Consistent with previous observations (44,45,47), we found that knockdown of G9a and UHRF1 did not affect DNMT1 abundance both in PLC/PRF/5 and HCT116 cells (Figure 5D), highlighting the relevant and non-redundant role of SLU7. Moreover, the effect of SLU7 depletion on DNMT1 stability cannot be attributed to its release from chromatin, as it has been described that UHRF1 silencing reduces the association of DNMT1 with chromatin without affecting its levels (45). Interestingly, our results evidenced that SLU7 is required to maintain G9a and UHRF1 global levels (Figure 5D), suggesting that SLU7 knockdown results in a so drastic disruption of the protein

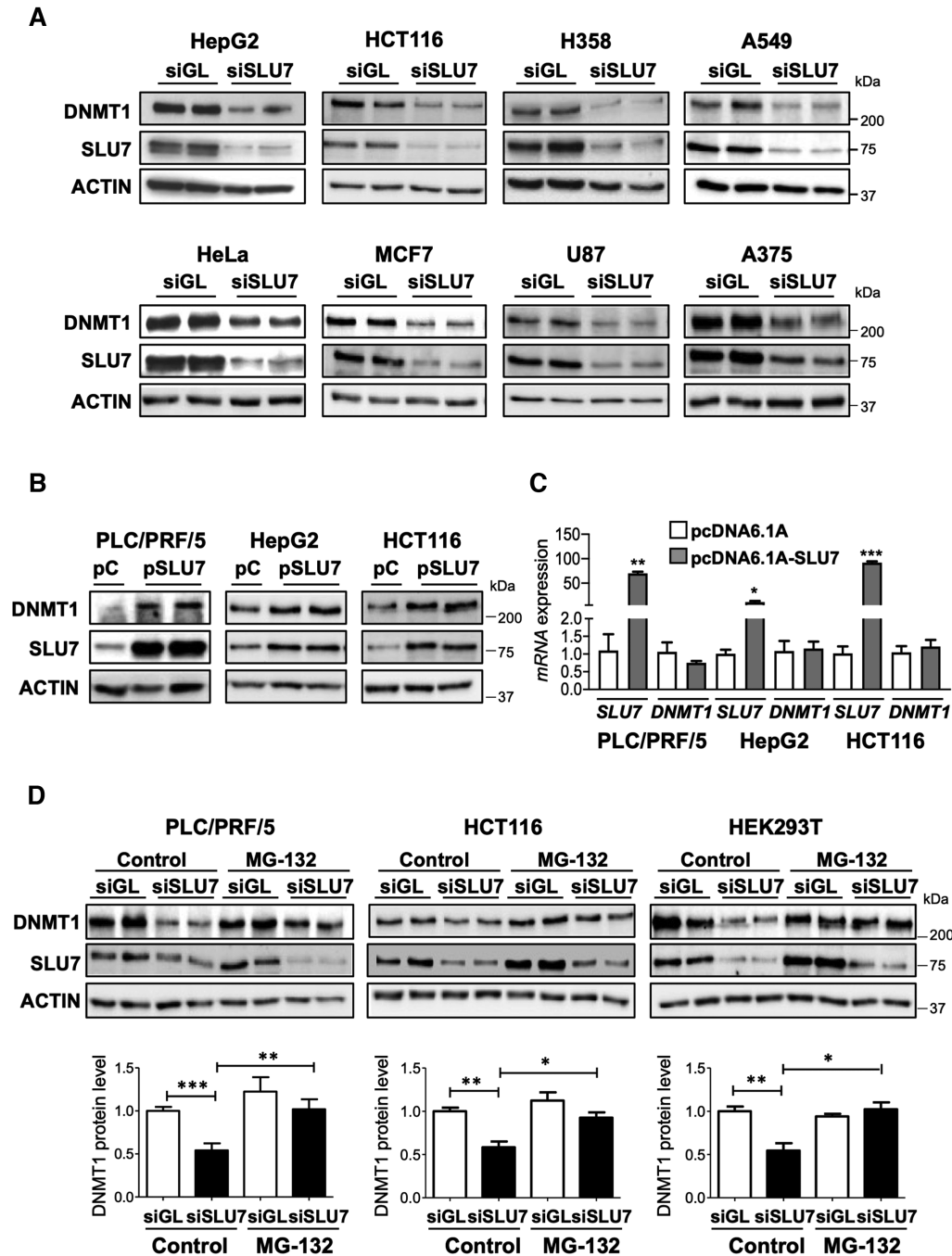


Figure 4. SLU7 is required for DNMT1 protein stability in a wide panel of cell lines from different origins. (A) Western blots of DNMT1 and SLU7 in HepG2, H358, A549, HCT116, HeLa, MCF7, U87 and A375 cancer cell lines 48h after transfection with siSLU7 or control siGL. ACTIN expression was shown as loading control. (B, C) pcDNA6.1A empty plasmid (pC) or the corresponding plasmid to express SLU7 (pSLU7) were transiently transfected for 48 h in PLC/PRF/5, HepG2 and HCT116 cells followed by Western blot (B) and real time PCR (C) analyses of DNMT1 and SLU7. ACTIN expression was shown as loading control in (B). *RPLP0* expression was used as housekeeping gene in (C). (D) PLC/PRF/5 and HEK293T cells transfected with siGL or siSLU7 for 48 h and treated with 10 μ M MG-132 for the last 20 h were harvested to analyze DNMT1 and SLU7 expression by Western blot. HCT116 cells were transfected with siGL or siSLU7 for 36 h and treated with 20 μ M MG-132 for the last 12 h before harvesting. The expression of ACTIN was analyzed as loading control. DNMT1 protein levels were quantified using ImageJ software from at least three independent experiments with biological duplicates per condition (bottom). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

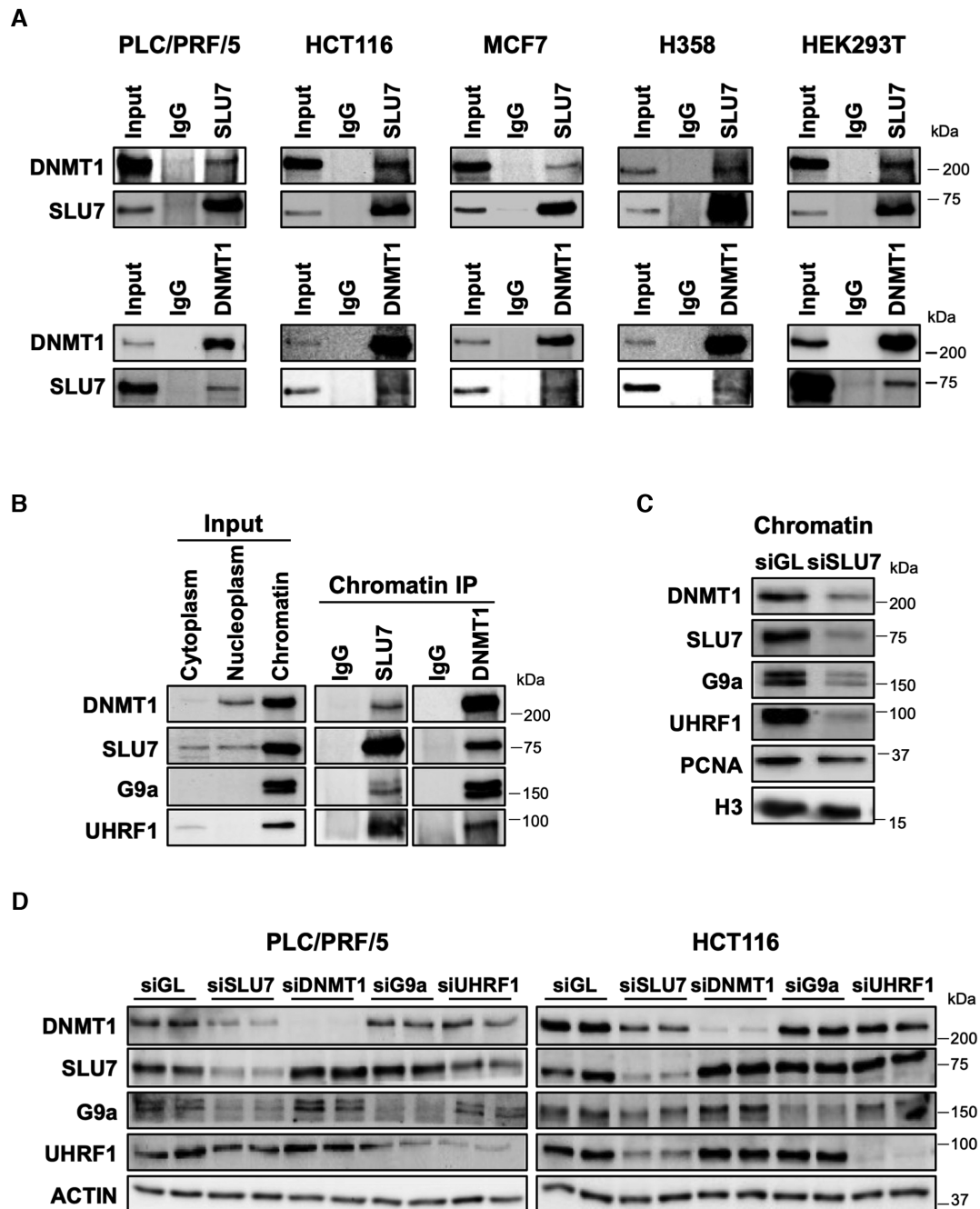


Figure 5. SLU7 is part of the methylation complex DNMT1/UHRF1/G9a and it is required for its stability on the chromatin. (A) SLU7 and DNMT1 were coimmunoprecipitated with each other in PLC/PRF/5, HCT116, MCF7, H358 and HEK293T cells. Pre-immune IgG immunoprecipitation and Inputs were shown as control. (B) Chromatin-bound cell extracts from PLC/PRF/5 cells were immunoprecipitated with anti-SLU7 and anti-DNMT1 antibodies or pre-immune IgG and blotted with DNMT1, SLU7, G9a and UHRF1 antibodies. Western blot on inputs from the different subcellular fractions were shown as control. (C) Chromatin extract for PLC/PRF/5 cells 48 h after transfection with siSLU7 were analyzed by western blot with antibodies against DNMT1, SLU7, G9a and UHRF1. HISTONE 3 and PCNA were used as loading control. (D) DNMT1, SLU7, G9a and UHRF1 protein levels were analyzed by western blot in PLC/PRF/5 and HCT116 cells 48 h after transfection with control siGL, siSLU7 siDNMT1, siG9a and siUHRF1. ACTIN was used as loading control.

complex that compromises the stability of all the components.

SLU7 knockdown induces DNMT1 acetylation

Many of the proteins interacting with DNMT1 are implicated in adding or removing post-translational modifications affecting its stability, therefore we decided to explore whether SLU7 could modulate DNMT1 covalent modifications. The post-translational modifications that regulate DNMT1 protein stability include phosphorylations, methylations and acetylations (48–52). For instance, S143 phosphorylation (50) stabilizes DNMT1, while K142 monomethylation (53) and several acetylations (52,54,55) destabilize this protein. The mentioned phosphorylation and methylation reactions occur at the DNMT1 region lost in the widely used HCT116 *DNMT1*^{-/-} cell line which expresses a truncated DNMT1 generated by homozygous deletion of Ex3-Ex5 (56) (Supplementary Figure S6A and B). As shown in Figure 6A, and similar to the wild type cell line (Figure 4A), SLU7 knockdown in HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells reduced DNMT1 protein levels as fast as 24 h after siSLU7 transfection (Figure 6A) without affecting its mRNA (Figure 6B). These results suggest that SLU7 regulation of DNMT1 stability is independent of the post-translational modifications occurring in the amino-terminal region, as it is absent in this truncated DNMT1 protein.

Ruling out the implication of the described phosphorylation and methylation modifications, we next evaluated DNMT1 acetylation upon SLU7 knockdown. As shown in Figure 6C, immunoprecipitation of endogenous DNMT1 in control and SLU7 knockdown PLC/PRF/5 and HEK293T cells demonstrated an increase in DNMT1 acetylation after SLU7 depletion (Supplementary Figure S6C). It has been described that DNMT1 acetylation impairs its interaction with USP7 (54). Accordingly, we observed a decrease in USP7-DNMT1 interaction in SLU7 silenced cells (Figure 6C). These results suggest that SLU7 prevents DNMT1 acetylation. As it has been shown that the histone deacetylase 1 (HDAC1) deacetylates and protects DNMT1 from proteasomal degradation (51,57), we decided to examine HDAC1 levels in SLU7 knockdown cells, observing that HDAC1 levels were only slightly reduced (Figure 6D). However, in parallel, we confirmed (51,57) that HDAC1 inhibition with a specific HDAC1 siRNA decreased DNMT1 protein levels (Figure 6D and Supplementary Figure S6D) similarly to SLU7 depletion. To exclude a role of HDAC1 reduction in SLU7 knockdown-mediated DNMT1 degradation, we tested the effects of HDAC1 overexpression. As shown in Figure 6E, the ectopic expression of HDAC1 did not impair DNMT1 loss upon SLU7 knockdown (Figure 6E and Supplementary Figure S6D). The fact that overexpression of HDAC1 in SLU7 depleted cells did not protect DNMT1 from degradation, led us to hypothesize that SLU7 may be necessary for the interaction between DNMT1 and HDAC1, facilitating HDAC1-mediated DNMT1 deacetylation and stabilization. In fact, co-immunoprecipitation assays with both, anti-SLU7 and anti-DNMT1 antibodies, revealed the interaction between endogenous SLU7, DNMT1 and HDAC1 proteins (Figure 6F). More importantly, downregulation of SLU7 significantly reduced the

interaction between DNMT1 and HDAC1 (Figure 6G and Supplementary Figure S6E). All these data suggest that SLU7 is required for HDAC1 binding to DNMT1, preventing DNMT1 acetylation, and averting its proteasomal degradation.

SLU7 is required for DNMT1 stability *in vivo*

Having shown that SLU7 is required to maintain DNMT1 stability in multiple cell lines *in vitro*, we wondered whether SLU7 was also necessary to maintain DNMT1 protein stability *in vivo*. We took advantage of the *in vivo* proliferating scenario of liver regeneration after partial hepatectomy, where DNMT1 gains functional prominence (33). We carried out 2/3 partial hepatectomy (PH) in mice 21 days after knocking down SLU7 expression with an adeno-associated virus (AAV) encoding a SLU7-specific shRNA (AAV-shSLU7) (16,17) (Supplementary Figure S7A). As described (58), *Dnmt1* mRNA levels were similarly induced after 24 h, 48 h and 72 h of PH in both control AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice (Figure 7A). However, the increase in DNMT1 protein levels was compromised in AAV-shSLU7 mice compared with control AAV-Ren mice both at 48 h and 72 h after PH (Figure 7B). Indicative of alterations in global DNA methylation in the context of SLU7 knockdown during hepatocellular regeneration, we observed the induction of expression of the *H19* imprinted gene in AAV-shSLU7 mice (Supplementary Figure S7B). To strengthen these observations, we studied DNMT1 SLU7 dependency in two other models of hepatic proliferation associated with acute and chronic liver injury (Supplementary Figure S7C and D). In both cases, the level of DNMT1 protein induced upon treatment with the hepatotoxin CCl₄ was lower in AAV-shSLU7 than in control AAV-Ren-infected mice (Figure 7C). To evaluate whether the mechanisms identified *in vitro* also operate *in vivo*, we checked whether liver DNMT1 and SLU7 interacted with each other after PH and CCl₄ treatment. *In vivo* co-immunoprecipitation assays revealed the interaction between DNMT1 and SLU7 and more importantly, their association with HDAC1 (Figure 7D). These results show for the first time that the presence of the splicing factor SLU7 is essential to ensure the high levels of cellular DNMT1 protein induced *in vivo* in a proliferating scenario.

DISCUSSION

Gene expression is a tightly controlled cell-type specific and dynamic process. Its regulation involves epigenetic modifications of chromatin to allow the access of the transcriptional machinery to the DNA, the subsequent processing of the pre-mRNAs and the translation of the specific mRNAs into proteins. These mechanisms are finely coordinated and interconnected, and involve the activity of epigenetic modulators, transcription and splicing factors and post-translational modifiers (59,60) which in many cases are essential to preserve cell identity and cell survival. In the last years, our laboratory has discovered that the splicing regulator SLU7 is required to preserve the mature and functional hepatic transcriptome (16) and we have uncovered its crucial role to secure correct cell division, preventing the induction of genome instability and cell cycle arrest

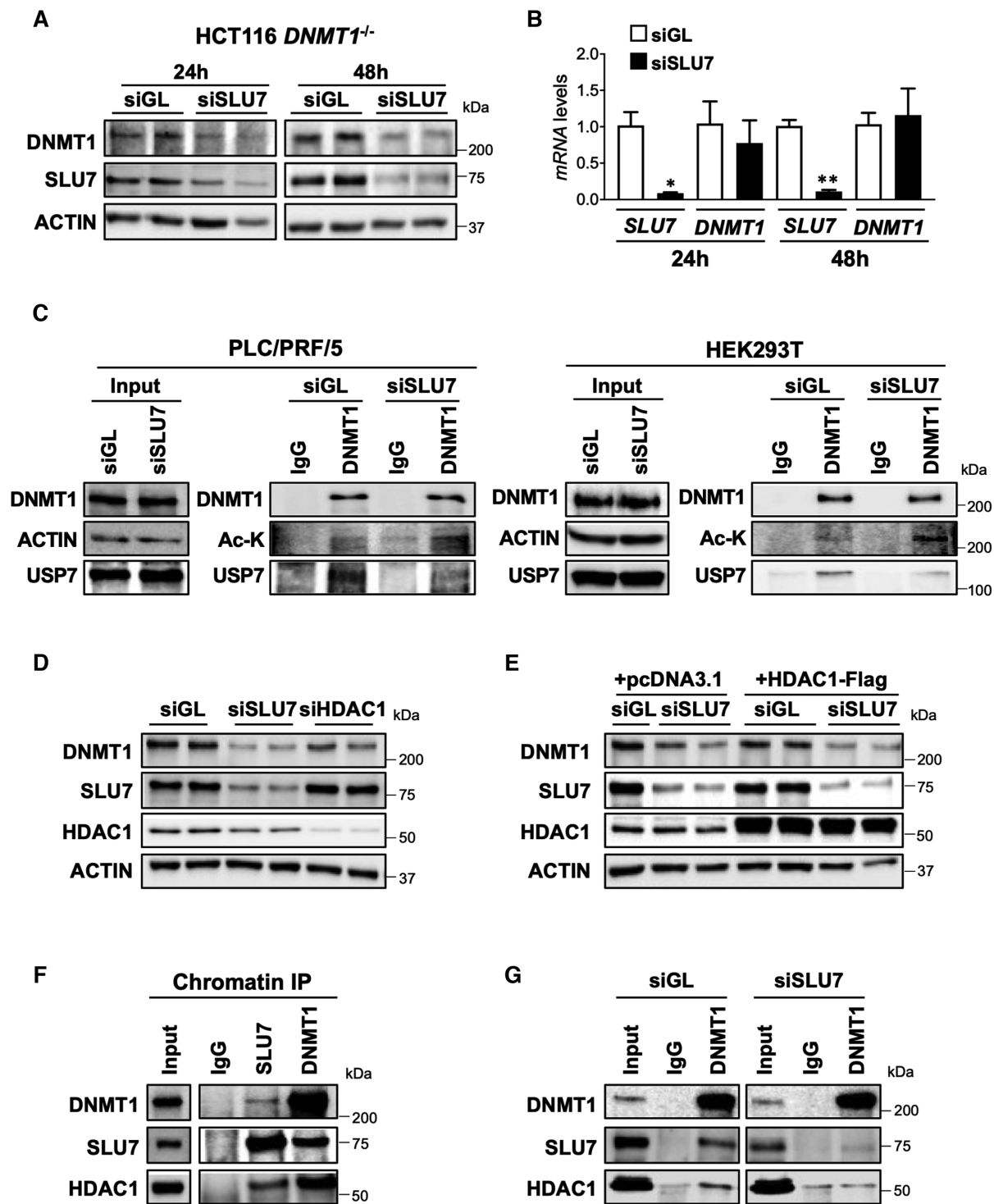


Figure 6. SLU7 knockdown induces DNMT1 acetylation and impairs HDAC1-DNMT1 interaction. (A) Representative Western blots of DNMT1 and SLU7 in HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells 24 and 48 h after transfection with siSLU7. ACTIN expression was shown as loading control. (B) Histograms reporting *SLU7* and *DNMT1* mRNA levels by real time qPCR from three independent experiments including those shown in panel A. *RPLP0* expression was used as housekeeping gene. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (C) SLU7 knockdown leads to increase acetylation of endogenous DNMT1. Protein lysates from 36h control siGL and siSLU7 transfected PLC/PRF/5 and HEK293T cells treated with 10 μ M MG-132 for the last 20 h were immunoprecipitated with anti-DNMT1 and blotted with anti-acetyl-lysine (Ac-K), DNMT1 and USP7 antibodies. DNMT1, USP7 and ACTIN are shown as control in the cell inputs. (D) DNMT1 protein decrease was detected by Western blot analysis in PLC/PRF/5 cells 48 h after SLU7 and HDAC1 knockdown. (E) DNMT1, SLU7 and HDAC1 protein levels were analyzed by Western blot in PLC/PRF/5 cells 36 h after transfection with control siGL or siSLU7 and pcDNA3.1 empty plasmid or the corresponding plasmid to express HDAC1-flag. ACTIN was used as loading control. (F) Chromatin-bound cell extracts from PLC/PRF/5 cells were immunoprecipitated with anti-SLU7 and anti-DNMT1 antibodies or pre-immune IgG and blotted with DNMT1, SLU7 and HDAC1 antibodies. (G) Extracts from PLC/PRF/5 cells 36 h after siGL and siSLU7 transfection were subjected to DNMT1 immunoprecipitation and tested by Western blot with antibodies against DNMT1, SLU7 and HDAC1. Immunoprecipitation with pre-immune IgG and inputs were used as controls.

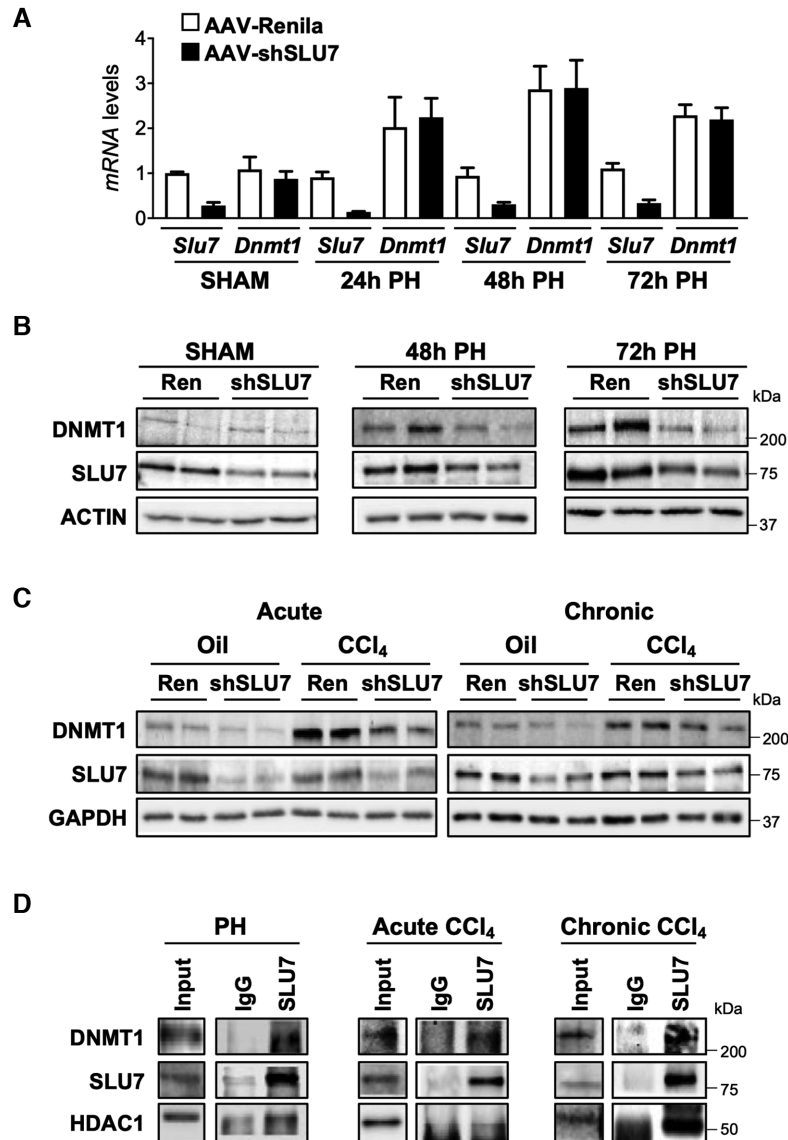


Figure 7. SLU7 is required to ensure DNMT1 stability *in vivo*. (A) *Slu7* and *Dnmt1* mRNA levels in the liver of mice 24, 48 and 72 h after 2/3 partial hepatectomy (PH) or control surgery (SHAM) 21 days after injection of adenoassociated virus to inhibit liver SLU7 expression (AAV-shSLU7) or control virus (AAV-Ren) (n = 5 mice per group). *RPLP0* expression was used as housekeeping gene. (B) Western blot detection of DNMT1 and SLU7 protein levels in the liver of AAV-shSLU7 and AAV-Ren mice Sham operated or 48 and 72 h after 2/3 partial hepatectomy (PH). ACTIN expression was shown as loading control. (C) Western blot detection of DNMT1 and SLU7 protein levels in the liver of AAV-shSLU7 and AAV-Ren mice after CCl₄ induction of acute or chronic liver damage. GAPDH expression was shown as loading control. (D) SLU7 immunoprecipitation *in vivo* after 2/3 partial hepatectomy (PH) and CCl₄-mediated induction of acute or chronic liver damage. Protein lysates were immunoblotted with anti-SLU7, anti-DNMT1 and anti-HDAC1 antibodies. Immunoprecipitation with pre-immune IgG and inputs were shown as control.

(17). Moreover, our results show that SLU7 is essential for the survival of cancer cells (17,19). Mechanistically we have characterized that to perform these functions, SLU7 regulates not only the alternative splicing of multiple genes, but also gene transcription, being part of P-CREB/CBP transcriptional complexes activated by cAMP (16). Our present work provides solid evidence that SLU7 is also part of the epigenetic chromatinome playing a pivotal role in the regulation of DNMT1 stability and the maintenance of DNA methylation. Therefore, altogether our findings identify SLU7 as a pleiotropic factor, and demonstrate that SLU7 may constitute an integrative hub of different levels

of gene expression regulation, including epigenetic DNA remodeling, modulation of promoter activity and mRNA splicing.

The enzyme DNMT1 is required for maintaining DNA methylation after DNA replication (5,6). However, despite this doubtless dominant role in DNA methylation maintenance, independent studies using different methodologies to deplete DNMT1 have yielded discrepant results on how its effects on global DNA methylation status are exerted. Whereas DNMT1 knockout cells generated by genetic deletion of several exons in the N-terminal regulatory domain (56) or in the C-terminal catalytic domain (12) can sus-

tain most of DNA methylation, DNMT1 depletion using antisense or siRNAs results in significant loss of global DNA methylation (61). Apparently, there is an extremely low threshold level of DNMT1 protein below which loss of DNA methylation occurs, but above which no major changes are detected (47,62). In our experiments, we found that SLU7 knockdown results in a significant reduction of total cellular 5-mC content, and the number and distribution of demethylated CpGs mimic to some extent those obtained upon DNMT1 depletion. The relatively limited overlap at individual CpG and gene levels could be explained by different reasons: (i) the time at which DNA methylation was analyzed. DNA demethylation is a passive process that requires cell division and RRBS analyses were carried out 72 h after siRNA transfection given that at later times cell viability is compromised (19); (ii) the coexistence of a mixture of cells with different methylation content including, normal and SLU7/DNMT1 silenced cells, and cells at any phase of the cell cycle. In fact, demethylation heterogeneity was also observed between different clones upon stable DNMT1 silencing (63,64); (iii) the restrictive criterion for methylation differences with respect to the control siGL used, as we only considered beta-value differences greater than 0.6. Nevertheless, we found that both DNMT1 and SLU7 silencing upregulate the expression of (a) specific genes where promoter CGI hypomethylation was directly detected, (b) imprinted genes such as *H19*, and methylated (c) *MAGE* antigens and (d) retroviral genes. The parallelism in the functional consequences of SLU7 and DNMT1 knockdown is reinforced by the fact that in both cases we detected the emergence of hypermethylated CpGs. This surprising hypermethylation was also observed in previous studies in which DNMT1 activity was inhibited (32), the DNMT1/UHRF1 complex was disrupted (65) or even in *Dnmt1* knockout models (33). This intriguing and relevant finding deserves further investigation to be understood. Altogether, these data demonstrate that SLU7 is essential to maintain DNMT1 levels and DNA methylation, and that SLU7 is a splicing factor which controls gene expression through multiple mechanisms including epigenetic DNA modification.

DNMT1, like SLU7, (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2385598#phenotypesTab>), are essential for embryonic survival (66). Moreover, as we have demonstrated for SLU7 (16,17), DNMT1 is also required for maintaining genomic stability and functional maturity of hepatocytes during early postnatal liver growth and regeneration (33). Furthermore, DNMT1 disruption has also been associated with the induction of DNA damage, cell cycle arrest at G2 phase, mitotic defects, genomic instability and apoptosis (12). As mentioned above, all these events also occur upon SLU7 knockdown (16,17,19). Although apparently, SLU7 knockdown induces a faster and stronger phenotype compared to DNMT1 knockdown, we cannot exclude that some effects observed in SLU7 depleted cells may be mediated in part by the loss of DNMT1.

Given the interest in understanding the dynamics of DNA methylation, multiple works have demonstrated that different mechanisms and players participate in the regulation of DNMT1 expression, revealing a complex, tightly regulated and dynamic scenario (13,14). Our present data

uncover a central and non-redundant role for SLU7. We demonstrate that SLU7 depletion results in a rapid and marked decrease of DNMT1 levels, not only in hepatic cells, but in cells of multiple origins. Unexpectedly, SLU7 is not necessary neither for *DNMT1* transcription nor for the correct *DNMT1* mRNA processing. Instead, SLU7 is essential to maintain DNMT1 protein stability. Interestingly, our results demonstrate that SLU7 is a new partner in the chromatin of the protein complex formed by DNMT1/UHRF1/G9a associated with the chromatin to secure DNA methylation (44–46) and that SLU7 is required to maintain the integrity of this protein complex. Moreover, we found that SLU7 is necessary to preserve the total levels of the different protein members of this complex, supporting its role in the maintenance of DNA methylation, as it has been demonstrated that disruption of the complex (67) results in a global DNA hypomethylation. This distinguishes SLU7 from the other members of the complex, as for instance depletion of G9a reduces DNA methylation activity, but it has no effect on DNMT1 protein location or levels (44). Moreover, knockdown of UHRF1 severely reduces the association of DNMT1 to chromatin (45) and DNA methylation (45) but it does not affect DNMT1 global levels. Altogether, our results demonstrate a unique position of SLU7 in maintaining DNMT1 stability, which apparently does not depend solely on the integrity of the complex. Although as discuss below, we have unraveled novel molecular mechanisms to explain how SLU7 is regulating DNMT1 stability, further studies are needed to understand whether mechanisms different from the integrity of the complex itself, such as unexplored splicing or post-translational alterations, are implicated in the stability of the other members of the complex. In any case, the role of SLU7 in maintaining not only DNMT1 stability, but the integrity of the DNA methylation complex, together with a possible role on other DNA methylation factors, such as DNMT3, would explain the huge impact of SLU7 depletion on DNA methylation.

Several post-translational modifications govern the steady-state levels of DNMT1 protein (68). Indeed, the increase of DNMT1 in cancers is largely due to alterations in DNMT1 protein turnover rather than to higher mRNA abundance (69,70). It has been shown that DNMT1 protein stability is regulated by dynamic phosphorylation (50), methylation (50,53,71) and acetylation (52,54,55). For instance, DNMT1 acetylation prevents its binding to USP7, promoting its degradation (51). In fact, we found that SLU7 knockdown promotes DNMT1 acetylation, preventing USP7 binding and inducing DNMT1 proteasomal degradation. We further demonstrated that SLU7 interacts with DNMT1 and allows its binding to the deacetylase HDAC1, securing DNMT1 deacetylation and stabilization (57). Therefore, we uncovered an unknown role of SLU7 in the regulation of post translational modifications of proteins such as DNMT1, more specifically as a regulator of the acetylation pathway. In this sense, it has been recently shown that the splicing factor SF2/ASF (SRSF1) directly interacts with the E2 conjugating enzyme Ubc9 promoting the sumoylation of specific substrates (72). These results further illustrate the pleiotropic functions of some proteins such as SLU7 and their relevance in the establishment of crosstalks between different cellular functions.

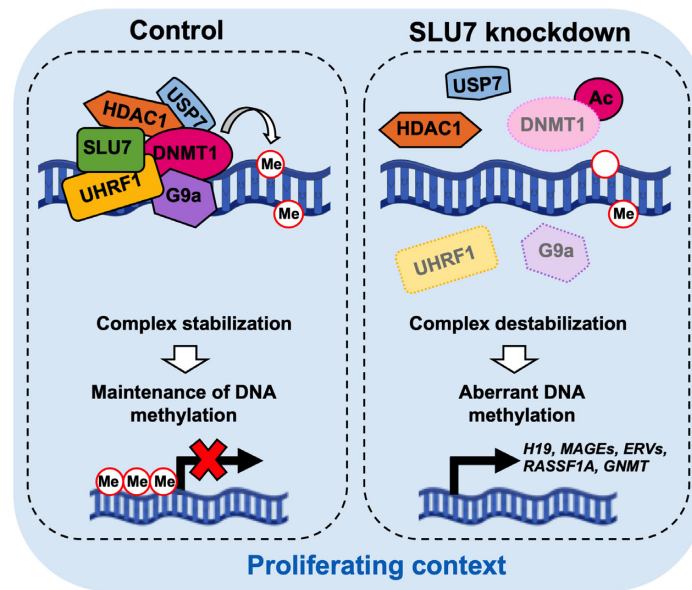


Figure 8. Schematic representation of the mechanisms regulated by SLU7 involved in DNA methylation maintenance. See text for details.

In non-dividing cells DNMT1 shows constitutive low levels of expression (42,43). In contrast, DNMT1 abundance is enhanced in cell proliferating scenarios when the CpGs of the newly synthesized DNA strands need to be methylated (42,43). Our data confirm this switch in DNMT1 abundance and identify SLU7 as essential to stabilize DNMT1 protein levels induced in proliferating cells in a cell cycle phase- and cell type-independent manner. In this regard, we consistently found that SLU7 stabilizes DNMT1 protein in a wide panel of human cancer cell lines of different origins and in the non-transformed HEK293T cell line. However, no significant changes were observed in DNMT1 levels upon SLU7 knockdown when both transformed and non-transformed cells were arrested by high confluency without serum at G0. Importantly, we demonstrate that this DNMT1 dependency on SLU7 also operates *in vivo*, using a mouse model of liver proliferation induced to recover liver mass after partial hepatectomy or hepatocyte acute and chronic damage. We found that *in vivo*, SLU7 also interacts with DNMT1 and HDAC1, and the downregulation of SLU7 using a specific shRNA expressed from an adenovirus (AAV-shSLU7) prevents the induction of DNMT1 protein, without affecting the induction of its mRNA, after PH and liver damage.

All in all, in this study, we demonstrate for the first time that SLU7 is required to maintain DNA methylation. As summarized in Figure 8, we show that SLU7 is part in the chromatin of the protein complex implicated in DNA methylation. Moreover, we discover that SLU7 is essential to secure DNMT1 stability, facilitating its interaction with HDAC1, and thus preventing its acetylation. Importantly, and in contrast with other works, our data are based on interactions and mechanisms addressed by endogenous proteins. Furthermore, we also provide evidence that these mechanisms operate *in vivo*. Overall, our results uncover new and unexpected functions of the splicing factor SLU7

and demonstrate that it plays a holistic function in the regulation of gene expression.

DATA AVAILABILITY

Other additional methods and data will be available upon request.

SUPPLEMENTARY DATA

[Supplementary Data](#) are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Rob M. Ewing (Southampton, UK) and Dr Donald E. Ayer (University of Utah, EEUU) for kindly providing the HCT116 *DNMT1*^{-/-} cell line and the pcDNA3.1-HDAC1-Flag plasmid respectively. We thank all members of the Hepatology Program at CIMA and Dr A. Gutierrez-Uzquiza from Complutense University of Madrid for helpful discussions and comments.

FUNDING

MINECO [PID2019-104265RB-I00/AEI/10.13039/501100011033, PID2019-104878RB-I00/AEI/10.13039/501100011033, SAF2016-75972-R]; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) co-financed by 'Fondo Europeo de Desarrollo Regional' (FEDER) 'Una manera de hacer Europa [PI19/00163]; Gobierno de Navarra [55/2018, PC082-083-084 EHGNA]; Euroregion [2020/101]; CIBERehd; HEP-ACARE Project from Fundación La Caixa; AECC post-doctoral fellowship [POSTD18014AREC to M.A.]; Ministerio de Educación FPI fellowship [BES-2017-079883 to M.R.]; Ministerio de Educación FPU fellowship

[FPU18/01461 to M.G.R.]; Ramón y Cajal Program contract [RYC2018-024475-1 to M.G.F.B.]; Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Fundación Mario Losantos, Fundación M Torres and the generous support of Mr. Eduardo Avila. Funding for open access charge: MINECO [PID2019-104265RB-I00/AEI/10.13039/501100011033].
Conflict of interest statement. None declared.

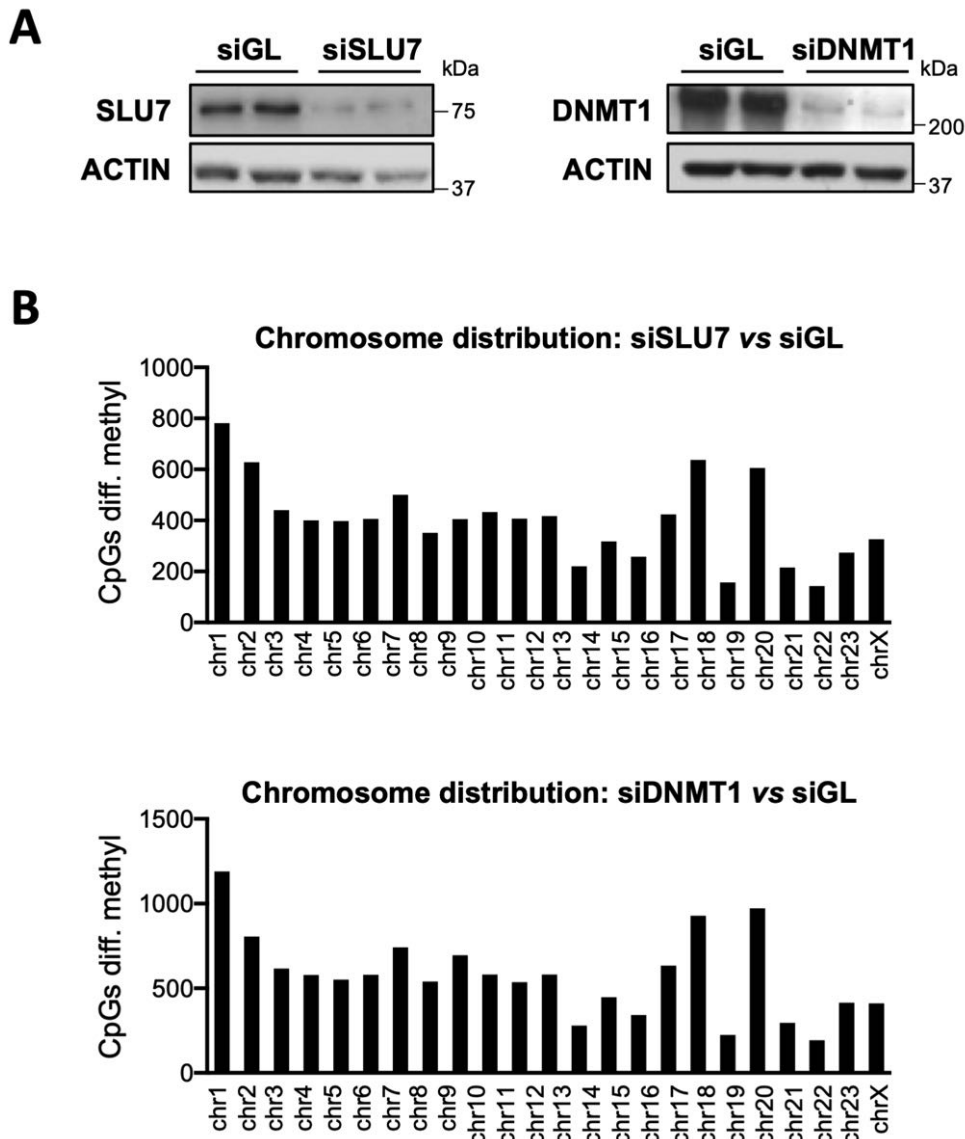
REFERENCES

- Baylin, S.B., Esteller, M., Rountree, M.R., Bachman, K.E., Schuebel, K. and Herman, J.G. (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 687–692.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
- Hermann, A., Gowher, H. and Jeltsch, A. (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 2571–2587.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gene Dev.*, **16**, 6–21.
- Hervouet, E., Nadaradjane, A., Gueguen, M., Vallette, F.M. and Cartron, P.-F. (2012) Kinetics of DNA methylation inheritance by the Dnmt1-including complexes during the cell cycle. *Cell Div.*, **7**, 5.
- Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S. and Patel, D.J. (2012) Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science*, **335**, 709–712.
- Chen, R.Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. and Jaenisch, R. (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, **395**, 89–93.
- Papamichos-Chronakis, M. and Peterson, C.L. (2013) Chromatin and the genome integrity network. *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 62–75.
- Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, **300**, 489–492.
- Baylin, S.B. and Ohm, J.E. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 107–116.
- Fernández-Barrera, M.G., Arechederra, M., Colyn, L., Berasain, C. and Avila, M.A. (2020) Epigenetics in hepatocellular carcinoma development and therapy: The tip of the iceberg. *Jhep Reports*, **2**, 100167.
- Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsumimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y. and Li, E. (2007) Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat. Genet.*, **39**, 391–396.
- Kar, S., Deb, M., Sengupta, D., Shilpi, A., Parbin, S., Torrisani, J., Pradhan, S. and Patra, S. (2012) An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function. *Epigenetics*, **7**, 994–1007.
- Lin, R.-K. and Wang, Y.-C. (2014) Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer. *Cell Biosci.*, **4**, 46.
- Jeltsch, A. and Jurkowska, R.Z. (2016) Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases – a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 8556–8575.
- 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.
- Jiménez, M., Urtasun, R., Elizalde, M., Azkona, M., Latasa, U.M., Uriarte, I., Arechederra, M., Alignani, D., Bárcena-Varela, M., Álvarez-Sola, G. et al. (2019) Splicing events in the control of genome integrity: role of SLU7 and truncated SRSF3 proteins. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3450–3466.
- 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.
- Urtasun, R., Elizalde, M., Azkona, M., Latasa, M.U., García-Irigoyen, O., Uriarte, I., Fernández-Barrera, 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.
- Maor, G., Yearim, A. and Ast, G. (2015) The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.*, **31**, 274–280.
- Zhang, J., Zhang, Y.-Z., Jiang, J. and Duan, C.-G. (2020) The crosstalk between epigenetic mechanisms and alternative RNA processing regulation. *Front. Genet.*, **11**, 998.
- Bowler, E.H., Smith-Vidal, A., Lester, A., Bell, J., Wang, Z., Bell, C.G., Wang, Y., Divecha, N., Skipp, P.J. and Ewing, R.M. (2019) Deep proteomic analysis of Dnmt1 mutant/hypomorphic colorectal cancer cells reveals dysregulation of epithelial–mesenchymal transition and subcellular re-localization of Beta-Catenin. *Epigenetics*, **15**, 107–121.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G.W., Ramsahoye, B., Lander, E.S. and Jaenisch, R. (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5868–5877.
- Stockwell, P.A., Chatterjee, A., Rodger, E.J. and Morison, I.M. (2014) DMAP: differential methylation analysis package for RRBS and WGBS data. *Bioinform. Oxf. Engl.*, **30**, 1814–1822.
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H. and Glass, C.K. (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell*, **38**, 576–589.
- 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.
- Bárcena-Varela, M., Caruso, S., Llerena, S., Álvarez-Sola, G., Uriarte, I., Latasa, U.M., Urtasun, R., Rebouissou, S., Alvarez, L., Jimenez, M. et al. (2019) Dual targeting of histone methyltransferase G9a and DNA-methyltransferase 1 for the treatment of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **69**, 587–603.
- Berasain, C., García-Trevijano, E.R., Castillo, J., Erroba, E., Santamaría, M., Lee, D.C., Lee, D.C., Prieto, J. and Avila, M.A. (2005) Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J. Biol. Chem.*, **280**, 19012–19020.
- Perugorria, M.J., Latasa, M.U., Nicou, A., Cartagena-Lirola, H., Castillo, J., Goñi, S., Vespasiani-Gentilucci, U., Zagami, M.G., Lotersztajn, S., Prieto, J. et al. (2008) The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology*, **48**, 1251–1261.
- Estève, P.-O., Zhang, G., Ponnaluri, C.V., Deepti, K., Chin, H., Dai, N., Sagum, C., Black, K., Corrêa, I.R. Jr, Bedford, M.T. et al. (2015) Binding of 14-3-3 reader proteins to phosphorylated DNMT1 facilitates aberrant DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1642–1656.
- Kaji, K., Factor, V.M., Andersen, J.B., Durkin, M.E., Tomokuni, A., Marquardt, J.U., Matter, M.S., Hoang, T., Conner, E.A. and Thorgeirsson, S.S. (2016) DNMT1 is a required genomic regulator for murine liver histogenesis and regeneration. *Hepatology*, **64**, 582–598.
- Baylin, S.B. and Jones, P.A. (2011) A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 726–734.
- Hesson, L.B., Cooper, W.N. and Latif, F. (2007) The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis. Markers*, **23**, 73–87.
- Huidobro, C., Toraño, E.G., Fernández, A.F., Urdinguio, R.G., Rodríguez, R.M., Ferrero, C., Martínez-Cambor, P., Boix, L., Bruix, J., García-Rodríguez, J.L. et al. (2013) A DNA methylation signature associated with the epigenetic repression of glycine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinoma. *J. Mol. Med.*, **91**, 939–950.
- Botezatu, A., Bleotu, C., Nastase, A., Anton, G., Bacalbasa, N., Duda, D., Dima, S.O. and Popescu, I. (2015) Epigenetic silencing of

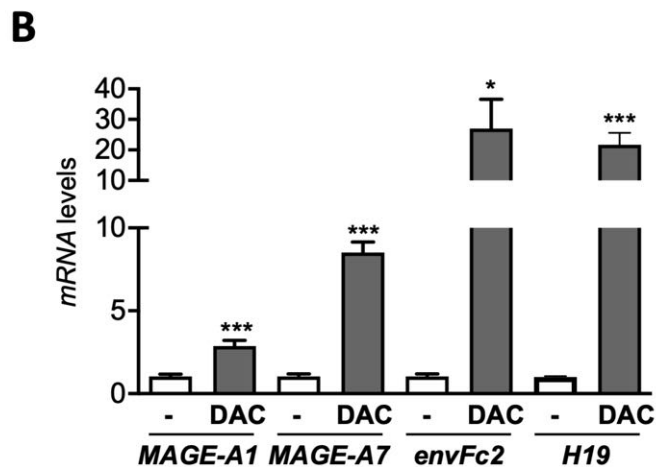
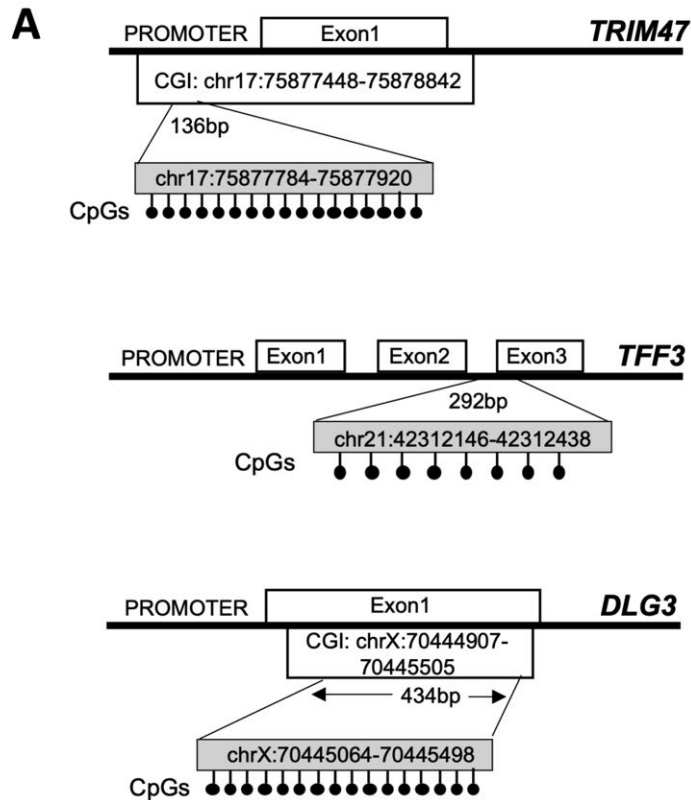
- GNMT gene in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genom. Proteom*, **12**, 21–30.
38. Jones, P.A., Ohtani, H., Chakravarthy, A. and Carvalho, D.D. (2019) Epigenetic therapy in immune-oncology. *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 151–161.
 39. Chiappinelli, K.B., Strissel, P.L., Desrichard, A., Li, H., Henke, C., Akman, B., Hein, A., Rote, N.S., Cope, L.M., Snyder, A. *et al.* (2015) Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell*, **162**, 974–986.
 40. Smet, C.D. and Loriot, O. (2013) DNA hypomethylation and activation of germline-specific genes in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **754**, 149–166.
 41. Chua, K. and Reed, R. (1999) Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Gene Dev*, **13**, 841–850.
 42. Kheir, T. and Lund, A.H. (2010) Epigenetic dynamics across the cell cycle. *Essays Biochem.*, **48**, 107–120.
 43. Kinney, S.R.M. and Pradhan, S. (2011) Progress in molecular biology and translational science. *Prog. Mol. Biol. Transl.*, **101**, 311–333.
 44. Esteve, P.-O., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F. and Pradhan, S. (2006) Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Gene Dev.*, **20**, 3089–3103.
 45. Bostick, M., Kim, J., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S. and Jacobsen, S.E. (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, **317**, 1760–1764.
 46. Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., Rösing, N., Meilinger, D., Rothbauer, U., Cardoso, M.C. and Leonhardt, H. (2007) Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4301–4312.
 47. Cai, Y., Tsai, H.-C., Yen, R.-W.C., Zhang, Y.W., Kong, X., Wang, W., Xia, L. and Baylin, S.B. (2017) Critical threshold levels of DNA methyltransferase 1 are required to maintain DNA methylation across the genome in human cancer cells. *Genome Res.*, **27**, 533–544.
 48. Denis, H., Ndlovu, M.N. and Fuks, F. (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.*, **12**, 647–656.
 49. Qin, W., Leonhardt, H. and Pichler, G. (2011) Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. *Nucleus*, **2**, 392–402.
 50. Estève, P.-O., Chang, Y., Samaranyake, M., Upadhyay, A.K., Horton, J.R., Feehery, G.R., Cheng, X. and Pradhan, S. (2010) A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 42–48.
 51. Du, Z., Song, J., Wang, Y., Zhao, Y., Guda, K., Yang, S., Kao, H.Y., Xu, Y., Willis, J., Markowitz, S.D. *et al.* (2010) DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci. Signal*, **3**, ra80.
 52. Peng, L., Yuan, Z., Ling, H., Fukasawa, K., Robertson, K., Olshaw, N., Koomen, J., Chen, J., Lane, W.S. and Seto, E. (2011) SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4720–4734.
 53. Esteve, P.-O., Chin, H.G., Benner, J., Feehery, G.R., Samaranyake, M., Horwitz, G.A., Jacobsen, S.E. and Pradhan, S. (2009) Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc National Acad Sci*, **106**, 5076–5081.
 54. Cheng, J., Yang, H., Fang, J., Ma, L., Gong, R., Wang, P., Li, Z. and Xu, Y. (2015) Molecular mechanism for USP7-mediated DNMT1 stabilization by acetylation. *Nat. Commun.*, **6**, 7023.
 55. Hong, Q. and Shao, Z. (2011) Ubiquitination/deubiquitination and acetylation/deacetylation: making DNMT1 stability more coordinated. *Acta Pharmacol. Sin.*, **32**, 139–140.
 56. Rhee, I., Jair, K.-W., Yen, R.-W., Lengauer, C., Herman, J.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Baylin, S.B. and Schuebel, K.E. (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*, **404**, 1003–1007.
 57. Zhou, Q., Agoston, A.T., Atadja, P., Nelson, W.G. and Davidson, N.E. (2008) Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **6**, 873–883.
 58. Wang, S., Zhang, C., Hasson, D., Desai, A., SenBanerjee, S., Magnani, E., Ukomadu, C., Lujambio, A., Bernstein, E. and Sadler, K.C. (2019) Epigenetic compensation promotes liver regeneration. *Dev. Cell*, **50**, 43–56.
 59. Braunschweig, U., Guerousov, S., Plocik, A.M., Graveley, B.R. and Blencowe, B.J. (2013) Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell*, **152**, 1252–1269.
 60. André, K.M., Sipo, E.H. and Soutourina, J. (2020) Mediator roles going beyond transcription. *Trends Genet.*, **37**, 224–234.
 61. Robert, M.-F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I.C., Barsalou, A. and MacLeod, A.R. (2002) DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.*, **33**, 61–65.
 62. Patel, K., Dickson, J., Din, S., Macleod, K., Jodrell, D. and Ramsahoye, B. (2010) Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4313–4324.
 63. Minoguchi, S. and Iba, H. (2008) Instability of retroviral DNA methylation in embryonic stem cells. *Stem Cells*, **26**, 1166–1173.
 64. Bai, J., Zhang, X., Hu, K., Liu, B., Wang, H., Li, A., Lin, F., Zhang, L., Sun, X., Du, Z. *et al.* (2015) Silencing DNA methyltransferase 1 (DNMT1) inhibits proliferation, metastasis and invasion in ESCC by suppressing methylation of RASSF1A and DAPK. *Oncotarget*, **7**, 44129–44141.
 65. Chin, H.G., Ponnaluri, V.K.C., Zhang, G., Estève, P.-O., Schaus, S.E., Hansen, U. and Pradhan, S. (2014) Transcription factor LSF-DNMT1 complex dissociation by FQI1 leads to aberrant DNA methylation and gene expression. *Oncotarget*, **5**, 83627–83640.
 66. Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915–926.
 67. Pacaud, R., Brocard, E., Lalier, L., Hervouet, E., Vallette, F.M. and Carttron, P.-F. (2014) The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Sci Rep-uk*, **4**, 4230.
 68. Scott, A., Song, J., Ewing, R. and Wang, Z. (2014) Regulation of protein stability of DNA methyltransferase 1 by post-translational modifications. *Acta Bioch Bioph Sin*, **46**, 199–203.
 69. Agoston, A.T., Argani, P., Yegnasubramanian, S., Marzo, A.M., Ansari-Lari, M., Hicks, J.L., Davidson, N.E. and Nelson, W.G. (2005) Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer. *J. Biol. Chem.*, **280**, 18302–18310.
 70. Marzo, D.A., Marchi, V., Yang, E., Veeraswamy, R., Lin, X. and Nelson, W. (1999) Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.*, **59**, 3855–3860.
 71. Zhang, H., Gao, Q., Tan, S., You, J., Lyu, C., Zhang, Y., Han, M., Chen, Z., Li, J., Wang, H. *et al.* (2019) SET8 prevents excessive DNA methylation by methylation-mediated degradation of UHRF1 and DNMT1. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 9053–9068.
 72. Pelisch, F., Gerez, J., Druker, J., Schor, I.E., Muñoz, M.J., Riso, G., Petrillo, E., Westman, B.J., Lamond, A.I., Arzt, E. *et al.* (2010) The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 16119–16124.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS

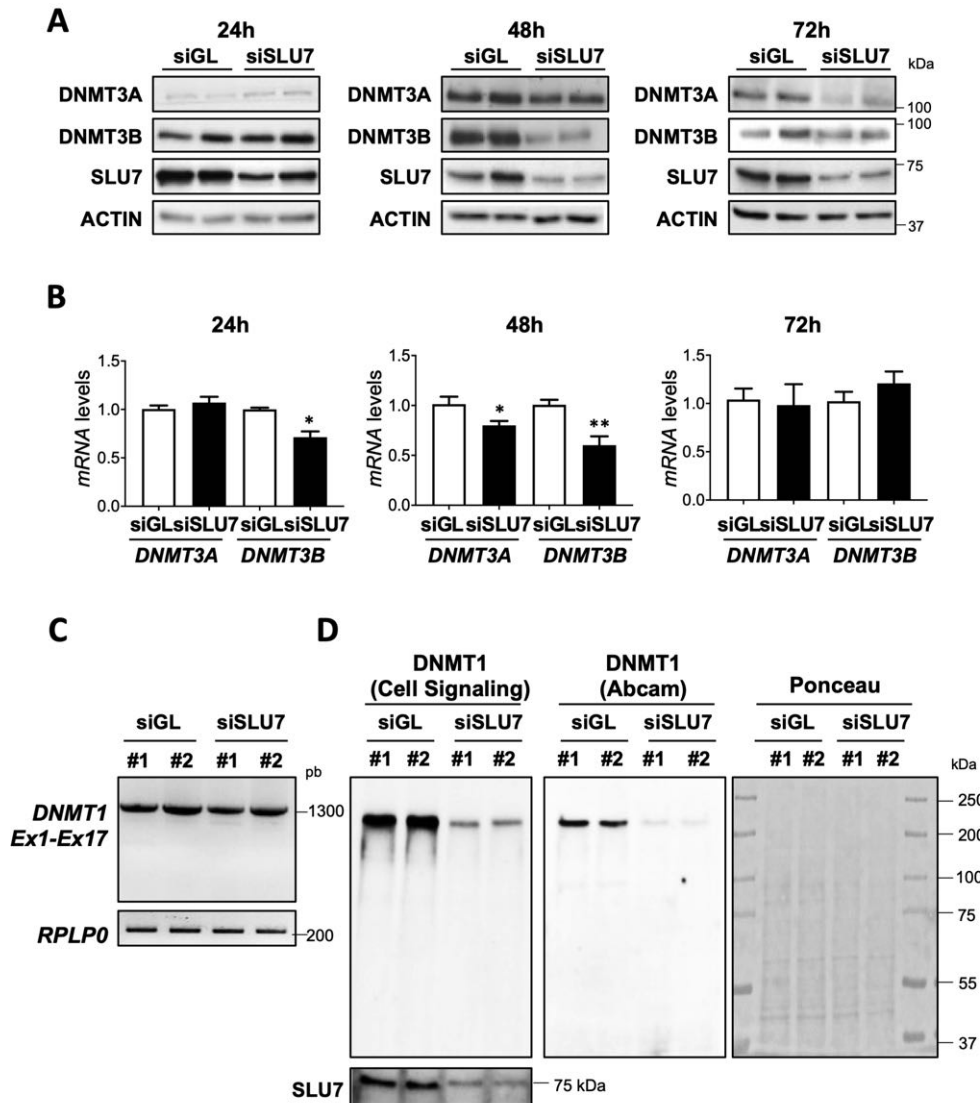
Recalde et al. "The splicing regulator SLU7 is required to preserve DNMT1 protein stability and DNA methylation".



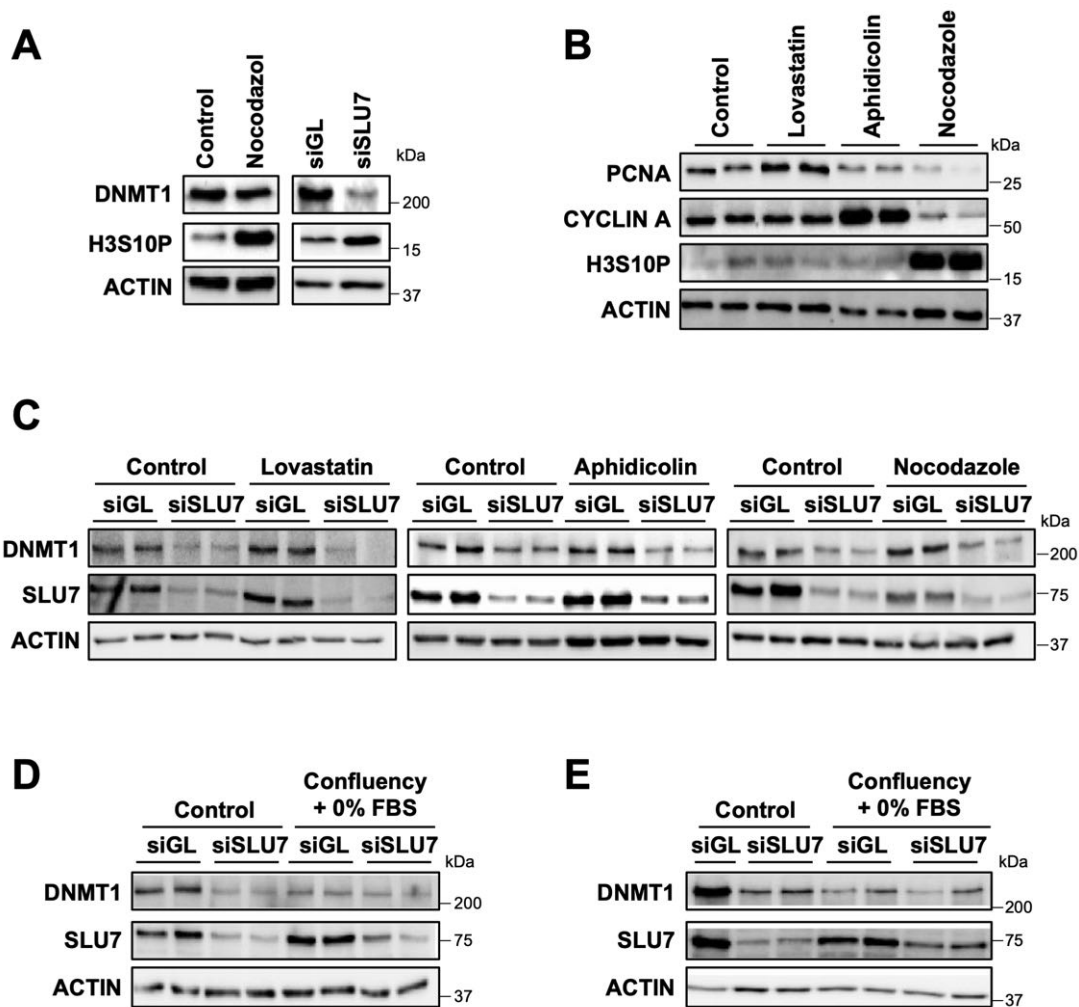
Supplementary Figure 1: (A) Western blot analysis confirms SLU7 and DNMT1 knockdown of PLC/PRF/5 cells 72 h after transfection in the samples used for the Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) analysis. ACTIN was used as loading control. **(B)** Chromosomic distribution of the 9143 and 13128 differentially methylated CpGs (methylation difference > 0,6) in siSLU7 (top panel) and siDNMT1 (bottom panel) transfected PLC/PRF/5 cells compared to control siGL cells.



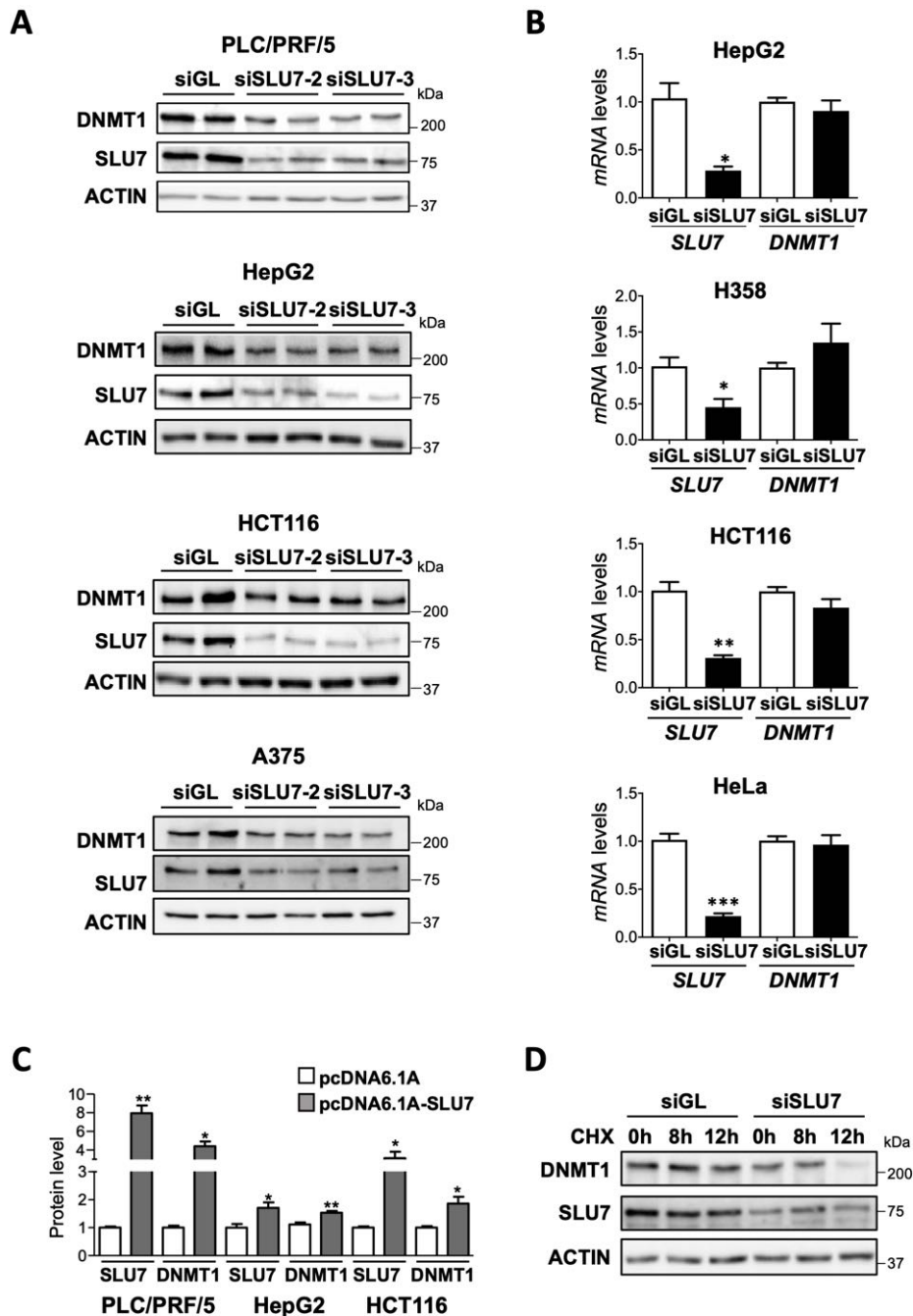
Supplementary Figure 2: (A) Extended representation of *TRIM47*, *TFF3* and *DLG3* gene regions analyzed in Figure 2A. The concrete genomic location analyzed is within the grey square, CpG islands (CGIs) are highlighted in green. **(B)** *MAGE-A1*, *MAGE-A7*, *envFc2* and *H19* expression by RT-qPCR in PLC/PRF/5 cells after 7 days of culture with and without 5-*aza*-2'-deoxycytidine (DAC) (10 μ M). *RPLP0* expression was used as housekeeping gene. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. All experiments were performed at least three times with biological duplicates per condition.



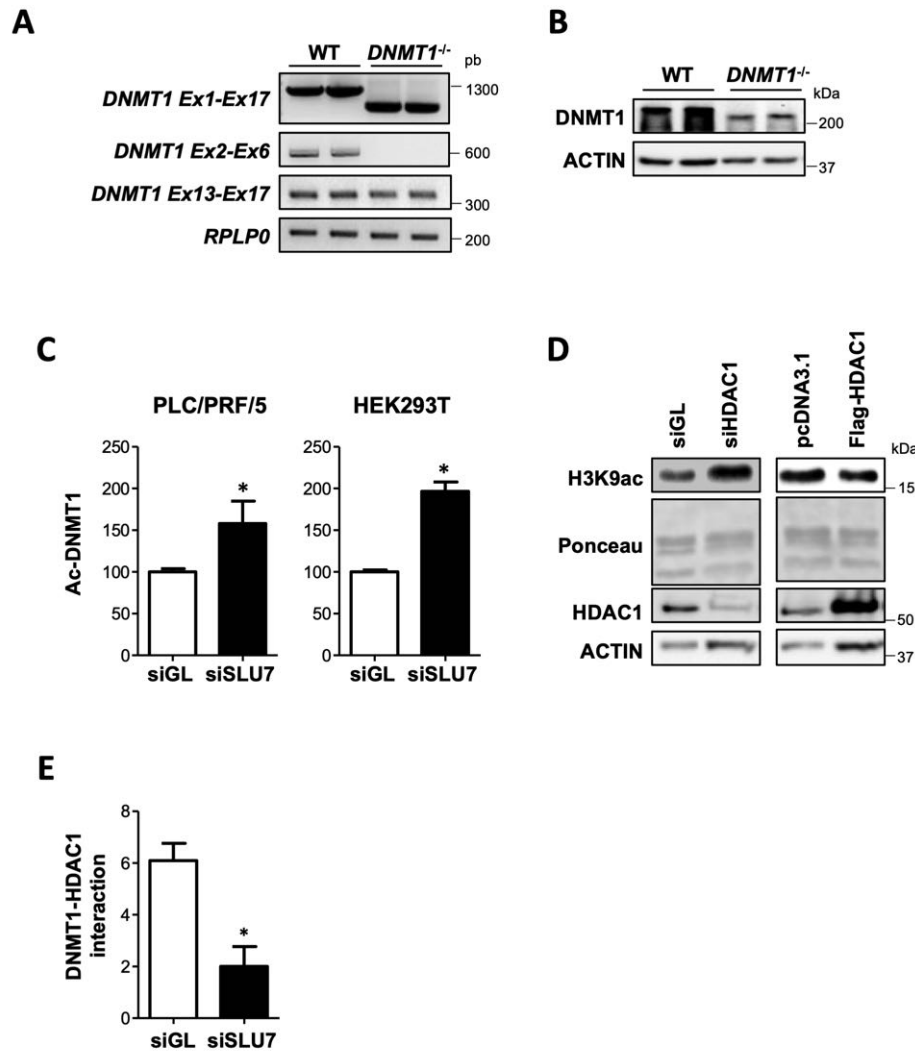
Supplementary Figure 3: (A) Representative Western blots of DNMT3A, DNMT3B and SLU7 in PLC/PRF/5 cells 24 h, 48 h and 72 h after transfection with siSLU7, in the samples analyzed in Figure 3A. ACTIN expression is shown as loading control. (B) Histograms reporting *DNMT3A* and *DNMT3B* mRNA levels by real time PCR in PLC/PRF/5 cells 24 h, 48 h and 72 h after transfection with siSLU7. *RPLP0* expression was used as housekeeping gene. Quantitation of at least three independent experiments with biological duplicates per condition. *P < 0.05, **P < 0.01. (C) Analysis of *DNMT1* mRNA expression patterns in control siGL and siSLU7 was verified by RT-PCR and subsequent electrophoresis, using *DNMT1* primers located in exon 1 and 17. As a control, the amplification of *RPLP0* was performed. (D) Detection of DNMT1 with two different antibodies that recognize different DNMT1 epitopes (from Cell Signaling and Abcam) was performed on whole Western blot membranes with PLC/PRF/5 cell extracts 48h after transfection with siSLU7 and control siGL. SLU7 expression is shown as knockdown control and Ponceau S staining as loading control.



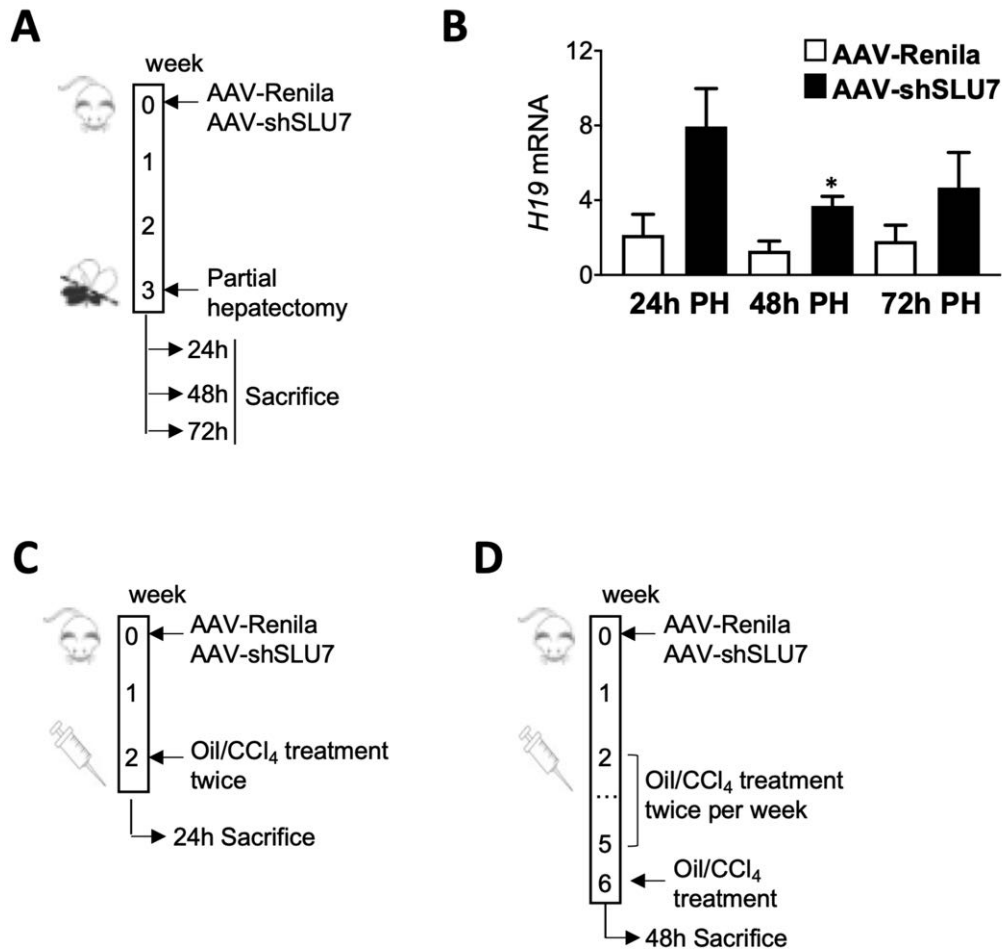
Supplementary Figure 4: (A) DNMT1 protein levels were analyzed by Western blot in PLC/PRF/5 cells with and without overnight 330 nM nocodazole treatment or 48 h after transfection with control siGL or siSLU7. Serine 10-phosphorylated histone H3 (H3S10P) was used as control of G2/M arrest. ACTIN was used as loading control. (B) Western blot of PLC/PRF/5 cells 60 h without or after treatment with lovastatin (20 μ M), aphidicolin (2 μ g/ml) or nocodazole (330 nM). PCNA, CYCLIN A, H3S10P and ACTIN were used as markers of cell cycle arrest and loading control. (C) Western blot of DNMT1 in PLC/PRF/5 cells treated for 60 h with lovastatin (20 μ M), aphidicolin (2 μ g/ml) or nocodazole (330 nM) as described in B, and transfected with control siGL or siSLU7 for the last 48 h. (D, E) Western blot of DNMT1 in PLC/PRF/5 (D) and HEK293T (E) cells in normal conditions (control), or after being maintain at high confluence for 6 days, without FBS during the last 60 h and transfected with control siGL or siSLU7 for the last 48 h. ACTIN expression is shown as loading control.



Supplementary Figure 5: (A) Western blots of DNMT1 and SLU7 in PLC/PRF/5, HepG2, HCT116 and A375 cells 48h after transfection with two different siRNAs specific for SLU7. ACTIN expression is shown as loading control. **(B)** *SLU7* and *DNMT1* mRNA expression levels by real time PCR in HepG2, H358, HCT116 and HeLa cancer cell lines 48 h after transfection with siSLU7. *RPLPO* expression was used as housekeeping gene. At least three independent experiments with biological duplicates per condition were performed. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. **(C)** DNMT1 and SLU7 protein levels were quantified using Image J software in four independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **(D)** DNMT1 protein levels were analyzed by Western blot in PLC/PRF/5 cells 36 h after transfection with control siGL or siSLU7 with and without cycloheximide (10 $\mu\text{g/ml}$) for 8 h or 12 h. The expression of ACTIN was analyzed as loading control.



Supplementary Figure 6: (A) The correct transcription of DNMT1 in HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells was validated by PCR using primers located in exon 1 and 17. Note that DNMT1 mRNA is smaller in HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells due to the deletion of exons 2-5. The alternative splicing of *DNMT1* exon 2 in *DNMT1*^{-/-} HCT116 cells was also validated by PCR using primers located in exon 2 and 6. *DNMT1* transcription in both cell lines was verified by RT-PCR using primers located in exon 13 and 17. *RPLP0* expression was assessed as control. **(B)** DNMT1 was detected with a C-terminal-targeted antibody in HCT116 WT and HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells. Note that in HCT116 *DNMT1*^{-/-} cells a faster migrating protein is detected when compared with WT cells (full-length DNMT1). ACTIN expression is shown as loading control. **(C)** DNMT1 acetylation levels were quantified using Image J software from four independent experiments in PLC/PRF/5 and HEK293T cells. *P < 0.05. **(D)** Western blot of H3K9ac, to measure HDAC1 activity, and HDAC1, to measure its levels, in PLC/PRF/5 cells 48 h after HDAC1 knockdown or overexpression. Ponceau staining of histones and ACTIN are loading controls. **(E)** DNMT1-HDAC1 interaction was quantified using Image J software in three independent experiments. *P < 0.05.



Supplementary Figure 7: (A) Schematic representation of mouse model of 2/3 partial hepatectomy (PH) performed in control mice (AAV-Ren) and SLU7 silenced mice (AAV-shSLU7). **(B)** mRNA expression of the imprinted gene *H19* by RT-qPCR in the liver of AAV-Ren and AAV-shSLU7 mice 24 h, 48 h and 72 h after 2/3 partial hepatectomy (PH). *Rplp0* expression was used as housekeeping gene. **(C-D)** Schematic representation of the in vivo models of acute (C) and chronic (D) liver injury induced upon CCl₄ administration in control mice (AAV-Ren) and SLU7 silenced mice (AAV-shSLU7). The vehicle (oil) was administered as control. Mice were injected with CCl₄ or oil twice a week during 1 week (acute) or during 5 weeks (chronic) before sacrifice and liver harvesting.

