



# Universidad de Navarra

Facultades de Medicina y Ciencias

*Papel de SLU7 en la diferenciación hepática y  
en la protección del hígado frente al daño:  
regulación de HNF4 $\alpha$*

*MARÍA GÁRATE RASCÓN*





# Universidad de Navarra

Facultades de Medicina y Ciencias

*Papel de SLU7 en la diferenciación hepática y en la protección del hígado frente al  
daño: regulación de HNF4 $\alpha$*

Memoria presentada por D<sup>a</sup> MARÍA GÁRATE RASCÓN 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, 25 de octubre de 2022

Dra. Carmen Berasain Lasarte  
(Catedrática Bioquímica)

Dra. María Arechederra Calderón



*A mis padres*

*A Carlos*

*A mi amama, fallecida por cáncer de hígado*



*Una vez descartado lo imposible, lo que queda,  
por improbable que parezca, debe ser la verdad.*

Arthur Conan Doyle  
*El signo de los cuatro (1890)*





# AGRADECIMIENTOS

Como recoge el filósofo danés Søren Kierkegaard: “La vida debe ser comprendida hacia atrás, pero debe ser vivida hacia delante”. Así, a lo largo de la vida vamos pasando etapas y cada vez que cerramos una toca echar la vista atrás y hacer balance de todo lo vivido, de todo lo aprendido y de la influencia que las personas han ejercido en nosotros. Después de cuatro años de Tesis Doctoral cierro esta etapa llena de enriquecimiento profesional y personal, y me gustaría agradecer a todas las personas que, de una manera o de otra, han formado parte de ella.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad de Navarra y al Cima Universidad de Navarra por haberme dado la posibilidad de cursar mis estudios de Doctorado. También al Cima y al Ministerio de Universidades por la concesión de las ayudas predoctorales (Ayuda FIMA y Ayuda para la Formación del Personal Universitario (FPU), respectivamente) para la realización de la Tesis.

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la guía y supervisión de mis directoras de Tesis, la Dra. Carmen Berasain y la Dra. María Arechederra. Muchas gracias a las dos por inculcarme vuestra pasión por la ciencia y vuestro ímpetu en seguir haciendo nuevos descubrimientos. Gracias también por enseñarme la importancia y necesidad de divulgar la ciencia que hacemos en el laboratorio, para que pueda llegar y enriquecer a la población.

Carmen, muchas gracias por toda tu dedicación, confianza y disposición desde que me acogiste en el laboratorio cuando yo había terminado 3 ° de Farmacia. Para mí has sido una referente por tu forma de trabajar exigente y rigurosa, y por tu incansable constancia en querer entender la ciencia, a menudo complicada. Gracias por todos los conocimientos que me has enseñado. Cada reunión contigo es sinónimo de inspiración y nuevos aprendizajes, es una maravilla cómo explicas las cosas. Gracias por inculcarme la importancia de pensar siempre más allá de la ejecución mecánica de los protocolos, y por enseñarme a tener siempre un espíritu crítico con los resultados. Incluso en los momentos de incertidumbre cuando no salían las cosas como esperábamos, siempre has conseguido que me llevara un aprendizaje.

María, muchas gracias por toda tu dedicación, cercanía, consejos y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Admiro mucho tu capacidad para organizar el trabajo y la forma en la que afrontas todos los retos, siempre contagiando la ilusión que sientes por la ciencia y por

querer hacer bien las cosas. Gracias por todos los conocimientos científicos y técnicos que me has enseñado. Me llevo mucho aprendizaje profesional pero también personal, que estoy segura me va a ayudar en etapas futuras. Me siento muy afortunada por haber podido trabajar contigo este tiempo, y es una suerte estar en el equipo que formáis Carmen y tú.

La investigación requiere de trabajo en equipo, por eso quiero agradecer a mis compañeras de grupo del 4.02. María Elizalde y María Azkona, gracias por acogerme tan bien desde el principio, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por toda vuestra ayuda y por todo vuestro apoyo. Miriam, muchas gracias por la compañía y la comprensión que me has brindado siempre. Ha sido una suerte que hayamos vivido en paralelo la experiencia de la tesis. Carla, aunque hayamos coincidido menos tiempo, siempre te has mostrado dispuesta a ayudar. Gracias a todas por crear tan buen ambiente de trabajo.

No me quiero olvidar de Idoia, gracias por la alegría que traes al laboratorio cada vez que vienes, ni de Maddalen y Raquel, muchas gracias por todas vuestras enseñanzas y consejos en mis inicios en el mundo de la Investigación.

Me gustaría agradecer también la colaboración del resto de miembros del Programa de Hepatología.

Al Dr. Matías Ávila, director del Programa. Matías, el primer contacto que tuve con el mundo de la Investigación fue gracias a ti, cuando nos invitaste a conocer de primera mano el trabajo que se hace en un laboratorio de Investigación, allá por 2 ° de carrera. Muchas gracias por toda tu ayuda, tu disposición y tus consejos, tanto a nivel profesional como personal.

A todo el equipo del laboratorio 4.01. Maite, gracias por tu calidez humana y por tener siempre una mano tendida para ayudar en lo necesario. Uxue, gracias por la compañía y por estar siempre pendiente de ayudar con todo. También, muchas gracias a Íker, Álex, José Mari, Roberto, Laura, Borja, Amaia, Leticia, Marina y Gloria por ofrecerme vuestra ayuda siempre que la he necesitado, en cuanto a conocimientos científicos, técnicos o metodológicos. Ha sido un placer coincidir con todos vosotros/as.

Al resto del laboratorio 4.02, Josepmaría, Eva, Sara y Sergio, muchas gracias por el buen ambiente de trabajo que generáis en el laboratorio. Eva, eres una de las personas más generosas y trabajadoras que conozco. Gracias por toda tu disposición, tu ayuda, tus consejos y por compartir con el resto tu pasión por lo que haces. Sara, muchas gracias por tu empatía,

tu ayuda, tus conversaciones y tu apoyo este tiempo. Sergio, gracias por tu alegría, por mostrar siempre buena disposición para todo y por escuchar.

Al equipo del laboratorio 4.03, Antonio, Ana, Dani y Karol, muchas gracias por toda vuestra ayuda siempre que la he necesitado, desde que empecé en el Cima y compartíamos laboratorio.

Una parte fundamental de estos años de Doctorado ha sido mi colaboración en la docencia de las prácticas de Grado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Navarra. Muchas gracias a todo el equipo de profesores/as y doctorandos/as por vuestra confianza en mí, por acogerme tan bien y por todo vuestro apoyo. He disfrutado mucho compartiendo las practicas con todos vosotros/as. Especialmente quiero agradecer a Bea, por la confianza que pusiste en mí desde el principio y porque siempre te has preocupado de que estuviese bien. Y también a Maite, por todos tus consejos y por estar pendiente de todos mis pasos.

Fuera del ámbito profesional, han sido muchas las personas que, con su apoyo, han contribuido a que este trabajo haya salido adelante. Gracias.

A mis amigas, Ana Elisa, Irene, Lucia, Vero, Cristina, Ana R, Gloria, Irene M, Olatz... Gracias a todas por vuestro apoyo, ánimos, escucha, compañía y por estar siempre ahí para los momentos de desconexión, aunque ahora muchas veces tengamos que acompañarnos desde la distancia. Un agradecimiento especial a Edurne, porque eres una de las personas que más me ha entendido y apoyado desde los años que compartimos de colegio y de carrera. Gracias de corazón por escuchar, por ayudar, por alegrarte por mis logros y por apoyarme en las horas bajas.

A mi familia: mi aitona Juan José, mis tíos/as Ignacio, Jeru, Marcelo, Delia B, Jotas, Bea, Montxo, Pili, Delia E y especialmente a Pedro por ayudarme con la portada de esta Tesis, mis primos, y mi familia política Moncho, Eva, Isa y Sergio. A todos/as, gracias por vuestro cariño, vuestros consejos, vuestro apoyo y por preocuparos siempre por mí y por nuestros avances en la ciencia.

A mis padres, Ana y José Mari. Estaré siempre agradecida por todo lo que hacéis por mí. Gracias por todo vuestro amor, cuidado y apoyo, por todo lo que me habéis enseñado y aconsejado, y por estar siempre disponibles para lo que haga falta. Gracias también por darme

la oportunidad de estudiar y formarme. Me siento muy afortunada y orgullosa de formar parte de esta familia.

A Carlos, gracias por estar ahí. Es una suerte haber podido vivir la misma experiencia a la vez. Vamos cerrando etapas juntos y aprendiendo en cada una de ellas. Gracias por entenderme, por escucharme, por apoyarme, por animarme cuando las cosas se han torcido, por alegrarte cuando han salido bien, por cuidarme y por hacer todo más fácil. Gracias por creer y confiar siempre en mí.

# ABREVIATURAS

Descripción de la abreviatura		Descripción en castellano
<b>3-NT</b>	<i>3-Nitrotyrosine</i>	3-Nitrotirosina
<b>AAV</b>	<i>Adeno-associated virus</i>	Virus adenoasociado
<b>AFP</b>	<i><math>\alpha</math>-fetoprotein</i>	$\alpha$ -fetoproteína
<b>ALB</b>	<i>Albumin</i>	Albúmina
<b>ALT</b>	<i>Alanine aminotransferase</i>	Alanina aminotransferasa
<b>AMPK</b>	<i>AMP-activated protein kinase</i>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>APAP</b>	<i>Acetaminophen</i>	Acetaminofén
<b>APAP-Gluc</b>	<i>APAP-glucuronide</i>	APAP-Glucurónico
<b>AREG</b>	<i>Amphiregulin</i>	Anfirregulina
<b>AST</b>	<i>Aspartate aminotransferase</i>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>	Colección americana de cultivos celulares
<b>ATF3</b>	<i>Activating transcription factor 3</i>	Factor de transcripción activador 3
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>	Ácido bicinconínico
<b>BIM</b>	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>	Mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenic protein</i>	Proteína morfogénica de hueso
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>	Albúmina de suero bovino
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic adenosine mono-phosphate</i>	Adenosín monofostato cíclico
<b>CBP</b>	<i>CREB binding protein</i>	Proteína de unión a CREB
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>	DNA complementario
<b>C/EBP<math>\alpha/\beta</math></b>	<i>CCAAT Enhancer Binding Protein <math>\alpha/\beta</math></i>	Proteína de union al potenciador CCAAT $\alpha/\beta$
<b>CHX</b>	<i>Cycloheximide</i>	Cicloheximida
<b>Co-IP</b>	<i>Co-immunoprecipitation</i>	Co-inmunoprecipitación
<b>c-Myc</b>	<i>c-myelocytomatosis oncogene</i>	Oncogén de mielocitomatosis

<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i>	Proteína de unión a elementos de respuesta al cAMP
<b>CRM1</b>	<i>Chromosomal region maintenance 1</i>	Mantenimiento de la región cromosómica 1
<b>c-SRC</b>	<i>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>	Tirosina quinasa c-SRC
<b>CWC22</b>	<i>CWC22 Spliceosome Associated Protein Homolog</i>	Proteína CWC22 asociada al <i>splicing</i>
<b>CYP2E1</b>	<i>Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1</i>	Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia E Miembro 1
<b>CYP450</b>	<i>Cytochrome P450</i>	Citocromo P450
<b>DAB</b>	<i>Diaminobenzidine</i>	Diaminobencidina
<b>DAPI</b>	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DBD</b>	<i>DNA binding domain</i>	Dominio de unión al DNA
<b>DCFDA</b>	<i>2',7'-dichlorofluorescin diacetate</i>	2',7'-diclorofluorescina diacetato
<b>DEN</b>	<i>Diethylnitrosamine</i>	Dietilnitrosamina
<b>DILI</b>	<i>Drug-induced liver injury</i>	Daño hepático inducido por fármacos
<b>DMEM</b>	<i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNasa</b>	<i>Deoxyribonuclease</i>	Desoxirribonucleasa
<b>DNMT1</b>	<i>DNA methyltransferase 1</i>	DNA metiltransferasa 1
<b>dNTPs</b>	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>	Tampón fosfato salino de <i>Dulbecco</i>
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	<i>Ethylene diaminetetraacetic acid</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>ELK-1</b>	<i>ETS-Like Gene 1</i>	Factor de transcripción que reconoce sitios de unión ETS

<b>EMMA</b>	<i>European Mouse Mutant Archive</i>	Archivo Europeo de Ratones Mutantes
<b>ERK1/2 MAPK</b>	<i>ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase</i>	Quinasa ERK1/2 activada por mitógenos
<b>ESRP2</b>	<i>Epithelial splicing regulatory protein 2</i>	Proteína epitelial reguladora del <i>splicing</i> 2
<b>FASN</b>	<i>Fatty acid synthase</i>	Ácidos grasos sintasa
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i>	Suero fetal bovino
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>	Factor de crecimiento de fibroblasto
<b>FOXA</b>	<i>Forkhead box A</i>	Caja de horquilla A
<b>G3BP1</b>	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>	Proteína 1 de unión a la proteína activadora de ras GTPasa
<b>G6PC</b>	<i>Glucose-6-Phosphatase</i>	Glucosa 6-fosfatasa
<b>G9A (EHMT2)</b>	<i>Euchromatic histone lysine methyltransferase 2</i>	Histona eucromática lisina metiltransferasa 2
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GATA</b>	<i>GATA binding protein</i>	Proteínas GATA
<b>GCK</b>	<i>Glucokinase</i>	Glucocquinasa
<b>GLS2</b>	<i>Glutaminase 2</i>	Glutaminasa
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>	Ontología Génica
<b>GPS</b>	<i>Glutamine/penicillin/streptomycin</i>	Glutamina/Penicilina/Estreptomicina
<b>GSH</b>	<i>Glutathione</i>	Glutati6n
<b>GSK3 <math>\alpha/\beta</math></b>	<i>Glycogen synthase kinase 3 <math>\alpha/\beta</math></i>	Gluc6geno sintasa quinasa 3 $\alpha/\beta$
<b>GST</b>	<i>Glutathione-S-transferase</i>	Glutati6n-S-transferasa
<b>GYS</b>	<i>Glycogen synthase</i>	Gluc6geno sintasa
<b>H&amp;E</b>	<i>Haematoxylin and eosin</i>	Hematoxilina y eosina
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	<i>Histone H2AX</i>	Histona H2AX
<b>HBV</b>	<i>Hepatitis B virus</i>	Virus de la hepatitis B
<b>HCC</b>	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	Hepatocarcinoma
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis C virus</i>	Virus de la hepatitis C

<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor</i>	Factor de crecimiento hepatocitario
<b>HK2</b>	<i>Hexokinase 2</i>	Hexoquinasa 2
<b>HMOX1</b>	<i>Heme oxygenase 1</i>	Hemo-oxigenasa-1
<b>HNF1<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 1<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></i>	Factor nuclear de hepatocito 1 $\alpha$ / $\beta$
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>	Factor nuclear de hepatocito 4 $\alpha$
<b>HNF4<math>\alpha</math>-P1</b>	<i>P1 promoter-derived HNF4<math>\alpha</math> isoforms</i>	Isoformas de HNF4 $\alpha$ derivadas del promotor P1
<b>HNF4<math>\alpha</math>-P2</b>	<i>P2 promoter-derived HNF4<math>\alpha</math> isoforms</i>	Isoformas de HNF4 $\alpha$ derivadas del promotor P2
<b>HNF6</b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 6</i>	Factor nuclear de hepatocito 6
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HSC</b>	<i>Hepatic stellate cells</i>	Células estrelladas hepáticas
<b>IF</b>	<i>Immunofluorescence</i>	Inmunofluorescencia
<b>IgG</b>	<i>Immunoglobulin G</i>	Inmunoglobulina G
<b>IHQ</b>	<i>Immunohistochemistry</i>	Inmunohistoquímica
<b>IL-22</b>	<i>Interleukin 22</i>	Interleucina 22
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin 6</i>	Interleucina 6
<b>INSR A/B</b>	<i>Insulin receptor A/B</i>	Isoforma A/B del receptor de la insulina
<b>IP</b>	Immunoprecipitation	Inmunoprecipitación
<b>JNK</b>	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
<b>LDH</b>	<i>Lactate dehydrogenase</i>	Lactato deshidrogenasa
<b>LNP</b>	<i>Lipid nanoparticle</i>	Nanopartículas lipídicas
<b>LPK</b>	<i>L-pyruvate kinase</i>	Piruvato quinasa hepática
<b>LRH-1</b>	<i>Liver receptor homolog-1</i>	Receptor hepático homólogo 1
<b>LXR</b>	<i>Liver X receptor</i>	Receptor X del hígado
<b>MAT1A</b>	<i>Methionine adenosyltransferase 1A</i>	Metionina adenosiltransferasa 1A



<b>MAT2A</b>	<i>Methionine adenosyltransferase 2A</i>	Metionina adenosiltransferasa 2A
<b>M-MLV</b>	<i>Moloney murine leukemia virus</i>	Virus de la leucemia de Moloney de ratón
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>	RNA mensajero
<b>MSGP</b>	<i>Mammalian Stress Granules Proteome</i>	Proteoma de los Gránulos de Estrés de los Mamíferos
<b>NAC</b>	<i>N-acetylcysteine</i>	N-acetilcisteína
<b>NAFLD</b>	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>	Enfermedad del hígado graso por causas no alcohólicas
<b>NAPQI</b>	<i>N-acetyl-p-benzoquinone imine</i>	N-acetil- <i>p</i> -benzoquinona imina
<b>NLS</b>	<i>Nuclear localization signal</i>	Señal de localización nuclear
<b>NMD</b>	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>	Sistema de degradación de los mRNA sin sentido
<b>OSM</b>	<i>Oncostatin M</i>	Oncostatina M
<b>p21</b>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>	Inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina
<b>p38 MAPK</b>	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>	Proteína quinasa p38 activada por mitógenos
<b>PAS</b>	<i>Periodic acid Schiff stain</i>	Tinción de ácido periódico de Schiff
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PEPCK</b>	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
<b>PI3K-AKT</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B</i>	Fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>	Proteína quinasa C
<b>PKM2</b>	<i>Pyruvate kinase Muscle isozyme 2</i>	Piruvato quinasa de músculo 2
<b>PPAR<math>\alpha</math>/<math>\gamma</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>	Receptor $\alpha$ / $\gamma$ activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PRP8</b>	<i>Pre-mRNA processing factor 8</i>	Factor 8 de procesamiento del pre-mRNA
<b>PRMT1</b>	<i>Protein arginine methyltransferase 1</i>	Proteína arginina metiltransferasa 1
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa

<b>qPCR</b>	Real-time PCR	PCR a tiempo real
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico
<b>RNasa</b>	<i>Ribonuclease</i>	Ribonucleasa
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RP</b>	<i>Random primers</i>	Cebadores aleatorios
<b>saRNA</b>	<i>Short-activating RNA</i>	Pequeños oligonucleótidos de RNA
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>	Error estándar de la media
<b>SG</b>	<i>Stress Granules</i>	Gránulos de estrés
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>	RNA de interferencia pequeños
<b>SLU7</b>	<i>Splicing factor synergistic lethal with U5 snRNA 7</i>	Factor de <i>splicing</i> letal 7 sinérgico con el snRNA U5
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	<i><math>\alpha</math>-Smooth muscle actin</i>	$\alpha$ -actina de músculo liso
<b>SOD2</b>	<i>Superoxide dismutase 2</i>	Superóxido dismutasa 2
<b>SP-1</b>	<i>Specificity protein 1</i>	Proteína específica 1
<b>SREBP1</b>	<i>Sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	Proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroides
<b>SRSF 1/2/3</b>	<i>Serine and arginine rich splicing factor 1/2/3</i>	Factor de <i>splicing</i> 1/2/3 rico en serina y arginina
<b>SULT</b>	<i>Sulfotransferase</i>	Sulfotransferasa
<b>TAGIN</b>	<i>Transcription-associated genome instability</i>	Inestabilidad genómica asociada a la transcripción
<b>TBX3</b>	<i>T-Box transcription factor 3</i>	Factor de transcripción caja-T 3
<b>TGF<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\alpha</math>/<math>\beta</math></i>	Factor de crecimiento transformante $\alpha$ / $\beta$
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>	Factor de necrosis tumoral
<b>TP53</b>	<i>Tumor suppressor protein 53</i>	Proteína supresora de tumores 53
<b>TTR</b>	<i>Transthyretin</i>	Transtiretina
<b>UDP</b>	<i>Uridine diphosphate</i>	Uridina difosfato
<b>UGT</b>	<i>UDP-glucuronosyltransferase</i>	UDP-glucuroniltransferasas

<b>UGT1A1</b>	<i>UDP-glucuronosyltransferase Family 1 Member A1</i>	UDP-glucuroniltransferasa-1A1
<b>UHRF1</b>	<i>Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1</i>	Proteína similar a la ubiquitina con dominios PHD y dedo anillo 1
<b>USP10</b>	<i>Ubiquitin-specific protease 10</i>	Proteasa 10 específica de ubiquitina
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>	<i>Western blot</i>
<b>WNT</b>	<i>Wingless type</i>	Proteínas Wnt
<b>WT1</b>	<i>Wilms' tumor 1 suppressor</i>	Supresor del tumor de Wilms 1
<b>YAP1</b>	<i>Yes1 associated transcriptional regulator</i>	Proteína asociada a Yes 1



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>1. EL HÍGADO</b> .....	<b>27</b>
1.1. Identidad hepatocelular .....	27
1.2. Epidemiología y etiología de las enfermedades hepáticas .....	30
<b>2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO HEPÁTICO</b> .....	<b>32</b>
2.1. Señales celulares y factores de transcripción implicados en el desarrollo del hígado	32
2.2. Adquisición del fenotipo adulto de los hepatocitos: participación de factores de transcripción y factores de <i>splicing</i> .....	34
<b>3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA</b> .....	<b>37</b>
3.1. Mecanismos hepáticos de protección: Respuesta regeneradora y reparadora .....	37
3.2. Desdiferenciación hepática .....	39
<b>4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FACTOR NUCLEAR DE HEPATOCITO 4<math>\alpha</math> (HNF4<math>\alpha</math>)</b> .....	<b>41</b>
4.1. Papel de HNF4 $\alpha$ en la fisiología hepática .....	43
4.2. Desregulación de HNF4 $\alpha$ en la patología hepática .....	46
<b>5. EL FACTOR DE <i>SPLICING</i> SLU7</b> .....	<b>49</b>
5.1. Papel de SLU7 en la fisiología hepática .....	51
5.2. SLU7 en la patología hepática .....	53
<b>6. TERAPIAS DIFERENCIADORAS</b> .....	<b>56</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>61</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
<b>1. MUESTRAS DE HÍGADOS HUMANOS</b> .....	<b>67</b>
<b>2. MODELOS ANIMALES</b> .....	<b>67</b>
2.1. Modelo de daño hepático crónico inducido por tetracloruro de carbono (CCl <sub>4</sub> ) .....	68
2.2. Modelo de daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP) .....	68
2.3. Producción e inyección de vectores adenoasociados (AAV).....	69
<b>3. CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>71</b>
3.1. Líneas celulares .....	71
3.2. Transfección transitoria de células .....	72
3.2.1. RNA de interferencia pequeños (siRNA) .....	72

3.2.2.	Plásmidos .....	73
3.3.	Tratamientos .....	74
<b>4.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN</b> .....	<b>75</b>
4.1.	Extracción de RNA .....	75
4.2.	Retrotranscripción.....	76
<b>5.</b>	<b>EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL (qPCR)</b> .....	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>77</b>
6.1.	Extracción de proteínas totales.....	77
6.2.	Fraccionamiento subcelular .....	78
6.3.	Cuantificación de proteínas .....	79
6.3.1.	Método de BCA .....	79
6.3.2.	Método de Bradford.....	79
<b>7.</b>	<b>ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>79</b>
7.1.	Inmunodetección de proteínas ( <i>Western blot</i> ; WB) .....	79
7.1.1.	Electroforesis y electrotransferencia .....	79
7.1.2.	Inmunodetección .....	80
7.2.	Inmunohistoquímica (IHQ).....	81
7.3.	Inmunofluorescencia.....	82
<b>8.</b>	<b>DETECCIÓN DE INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS</b> .....	<b>83</b>
8.1.	Co-Inmunoprecipitación (Co-IP).....	83
8.2.	Análisis del interactoma de SLU7 .....	84
<b>9.</b>	<b>DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN SUERO</b> .....	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL HÍGADO</b> .....	<b>85</b>
10.1.	Tinción hematoxilina y eosina (H&E).....	85
10.2.	Tinción rojo sirio .....	85
10.3.	Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) .....	86
<b>11.</b>	<b>MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE APAP-GLUCURÓNICO</b> .....	<b>86</b>
11.1.	Preparación de las muestras .....	86
11.2.	Equipo y análisis .....	87
<b>12.</b>	<b>MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN (GSH)</b> .....	<b>88</b>
<b>13.</b>	<b>MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) INTRACELULARES</b> .....	<b>88</b>
<b>14.</b>	<b>MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA DE LOS VECTORES REPORTEROS DE <i>HNF4α</i></b> ..	<b>89</b>
<b>15.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>89</b>
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>

<b>1. LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE SLU7 SE REDUCE CON EL DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO .....</b>	<b>93</b>
<b>2. LA DESREGULACIÓN DE SLU7 EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA SE ASOCIA CON LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>HNF4α</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>3. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE SLU7 SENSIBILIZA AL HÍGADO FRENTE AL DAÑO CRÓNICO</b>	<b>97</b>
<b>4. SLU7 ES NECESARIO PARA PRESERVAR LA DIFERENCIACIÓN DEL HÍGADO DURANTE EL DAÑO CRÓNICO .....</b>	<b>101</b>
4.1. La haploinsuficiencia de <i>Slu7</i> exagera la alteración en el uso del promotor de <i>Hnf4α</i> .....	101
4.2. La haploinsuficiencia de <i>Slu7</i> promueve la inhibición de la expresión de genes hepato-específicos .....	104
<b>5. SLU7 ES NECESARIO PARA MANTENER UNA CORRECTA FUNCIÓN HEPÁTICA.....</b>	<b>105</b>
5.1. SLU7 regula el correcto almacenamiento de glucógeno en el hígado .....	105
5.2. SLU7 es necesario para mantener una correcta respuesta a la insulina en el hígado.....	106
5.3. SLU7 protege al hígado frente al estrés oxidativo .....	107
5.4. SLU7 es necesario para el correcto catabolismo de las inmunoglobulinas .....	108
5.5. SLU7 es necesario para la correcta expresión del citocromo CYP2E1 en respuesta al daño.....	109
<b>6. SLU7 ES NECESARIO PARA CONTROLAR LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA HNF4α1 ....</b>	<b>111</b>
6.1. SLU7 es necesario para mantener la expresión post-transcripcional de HNF4α1 de manera autónoma en células hepáticas .....	111
6.2. SLU7 controla la estabilidad de la proteína HNF4α1 impidiendo su degradación a través del proteasoma .....	114
6.3. La estabilidad de HNF4α1 mediada por SLU7 depende de la protección frente al estrés oxidativo .....	116
<b>7. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE SLU7 FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO... </b>	<b>117</b>
7.1. Análisis del interactoma de SLU7 mediante espectrometría de masas.....	118
7.2. SLU7 forma complejos con proteínas clave de los gránulos de estrés .....	119
7.3. SLU7 es necesario para la correcta formación de los gránulos de estrés, controlando la expresión de G3BP1 y USP10 .....	121
7.4. SLU7 controla la estabilidad de HNF4α1 a través de la actividad antioxidante de USP10.....	122
7.5. La expresión de HNF4α1 y USP10 disminuye en la cirrosis y en el hepatocarcinoma.....	125
<b>8. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE SLU7 SENSIBILIZA AL HÍGADO FRENTE AL DAÑO AGUDO</b>	<b>126</b>
8.1. Alteración en la expresión y localización celular de SLU7 durante el daño agudo por APAP.....	127

8.2. El daño hepático agudo inducido por APAP se exagera en los ratones haploinsuficientes para <i>Slu7</i> .....	129
8.3. SLU7 es necesario para preservar la diferenciación y función del hígado y protegerlo frente al daño oxidativo durante el daño agudo .....	131
8.4. La haploinsuficiencia de <i>Slu7</i> disminuye la capacidad del metabolismo no tóxico de APAP.....	134
8.5. La haploinsuficiencia de <i>Slu7</i> favorece la hepatotoxicidad de APAP mediada por la vía del CYP450.....	136
8.6. La haploinsuficiencia de <i>Slu7</i> no afecta a la detoxificación a través de glutatión ....	138
<b>9. LA RESTAURACIÓN DE LOS NIVELES DE SLU7 EN EL HÍGADO PROTEGE FRENTE AL DAÑO CRÓNICO</b> .....	<b>139</b>
9.1. Prevenir la caída de SLU7 mediada por el daño crónico inducido por CCl <sub>4</sub> atenúa el daño hepático .....	140
9.2. La sobreexpresión de SLU7 en el hígado previene la desdiferenciación y el estrés oxidativo generados por el daño crónico.....	142
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>163</b>
<b>ANEXOS 1-3</b> .....	<b>187</b>
<b>ANEXO 4: Publicación en Hepatology</b> .....	<b>193</b>
<b>ANEXO 5: Premio Fundación Lilly – Publicación artículo The Conversation</b> .....	<b>229</b>



## **INTRODUCCIÓN**

---



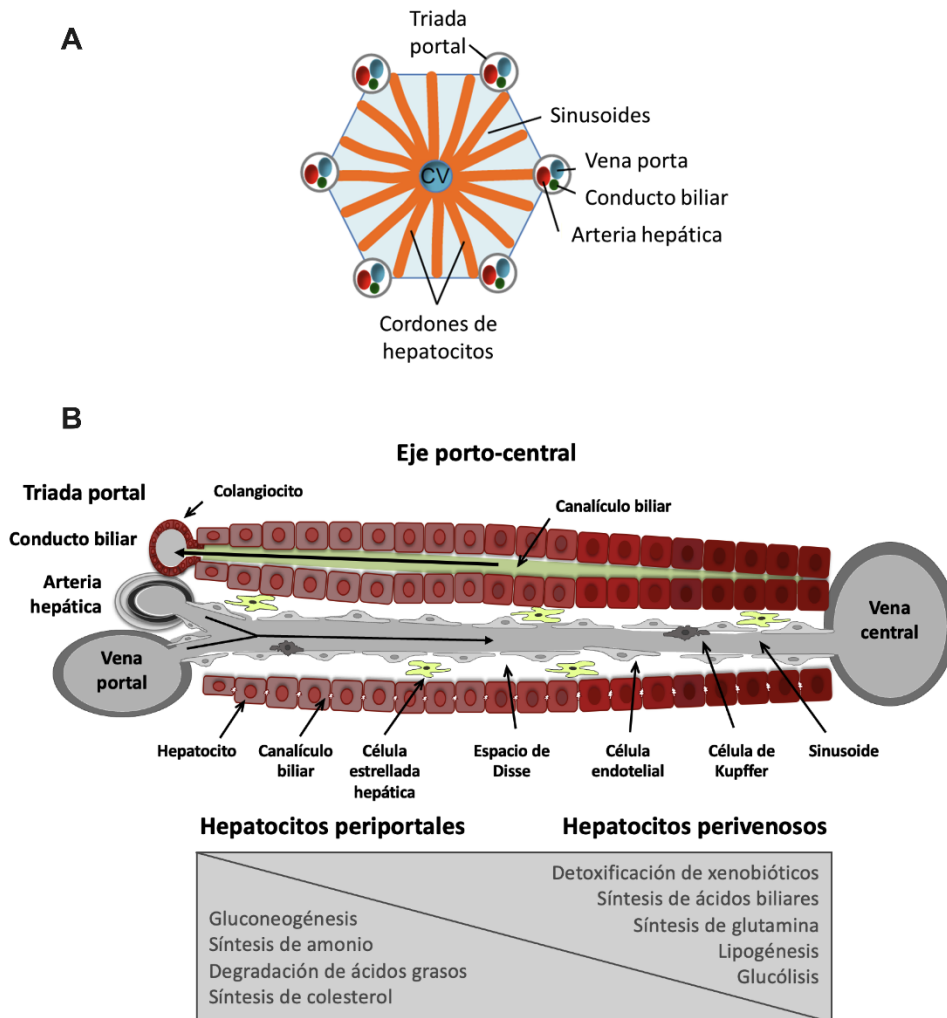
## 1. EL HÍGADO

### 1.1. Identidad hepatocelular

El hígado es un órgano con un papel central en el organismo puesto que realiza numerosas funciones esenciales para mantener la homeostasis sistémica. A nivel histológico, el hígado presenta una arquitectura compleja y muy organizada, formada por diferentes poblaciones celulares que desarrollan funciones concretas y, en conjunto, permiten el correcto funcionamiento del órgano. Así, el hígado está formado por las células parenquimales que incluyen a los hepatocitos y a los colangiocitos, y las células no parenquimales, que engloban a las células estrelladas hepáticas (HSC, *hepatic stellate cells*), las células de Kupffer o las células endoteliales sinusoidales. La población celular más abundante son los hepatocitos, que constituyen alrededor de un 80 % de la masa hepática total, y son los que más contribuyen al desarrollo de la función hepática. Se trata de unas células epiteliales polarizadas, muy diferenciadas y quiescentes, aunque presentan una gran capacidad de regeneración en respuesta a estímulos nocivos<sup>1-4</sup>.

Las células hepáticas se organizan en el hígado alrededor de una estructura anatómica peculiar y compleja, determinada por el patrón del flujo sanguíneo, y que es esencial para que se puedan llevar a cabo las funciones hepáticas. Brevemente, el hígado recibe sangre de la vena porta rica en nutrientes y productos de deshecho, y sangre de la arteria hepática rica en oxígeno, que fluye a través de una red de capilares sinusoidales entre las células hepáticas, hasta drenar en las venas centrales. Junto a las venas porta y las arterias hepáticas se encuentran los conductos biliares que conducen la bilis hasta la vesícula biliar y el intestino, y los tres conductos juntos forman la triada portal. La unidad funcional del hígado son los lobulillos hepáticos, que consisten en fragmentos poligonales de células hepáticas dispuestas en torno a una vena central y rodeadas de triadas portales. Los capilares sinusoidales conectan la vena central con los espacios porta y, en paralelo a ellos, se organizan los hepatocitos formando cordones gruesos unicelulares (Figura 1A). Tanto la vena porta como la arteria hepática suministran la sangre a los hepatocitos conforme fluye a través de la red de sinusoides hasta drenar en las venas centrales. En función de si los hepatocitos se localizan más cerca de la región periportal o más cerca de la región pericentral, presentan diferencias fenotípicas en cuanto a la expresión de enzimas metabólicas, por lo que realizan funciones metabólicas diferentes. Esta distribución diferencial de las funciones metabólicas y secretoras

del hígado a lo largo del eje porto-central se conoce como zonación, y constituye un marcador clave de la maduración hepática (Figura 1B) <sup>1-5</sup>.



**Figura 1. Estructura del hígado. (A)** Representación de la unidad funcional hepática, constituida por lóbulos hepáticos que contienen una vena central (CV) desde la que los hepatocitos se organizan en forma de cordones hacia las triadas portales. Las triadas portales están formadas por una vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar. Los cordones de hepatocitos están formados por filas de una célula y están separados por los sinusoides hepáticos, que conducen la sangre desde las triadas portales hacia la vena central. Adaptado de Gordillo y cols. *Development* (2015) <sup>2</sup>. **(B)** Representación esquemática de una parte del lóbulo que incluye la triada portal, los sinusoides hepáticos, la vena central y las diferentes poblaciones celulares. Las flechas indican el flujo que siguen la sangre y la bilis por sus respectivos conductos. El cuadro de abajo recoge las vías metabólicas que se realizan en los hepatocitos según su distribución. Adaptado de Berasain, Ávila. *Cell Mol Life Sci* (2015) <sup>4</sup>.

A lo largo del desarrollo del hígado, las células hepáticas expresan un programa transcripcional hepático concreto, el cual permite realizar las funciones hepáticas correspondientes en cada etapa. Así, por ejemplo, durante el estadio embrionario el hígado se

encarga principalmente de la hematopoyesis, mientras que en la etapa adulta asume un papel muy importante en el metabolismo de macronutrientes, como glúcidos, lípidos o ácidos biliares <sup>1</sup>, en el metabolismo de xenobióticos y productos de desecho endógenos, en la síntesis de proteínas séricas, hormonas y factores de coagulación, y en el almacenamiento de vitaminas y minerales <sup>4,5</sup>. En relación con el metabolismo de los glúcidos, por ejemplo, el hígado se encarga de sintetizar glucógeno a partir de la glucosa circulante, mediante la enzima glucógeno sintasa 2 (GYS2, *glycogen synthase*), para utilizarlo como reservorio de energía durante periodos de ayuno <sup>6</sup>. El glucógeno sintetizado se acumula en forma de gránulos en el citosol de los hepatocitos, quienes además contienen las proteínas necesarias para su regulación <sup>7</sup>.

En cuanto a la detoxificación de xenobióticos y productos de desecho endógenos como los ácidos biliares o los ácidos grasos <sup>8</sup>, el hígado convierte los metabolitos lipófilos en moléculas hidrosolubles que son más fácilmente eliminables. Para ello, las células expresan una serie de enzimas de biotransformación que catalizan la oxidación, reducción o hidrólisis de los metabolitos lipófilos (enzimas de Fase I, como las mono-oxigenasas citocromo P450 (CYP450, *cytochrome P450*)), y enzimas que conjugan los metabolitos con grupos funcionales (enzimas de Fase II, como las uridina difosfato (UDP)-glucuroniltransferasas (UGT, *Uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferase*), las sulfottransferasas (SULT, *sulfotransferase*) o las glutatión-S-transferasas (GST, *glutathione-S-transferase*)) <sup>9</sup>. Sin embargo, algunas veces los intermediarios que se forman en el proceso resultan más tóxicos para la célula, como por ejemplo en el caso del paracetamol y su metabolito intermediario N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI, *N-acetyl-p-benzoquinone imine*) <sup>10</sup>. Es interesante destacar que en determinadas ocasiones esta maquinaria hepática se utiliza para activar pro-fármacos con el principal objetivo de mejorar el perfil farmacocinético de los fármacos <sup>8,11,12</sup>.

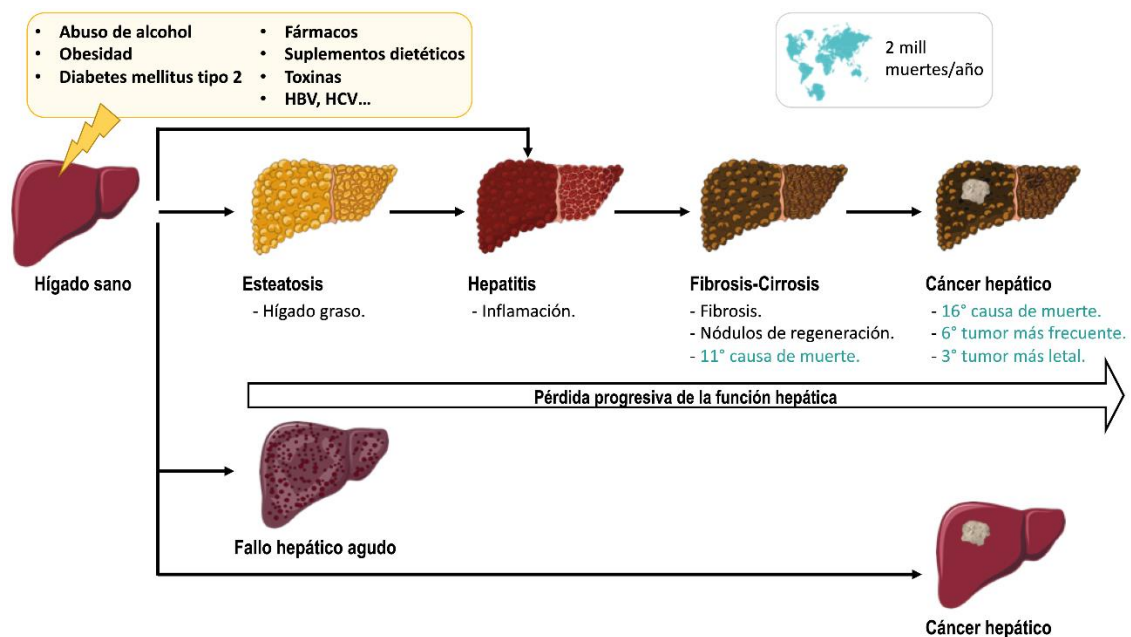
En definitiva, el hígado realiza funciones muy diferentes que responden a necesidades concretas de todo el organismo. Para que estas funciones se desarrollen correctamente, es necesario que la arquitectura hepática se mantenga intacta y que los hepatocitos, principales efectores de las funciones hepáticas, preserven su fenotipo diferenciado expresando genes específicos (hepato-específicos). Así, como veremos a continuación, la pérdida de la diferenciación hepatocelular y la alteración del parénquima hepático están en la base del desarrollo de las enfermedades hepáticas.

## 1.2. Epidemiología y etiología de las enfermedades hepáticas

La posición central del hígado en la regulación del metabolismo sistémico y en la detoxificación del organismo favorece su exposición a estímulos nocivos endógenos y exógenos, incluyendo fármacos, alcohol, toxinas, infecciones virales o componentes de la dieta, con el consiguiente riesgo de exceder su capacidad funcional normal y desencadenar la enfermedad. Así, las enfermedades hepáticas engloban a un conjunto de afecciones originadas por causas diferentes y que se clasifican en función de las manifestaciones clínicas de los pacientes. La enfermedad puede instaurarse de manera aguda o puede cronificarse y progresar desde estadios más leves como la esteatosis, hacia estadios más avanzados y graves como la fibrosis o la cirrosis, o en última instancia culminar en un cáncer hepático <sup>13</sup>. El daño generado sobre los hepatocitos supone la pérdida progresiva de la función hepática <sup>14</sup>, de forma que, en estadios terminales el riesgo de mortalidad es muy elevado. Por ello, no es de extrañar que las enfermedades hepáticas contribuyan de forma importante a la morbilidad y la mortalidad poblacional <sup>1</sup>. En este sentido, la carga sanitaria de las enfermedades hepáticas está creciendo a nivel mundial, y se estima que pueden causar hasta 2 millones de muertes al año <sup>13</sup>. Así, en la actualidad en Europa, las enfermedades hepáticas ocupan la 2ª posición en las causas de pérdida de años de vida laboral <sup>15</sup>. Además, en Europa el 3 % y a nivel mundial el 3,5 % de las muertes están causadas por enfermedades hepáticas <sup>13,15</sup>. Más en concreto, la cirrosis ocupa el puesto número 11 como causa de mortalidad en el mundo <sup>13</sup>, y el cáncer hepático fue en 2020 el 6º cáncer más frecuente y el 3º más letal en el mundo <sup>16</sup> (Figura 2). Entre los cánceres hepáticos, el hepatocarcinoma (HCC, *hepatocellular carcinoma*) es el más frecuente y representa el 80 % de los tumores hepáticos <sup>16</sup>. Generalmente se instaura sobre un hígado cirrótico, aunque aproximadamente un 20 % de los casos de HCC se desarrollan en pacientes sin cirrosis <sup>17</sup>.

La etiología de las enfermedades hepáticas varía en función de la región geográfica. Así, por ejemplo, en países más orientales como los del continente asiático, las infecciones por los virus de la hepatitis B (HBV, *hepatitis B virus*) o C (HCV, *hepatitis C virus*) representan una causa importante de enfermedad hepática <sup>13</sup>. En Europa, como muy bien se recoge en el último informe publicado por el grupo de trabajo de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) junto con la Comisión de *The Lancet* sobre las enfermedades del hígado <sup>15</sup>, el panorama de las enfermedades hepáticas ha cambiado en los últimos años. Así, el mejor control de las hepatitis de origen viral junto con el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos frente a ellas, ha desbancado a estos agentes infecciosos como principales causantes de enfermedad

hepática, dejando paso a los nuevos patrones de alimentación y consumo de alcohol. De esta manera, en Europa, las enfermedades hepáticas relacionadas con el consumo de alcohol causan el 50 % de las cirrosis <sup>18</sup>, y se calcula que un 40 % de las muertes prematuras están relacionadas con el consumo de alcohol <sup>19</sup>. Por otra parte, el exceso en el consumo de alimentos ultraprocesados, caracterizados por una alta densidad de energía y una baja calidad nutricional, junto con la falta de ejercicio físico, han incrementado la prevalencia de obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico entre la población, todos ellos factores que favorecen la aparición de la enfermedad de hígado graso por causas no alcohólicas (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) <sup>20-26</sup>. Actualmente, la condición de NAFLD es la enfermedad hepática más común en el mundo, afectando a un 25,2 % de la población mundial <sup>24</sup>. En estos pacientes, el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica, caracterizada por daño hepático, inflamación y fibrosis, marca el primer paso de la progresión de la enfermedad hepática hacia estadios más avanzados para los que las terapias eficaces suponen un reto <sup>25</sup>.



**FIGURA 2. Las enfermedades hepáticas.** Representación esquemática del inicio y la progresión de la enfermedad hepática, junto con los principales factores etiológicos, manifestaciones clínicas y datos de la prevalencia mundial. Información obtenida de Asrani y cols. *Journal of Hepatology* (2019) <sup>13</sup> y de Karlsen y cols. *Lancet* (2022) <sup>15</sup>.

El daño hepático inducido por fármacos (DILI, *Drug-induced liver injury*) es la principal causa de hepatitis aguda <sup>13</sup>, y contribuye de forma importante al cómputo global de las enfermedades hepáticas. Esta enfermedad es la principal causa de retirada de fármacos del mercado antes y después de su comercialización. Los fármacos anti-infecciosos son los

principales causantes de DILI en occidente, aunque la contribución de la sobredosis de paracetamol en países como Estados Unidos o en Reino Unido no es nada despreciable <sup>13,15,27</sup>. Además de fármacos, otros agentes con potencial hepatotóxico como hierbas o suplementos dietéticos también pueden inducir DILI <sup>28</sup>. Las manifestaciones clínicas en los pacientes son variables, desde aparición de esteatosis e inflamación o colestasis, hasta insuficiencia hepática grave y aguda con alta mortalidad <sup>29</sup>.

En conjunto, la instauración y la progresión de la enfermedad hepática depende de la intensidad y duración del insulto nocivo recibido, y la pérdida de las funciones hepáticas es el denominador común <sup>30,31</sup>, que independientemente de la causa etiológica dictamina el pronóstico de los pacientes <sup>32</sup>. Conocer los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad y en esta pérdida de función es clave para poder abordar terapéuticamente estas enfermedades.

## **2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO HEPÁTICO**

### **2.1. Señales celulares y factores de transcripción implicados en el desarrollo del hígado**

Para poder estudiar los mecanismos que subyacen a la enfermedad hepática es importante conocer cómo se desarrolla el hígado. Característicamente, y como se explica más adelante, durante la enfermedad hepática el órgano tiende a revertir hacia un fenotipo fetal. Por ello, conocer los mecanismos que dirigen la maduración hepática puede ser de utilidad terapéutica para mimetizar ese proceso en un contexto de enfermedad.

La organogénesis del hígado comienza en los embriones a partir de las células del endodermo, quienes gracias a señales concretas de tejidos adyacentes muestran su compromiso hacia la diferenciación hepática <sup>1,5,33</sup>. En este primer estadio del desarrollo, denominado especificación, se detectan señales como la proteína morfogénica de hueso (BMP, *bone morphogenic protein*), el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF, *fibroblast growth factor*) o las proteínas Wnt (WNT, *wingless-type*), y se empiezan a expresar los primeros genes que marcan el camino de la diferenciación hepática como son la *Albumina* (ALB, *albumin*), la *Transtiretina* (TTR, *transthyretin*), el *factor nuclear de hepatocito 4α* (HNF4α, *hepatocyte nuclear factor 4α*), la *α-fetoproteína* (AFP, *α-fetoprotein*) o las citoqueratinas <sup>2,34,35</sup>. Para la activación de la transcripción génica hepática es necesaria la participación de factores de transcripción concretos como la caja de horquilla A (FOXA, *forkhead box A*), las proteínas



GATA (GATA binding protein) o el factor nuclear de hepatocito 1 $\beta$  (HNF1 $\beta$ , *hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$* ) (Figura 3).

Una vez especificado el dominio hepático, las células del endodermo se convierten en células progenitoras del hígado, denominadas hepatoblastos <sup>36</sup>, quienes gracias a señales de factores de crecimiento como el FGF, el factor de crecimiento hepatocitario (HGF, *hepatocyte growth factor*), WNT/ $\beta$ -Catenina o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* ), migran y proliferan para poblar el hígado <sup>1,33</sup>. Los hepatoblastos pueden diferenciarse hacia los dos tipos celulares que componen el parénquima hepático, los hepatocitos y los colangiocitos <sup>1</sup>. Esta diferenciación comienza aproximadamente a los 56-58 días de la gestación en humanos, o a los 13,5 días en ratones, y es muy dependiente de la localización de los hepatoblastos <sup>2</sup>, así como de los gradientes de señalización extracelulares y de los reguladores de la transcripción hepáticos <sup>1,3</sup>. De acuerdo con ello, en los hepatoblastos próximos a la vena portal, que reciben señales como TGF $\beta$  o Notch, se reprime la expresión de la proteína de unión al potenciador CCAAT $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ , *CAAT enhancer binding protein  $\alpha$* ) y se favorece la del factor nuclear de hepatocito 6 (HNF6, *hepatocyte nuclear factor 6*) y la de HNF1 $\beta$ , lo que promueve la expresión de un perfil de genes específicos de los colangiocitos <sup>2,5</sup>. En cambio, en los hepatoblastos de las regiones pericentrales, se reciben señales como WTN/ $\beta$ -catenina, oncostatina M (OSM, *oncostatin M*), HGF o glucocorticoides, que favorecen la expresión de C/EBP $\alpha$ , la de HNF4 $\alpha$  y la del factor nuclear de hepatocito 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ), promoviendo un perfil de expresión génica característico de los hepatocitos <sup>2,37</sup> (Figura 3).

Es importante mencionar que la activación del perfil de transcripción génica hepática depende de la activación jerárquica y secuencial de factores de transcripción hepáticos <sup>2</sup>. Ninguno de estos factores se expresa exclusivamente en células hepáticas y ninguno de ellos por sí solo puede iniciar el programa hepático en células no hepáticas, sino que la regulación transcripcional de genes específicos del hígado requiere de una acción combinada y definida de estos activadores <sup>38</sup>, junto con la participación de diferentes vías de señalización que controlan su expresión <sup>1,2,5,35,39,40</sup>. Así, FOXA y GATA, que actúan en estadios iniciales del desarrollo, activan HNF4 $\alpha$  en la fase de especificación hepática, y la progresiva acumulación de HNF4 $\alpha$  activará la expresión de HNF1 $\alpha/\beta$  y HNF6 en los hepatoblastos. Altos niveles de expresión de HNF4 $\alpha$  y C/EBP $\alpha$  conducirán a la diferenciación hepatocelular, mientras que la represión de HNF4 $\alpha$  y C/EBP $\alpha$ , y la consecuente acumulación de HNF6 y HNF1 $\alpha/\beta$  conducirán a la diferenciación hacia colangiocitos <sup>5,35</sup>. De forma adicional, cabe resaltar que para la diferenciación de los hepatocitos es también importante el papel del factor de transcripción

caja-T 3 (TBX3, *T-Box transcription factor 3*)<sup>41</sup>, ya que mantiene la expresión de HNF4 $\alpha$  y C/EBP $\alpha$ <sup>1</sup>.

## **2.2. Adquisición del fenotipo adulto de los hepatocitos: participación de factores de transcripción y factores de *splicing***

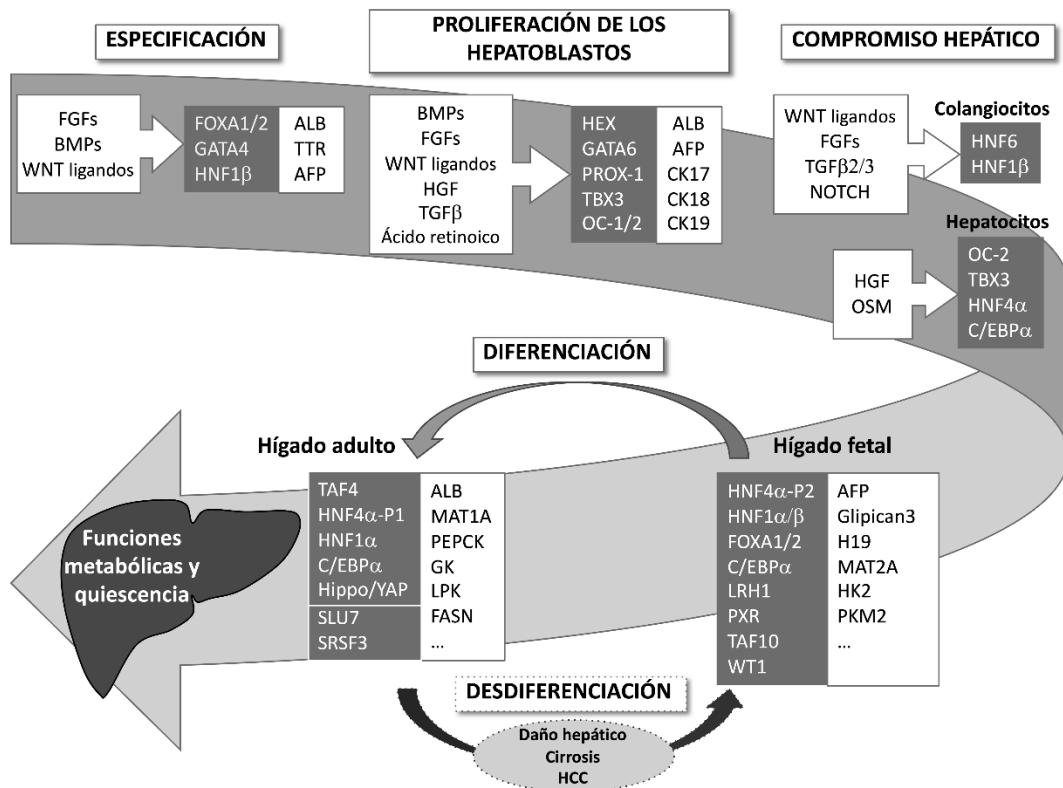
Los hepatoblastos comprometidos a la diferenciación hacia hepatocitos deben cumplir un proceso de maduración por el que se establece el patrón de expresión génica que define la identidad hepatocelular y que permitirá a los hepatocitos adultos realizar todas sus funciones especializadas<sup>42</sup>. A través de esta maduración, las células adquieren las características específicas de los hepatocitos adultos como son la quiescencia, el desarrollo de polaridad celular y la competencia metabólica completa, que se establece en función de su localización a lo largo del eje porto-central (zonación)<sup>1,4</sup>.

En la medida en la que se avanza hacia un fenotipo adulto, los eventos regulatorios se vuelven más complejos, y a día de hoy todavía no se conocen con precisión los mecanismos que conducen a la completa adquisición de las funciones hepáticas y su mantenimiento en la fase post-natal. La evidencia más sólida hasta la fecha indica que hay un núcleo de factores de transcripción hepáticos que actúan formando una red dinámica y estrechamente coordinada, regulando recíprocamente su expresión y promoviendo el mantenimiento de la identidad hepática<sup>4,35</sup>. Entre ellos se encuentran HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, FOXA2 y el receptor hepático homólogo 1 (LRH-1, *liver receptor homolog-1*)<sup>38,43</sup>. La contribución individual de cada uno de estos factores a la diferenciación hepática se ha estudiado en los correspondientes modelos animales delecionados. Así, por ejemplo, FOXA es necesario para que se produzca la unión de HNF4 $\alpha$  a las regiones potenciadoras co-ocupadas por ambos factores<sup>44</sup>, y su deleción específica en los hepatocitos resulta en colestasis intrahepática y daño hepático<sup>45</sup>. Además, la depleción combinada de FOXA1, FOXA2 y FOXA3 en el hígado de ratones adultos resulta en una profunda alteración en el transcriptoma hepatocelular<sup>44</sup>. La familia del factor de transcripción HNF1 contiene dos miembros que participan en la identidad hepatocelular, HNF1 $\alpha$  y HNF1 $\beta$ , que se unen a la región promotora de numerosos genes que codifican para proteínas plasmáticas y enzimas metabólicas<sup>46,47</sup>. Mientras que HNF1 $\beta$  resulta esencial en los primeros estadios del desarrollo, HNF1 $\alpha$  participa en el mantenimiento del programa transcripcional de los hepatocitos adultos al modular la actividad de numerosas vías de metabolismo<sup>35,48</sup>. De entre todos los factores de transcripción implicados, HNF4 $\alpha$  constituye uno de los factores más importantes en el mantenimiento del fenotipo hepático diferenciado,

ya que los embriones deficientes en este factor no pueden activar la transcripción génica hepato-específica <sup>49</sup>. En el apartado 4 de la Introducción se describe detalladamente este factor.

Por otro lado, la regulación de la expresión génica se realiza a varios niveles, y después de la transcripción, pueden actuar mecanismos de corte y empalme (*splicing*) alternativo del ácido ribonucleico mensajero (mRNA, *messenger ribonucleic acid*). En el contexto del desarrollo hepático, los factores de *splicing* también juegan un papel relevante en el establecimiento de la identidad hepatocelular, aunque este campo ha sido menos estudiado que el de los factores de transcripción <sup>50</sup>. El papel del *splicing* alternativo en la maduración hepática se atribuye al reemplazo secuencial de isoformas de mRNA fetales hacia las correspondientes adultas, ya que las variantes de proteínas resultantes pueden tener características o funciones biológicas opuestas <sup>51</sup>. Además, en la transición fetal-adulto no solo se han descrito cambios en las isoformas de *splicing*, sino también en los niveles de expresión de factores de *splicing* <sup>50</sup>. Uno de estos factores implicados es la proteína epitelial reguladora del *splicing* 2 (ESRP2, *epithelial splicing regulatory protein 2*). Su expresión se induce durante el proceso de maduración fetal-adulto, y la delección específica en el hígado adulto conduce a la expresión persistente de marcadores fetales y a un impedimento en la expresión de genes hepato-específicos <sup>52</sup>. Otros factores involucrados pertenecen a la familia de las proteínas ricas en serina y arginina (proteínas SR), e incluyen, por ejemplo, a los factores de *splicing* ricos en serina y arginina (SRSF, *serine and arginine rich splicing factor*) SRSF2 o SRSF3. La delección específica de *Srsf2* o *Srsf3* en el hígado resulta en la desdiferenciación y pérdida de las funciones metabólicas hepáticas, como la pérdida de almacenamiento de glucógeno <sup>53,54</sup>. Concretamente, la falta de SRSF3 promueve una alteración en el *splicing* de genes clave como el receptor de la insulina, la *Alb*, enzimas implicadas en el metabolismo del colesterol o el factor de transcripción *Hnf1α*, conduciendo a la disminución de la expresión de otros factores de transcripción hepáticos como *Hnf6*, *Foxa3* y *C/ebpa*, y a la alteración en el metabolismo de glúcidos y lípidos <sup>54</sup>. Además, se detecta la expresión de marcadores fetales como *Afp* o *H19* <sup>54</sup>. El factor de *splicing* letal 7 sinérgico con el snRNA U5 (SLU7, *splicing factor synergistic lethal with U5 snRNA 7*) es otro factor esencial en el mantenimiento de la diferenciación y función metabólica hepática <sup>55</sup>, y se describe detalladamente en el apartado 5 de la Introducción. Cabe destacar que estos factores pueden regularse recíprocamente: SLU7 regula el correcto *splicing* de SRSF3 previniendo la generación de isoformas truncadas con función dominante negativa <sup>55,56</sup>, y la delección de *Srsf3* resulta en una importante reducción de la expresión de *Esrp2* <sup>50</sup>.

Esto pone de manifiesto la existencia de una red jerárquica de factores de *splicing* involucrados en el desarrollo de la identidad hepática (Figura 3).



**FIGURA 3. Representación de las señales y genes regulatorios implicados en los diferentes estadios del desarrollo y la diferenciación hepatocelular.** Las señales regulatorias se representan en los cuadros con flechas, los genes regulatorios se recogen en los cuadros grises y algunos ejemplos de genes diana expresados en cada estadio se incluyen en los cuadros blancos. Adaptado de Berasain, Ávila. *Cell Mol Life Sci* (2015) <sup>4</sup>.

Un claro ejemplo de maduración hepática asociado a la reprogramación transcripcional es el cambio de un metabolismo glucolítico típico de los hepatocitos fetales, en donde los nutrientes son suministrados desde la placenta <sup>50</sup>, hacia uno gluconeogénico en el hígado adulto que necesita cumplir con la homeostasis sistémica. Para ello, se inhibe la expresión de enzimas glucolíticas como la hexoquinasa 2 (HK2, *hexokinase 2*) o la piruvato quinasa de músculo 2 (PKM2, *pyruvate kinase muscle isozyme 2*), a la vez que se inducen las correspondientes enzimas gluconeogénicas y glucogénicas <sup>2,3</sup> como la GYS2, la glucosa-6-fosfatasa (G6PC, *glucose-6-phosphatase*), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*) o la glucoquinasa (GCK, *glucokinase*), constituyendo estas últimas marcadores característicos del hígado adulto <sup>4</sup>. La activación de esta reprogramación está mediada por las vías de señalización del adenosín monofosfato cíclico (cAMP, *cyclic adenosine mono-phosphate*) o de los glucocorticoides <sup>3</sup>, y por la participación de

factores de transcripción que coordinan el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y ácidos biliares del hígado adulto <sup>3,4</sup> como la proteína de unión a elementos de respuesta al cAMP (CREB, *cAMP response element-binding protein*) o la proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1, *sterol regulatory element binding transcription factor 1*), así como de receptores nucleares como el receptor  $\alpha/\gamma$  activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\alpha/\gamma$ , *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$* ) o el receptor X del hígado (LXR, *liver X receptor*), entre otros <sup>57</sup> (Figura 3).

De manera complementaria a la adquisición de las competencias transcripcionales, una marca muy característica de maduración hepatocelular es la represión de genes expresados durante el periodo fetal, como los implicados en la hematopoyesis o en el ciclo celular, y la inducción de genes característicos del hígado adulto, como los relacionados con el metabolismo de los aminoácidos, las grasas, la glucosa o los xenobióticos, con el objetivo de satisfacer las nuevas demandas funcionales <sup>3,50</sup> (Figura 3). El mecanismo subyacente a la represión de genes fetales todavía no se ha terminado de esclarecer, pero adquiere relevancia clínica ya que característicamente en los tumores hepáticos se produce una reactivación de la expresión génica fetal <sup>4</sup>.

### 3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA

#### 3.1. Mecanismos hepáticos de protección: Respuesta regeneradora y reparadora

Como se ha explicado más arriba, el papel central del hígado en el control de múltiples funciones sistémicas le hace estar expuesto a estímulos nocivos que pueden causar la muerte del parénquima funcional, dando origen a la enfermedad hepática. Así, dada su relevancia en el mantenimiento de la homeostasis sistémica, es necesario que se active una respuesta rápida y efectiva que permita restaurar la función hepática. En este sentido, el hígado posee una extraordinaria capacidad regenerativa que solo se activa en respuesta a un daño o pérdida de masa hepática, y que se basa en la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular para proliferar y restaurar la masa hepática perdida <sup>58,59</sup>. En condiciones normales, el hígado es un órgano con poca renovación celular, solamente el 1-2 % de los hepatocitos están activamente en división, mientras que el resto permanecen en un estado de quiescencia (en la fase G0 del ciclo celular) <sup>60</sup>. Ante un daño hepático agudo, la muerte celular induce una importante respuesta inflamatoria (hepatitis) con la activación de las células de Kupffer <sup>61</sup>. La pérdida de parénquima funcional, junto con las señales inflamatorias <sup>62</sup> y mitogénicas emitidas por las células no

parenquimales o llegadas por la circulación desde otros órganos, desencadenan una respuesta regenerativa inicial sobre los hepatocitos remanentes, que se caracteriza por la estimulación de la transcripción génica necesaria para que las células entren en fase de división y proliferen <sup>4,58,59,63-65</sup>. Entre estas señales se encuentran factores de crecimiento como HGF, ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), TGF $\alpha$  o anfirregulina (AREG, *amphiregulin*), el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) o la interleucina 6 (IL-6, *interleukin 6*) <sup>59,63</sup>, aunque las vías de señalización activadas pueden variar en función del estímulo que haya desencadenado el daño <sup>64-66</sup>.

Así, para permitir la división del parénquima en respuesta al daño se produce la represión transitoria de la expresión de genes que controlan la identidad hepatocelular, como es el caso de HNF4 $\alpha$  y otros miembros de la red de factores de transcripción hepáticos <sup>67</sup>. Teniendo en cuenta que entre las dianas directas de HNF4 $\alpha$  se encuentran genes relacionados con el ciclo celular <sup>68</sup>, la disminución de este factor permite la activación de genes de respuesta al estrés y de genes involucrados en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*) y en la proliferación celular, favoreciendo así una rápida respuesta regenerativa del parénquima hepático <sup>67,69-71</sup>. La recuperación de los niveles basales de los factores de transcripción hepáticos es esencial para la inhibición de la proliferación de los hepatocitos y la readquisición del fenotipo diferenciado completo y, por tanto, de las funciones normales del órgano <sup>67</sup>.

Cuando el daño recibido es persistente, por ejemplo, debido a una infección viral crónica, a un consumo de alcohol periódico o a trastornos metabólicos como la obesidad, el hígado presenta un microambiente de inflamación crónica con muerte de los hepatocitos, generación de estrés oxidativo <sup>72,73</sup>, función mitocondrial impedida <sup>74,75</sup> y una capacidad proliferativa de los hepatocitos agotada <sup>4,64,76,77</sup>. Ante estas condiciones, se ha establecido que podría activarse una respuesta regenerativa alternativa proveniente de la diferenciación de nuevos hepatocitos a partir de las células progenitoras hepáticas <sup>42,65,78-81</sup>. Sin embargo, es característico que debido a la pérdida progresiva de hepatocitos la activación sostenida de las células estrelladas <sup>82</sup> provoque una excesiva deposición de matriz extracelular que sustituye al parénquima perdido, favoreciendo el desarrollo de fibrosis e interrumpiendo la arquitectura normal del órgano y la correcta perfusión sanguínea <sup>79,83,84</sup>. Esta lesión puede evolucionar hacia estadios más graves y avanzados como la cirrosis, con nódulos de regeneración rodeados de fibra y arquitectura hepática distorsionada <sup>85</sup>, o incluso al desarrollo de un HCC <sup>86</sup>. Es importante

señalar que la reducción del parénquima funcional a causa de las lesiones agudas o crónicas se asocia con un deterioro o pérdida de las funciones hepáticas normales responsable de las manifestaciones patológicas o sintomatológicas<sup>30,31</sup>. Sin embargo, como se va a comentar a continuación, la muerte de los hepatocitos no es la única causa.

### 3.2. Desdiferenciación hepática

La pérdida y el deterioro progresivo de las funciones hepáticas durante el daño agudo y la progresión de la enfermedad crónica es debida en gran parte a la muerte de los hepatocitos y a la sustitución del parénquima por tejido fibroso<sup>87,88</sup>. Sin embargo, la evidencia de los últimos años sugiere que la insuficiencia hepática no solo se debe a la pérdida del parénquima, sino a la desdiferenciación de los hepatocitos remanentes en un contexto de perfusión sanguínea impedida, hipoxia, inflamación, estrés oxidativo y señales mitogénicas inducidas<sup>4,87,89,90</sup>. En este sentido, nuestro grupo ya describió que en el hígado de pacientes con cirrosis se produce una reducción significativa en la expresión de genes metabólicos relacionados con el ciclo de la metionina y la homocisteína, y que esa disminución correlacionaba con el grado de severidad del daño<sup>91</sup>. Además, la disminución en la expresión de la enzima metionina adenosiltransferasa 1A (MAT1A, *methionine adenosyltransferase 1A*), una proteína hepato-específica responsable de la síntesis de S-adenosilmetionina, se acompañaba de la hipermetilación de su promotor<sup>91,92</sup>. Así mismo, en el hígado cirrótico se inducía la expresión de factores de transcripción propios del hígado fetal como el factor del supresor del tumor de Wilms 1 (WT1, *Wilms' tumor 1 suppressor*) que inhibían la expresión de HNF4 $\alpha$ <sup>93</sup>. Desde entonces, numerosos estudios experimentales y clínicos han confirmado la pérdida de la identidad y función hepatocelular durante el transcurso de la enfermedad hepática<sup>77,94,103,95-102</sup>. Sin embargo, así como la disminución transitoria en la expresión de HNF4 $\alpha$  ante un daño agudo puede resultar beneficiosa para inducir la regeneración del hígado<sup>67</sup>, la represión mantenida de la expresión de HNF4 $\alpha$  y el colapso durante la enfermedad crónica de la red de factores de transcripción hepáticos como FOXA2, LRH1, C/EBP $\alpha$  o HNF1 $\alpha$  perpetúa un estado de desdiferenciación y proliferación descontrolada del hígado, comprometiendo la función hepática<sup>67,96,97,104-107</sup>. La principal causa de ello es la pérdida de expresión de genes hepato-específicos por parte de un alto número de hepatocitos<sup>97,104,108-110</sup>.

Además, la pérdida de expresión de genes hepato-específicos durante el transcurso de la enfermedad hepática se acompaña de la reactivación de isoformas fetales u oncogénicas como la AFP, glipican-3, H19, la subunidad reguladora del proteasoma Gankirina, las enzimas

metionina adenosiltransferasa 2A (MAT2A, *methionine adenosyltransferase 1A*), HK2 y PKM2, o el factor de transcripción WT1<sup>33,57,116,117,91,96,98,111-115</sup>, contribuyendo así a la pérdida de funciones metabólicas fundamentales y al desarrollo de procesos carcinogénicos<sup>111,118,119</sup>. Cabe resaltar que la detección de estos genes puede tener un gran valor en el diagnóstico temprano de procesos neoplásicos<sup>120</sup>. Por ejemplo, en un estudio reciente en pacientes con enfermedad hepática crónica, se han detectado niveles elevados en suero de AFP más de diez años antes de la detección del HCC<sup>121</sup>.

Por otra parte, como ya se ha mencionado, preservar el correcto *splicing* del mRNA es esencial para mantener la homeostasis hepatocelular. En este sentido, se han descrito alteraciones en el *splicing* de diferentes genes durante la hepatitis crónica, la cirrosis y el HCC<sup>51,122</sup>. Además, se ha descrito la alteración en la expresión de algunos factores de *splicing* durante la enfermedad hepática, como la disminución de *ESRP2* en el HCC<sup>123</sup>, o la reducción significativa en la expresión de *SLU7* en el hígado de pacientes con cirrosis o con HCC descrita por nuestro grupo<sup>124</sup>. Como se explica más adelante en el apartado 5 de la Introducción, dado el importante papel de *SLU7* en el control del transcriptoma hepático, su disminución durante el daño podría contribuir a la desdiferenciación y la progresión de la enfermedad. Además, nuestro grupo también describió que el factor de *splicing* *SRSF3* no solo disminuye en la cirrosis y el HCC<sup>55</sup>, sino que por una alteración en su *splicing* alternativo se favorece la inducción de isoformas aberrantes (*SRSF3-ISO2*) con potencial oncogénico<sup>56</sup>. En el contexto de una enfermedad hepática crónica, los ratones delecionados para *Srsf3* en el hígado desarrollan tumores espontáneamente<sup>125</sup>.

Todo ello evidencia la existencia de una reprogramación activa del transcriptoma hepatocelular durante el daño hepático crónico que conduce a la pérdida de la identidad de los hepatocitos. Consecuentemente, esta pérdida puede estar relacionada con el deterioro de la función hepática y la progresión de la enfermedad, como se refleja en la puntuación de Child-Pugh, sistema de clasificación empleado para evaluar el pronóstico de una enfermedad hepática crónica de acuerdo a la función hepática<sup>126</sup>. Además, el mantenimiento de un fenotipo hepático desdiferenciado y proliferante a consecuencia de la disminución persistente, por ejemplo, de la expresión de *HNF4α*, la generación de un ambiente genotóxico por la continua acumulación de estrés oxidativo que induce daño sobre el DNA y la reactivación de isoformas fetales, se ha relacionado con un ambiente favorable para la aparición y acumulación de mutaciones y el desarrollo de HCC<sup>4,65,121,127</sup>.



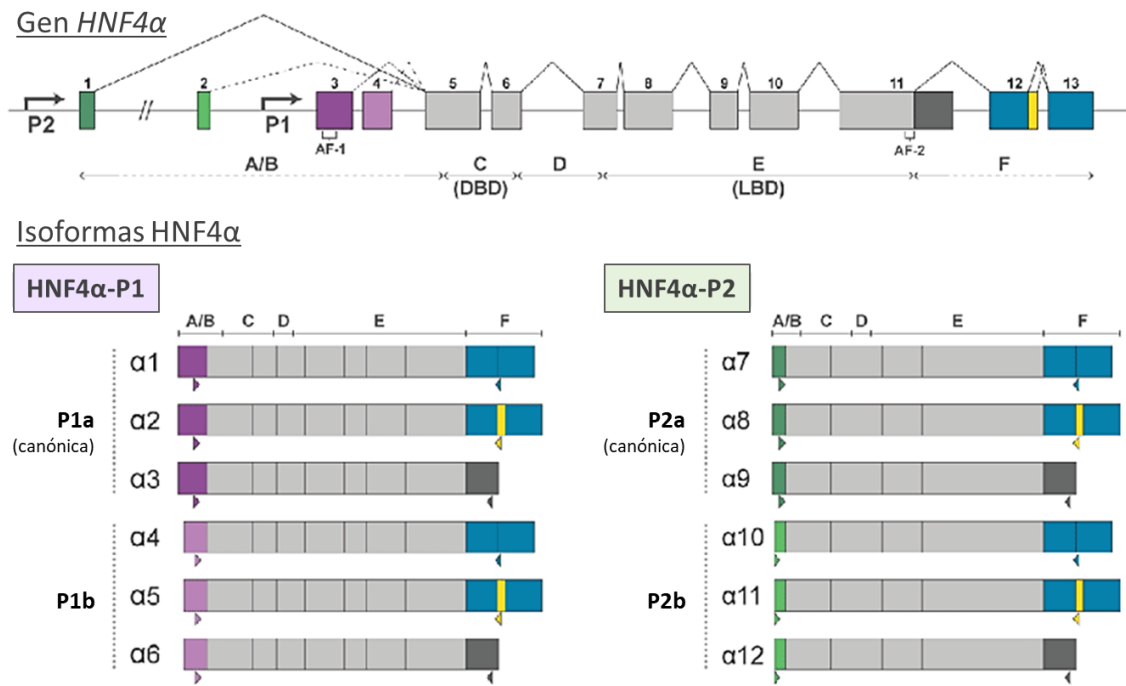
Actualmente, los mecanismos moleculares que promueven la pérdida de la diferenciación y función hepatocelular todavía no se conocen con precisión, y este conocimiento es necesario para poder desarrollar estrategias terapéuticas efectivas que frenen o reviertan la progresión de la enfermedad hepática crónica.

#### 4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FACTOR NUCLEAR DE HEPATOCITO 4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ )

El factor de transcripción HNF4 $\alpha$  es el miembro mejor caracterizado de la familia de los factores nucleares del hepatocito (HNF) <sup>40</sup>, y pertenece a la familia de receptores nucleares <sup>128</sup>. Su expresión es principalmente hepática, y participa activamente en el establecimiento del fenotipo diferenciado de los hepatocitos desde el desarrollo embrionario <sup>129-131</sup>, siendo uno de los factores de transcripción más relevantes de la identidad hepática <sup>38</sup>.

La transcripción de *HNF4 $\alpha$*  está regulada desde dos promotores activos en función del estado de maduración de la célula, el promotor proximal P1 y el distal P2. El uso diferencial de estos promotores, junto con la participación del *splicing* alternativo en el extremo C-terminal, puede generar hasta doce isoformas diferentes, seis isoformas derivadas del promotor P1 que incluyen el exón 1A ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ) y seis isoformas derivadas del promotor P2 que incluyen el exón 1D ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha 12$ ) <sup>67,132-134</sup> (Figura 4). Las isoformas derivadas de P2 son más eficientes en la activación de genes necesarios durante el estadio fetal, como por ejemplo la AFP <sup>135</sup>. Sin embargo, en los estadios posteriores al nacimiento y en el hígado adulto, la expresión se produce desde el promotor P1, ejerciendo su actividad principalmente sobre la transcripción de genes que codifican para la diferenciación hepática <sup>97,135-138</sup>.

La proteína HNF4 $\alpha$  contiene dos dominios de función de transactivación, el dominio AF-1 localizado en el extremo N-terminal y el dominio AF-2 localizado en el extremo C-terminal. Además, contiene un dominio F con actividad represora y dos dominios que le permiten unirse al DNA, el dominio de unión de ligando (LBD, *ligand binding domain*) y el dominio de unión al DNA (DBD, *DNA binding domain*) <sup>139</sup> (Figura 4). La principal y relevante diferencia entre las isoformas derivadas de los dos promotores es que aquellas expresadas desde P2 carecen del dominio de activación AF-1, lo que le confiere menor actividad transactivadora sobre otros reguladores transcripcionales <sup>138-144</sup>. La activación de la transcripción génica se produce al unirse HNF4 $\alpha$  a los promotores de sus dianas y reclutar a los co-activadores necesarios <sup>68,145</sup>. Además, las isoformas derivadas de P1 y no las de P2 pueden también reclutar co-represores al promotor para reprimir la expresión de sus genes diana <sup>142</sup>.



**FIGURA 4. Estructura e isoformas de *HNF4α*.** Representación esquemática de la estructura del gen *HNF4α* indicando los dos promotores P1 y P2, así como las regiones que codifican para los dominios de transactivación AF-1 y AF-2. Abajo, representación de las 12 isoformas que pueden generarse mediante el diferente uso de los promotores P1 o P2 y por *splicing* alternativo del extremo C-terminal. Adaptado de Lambert y cols. *Mol Cell Proteomics* (2020) <sup>132</sup>.

Se ha descrito que la expresión de *HNF4α* puede modularse por diferentes mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. En primer lugar, la expresión de *HNF4α* se encuentra estrechamente controlada por diferentes factores de transcripción. En el hígado embrionario, la expresión y acumulación de *HNF4α* en los hepatoblastos se induce por acción de los factores *FOXA2*, *GATA4* y *HNF1β* <sup>4,5,146</sup>, y durante la diferenciación de los hepatoblastos hacia hepatocitos la expresión génica de *HNF4α* está controlada por los factores *HNF1β* y *HNF6* <sup>146</sup>. En el hígado adulto, la sinergia entre *FOXA2* y *HNF6* conduce a la expresión de *HNF4α1*, las isoformas de *HNF4α* derivadas del promotor P1 que son mayoritarias en los hepatocitos adultos <sup>133</sup>. Muchos de los factores de transcripción que activan la expresión de *HNF4α* actúan en varios estadios del desarrollo, por lo que es difícil explicar el cambio en el uso del promotor desde P2 hacia P1 después del nacimiento. Por ello, este cambio podría mediarse por un mecanismo de autorregulación. En consistencia, los factores *HNF6* y *HNF1α/β* activan la expresión de la isoforma *HNF4α7* durante el desarrollo, que es derivada del promotor P2 <sup>47</sup>, mientras que, en el hígado adulto, esta isoforma es reprimida por *HNF4α1* <sup>139,147</sup> que además activa la expresión desde P1 <sup>38</sup>.

Por otra parte, la actividad de HNF4 $\alpha$  está regulada por modificaciones post-traduccionales que pueden incidir de distinta manera sobre su actividad <sup>139,148</sup>. Entre ellas, la metilación de la proteína HNF4 $\alpha$  por la proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1, *protein arginine methyltransferase 1*) favorece la afinidad por su sitio de unión <sup>149,150</sup>. La acetilación de HNF4 $\alpha$  mediada por la proteína de unión a CREB (CBP, *CREB binding protein*) resulta esencial para mantener su localización nuclear <sup>150,151</sup>. También se ha propuesto que la SUMOilación de HNF4 $\alpha$  regula la estabilidad de la proteína y su actividad transcripcional <sup>152</sup>. Finalmente, la fosforilación es la modificación que más veces puede repetirse, puesto que en la estructura proteica de HNF4 $\alpha$  hay varios sitios susceptibles de fosforilación. Se ha descrito la implicación de diferentes cascadas con efectos variables sobre la actividad o estabilidad de HNF4 $\alpha$ . De este modo, la fosforilación por la proteína quinasa C (PKC, *protein kinase B*) <sup>153</sup>, la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*) <sup>154</sup>, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) <sup>155</sup> o la quinasa ERK1/2 activada por mitógenos (ERK1/2 MAPK, *ERK1/2 mitogen-activated protein kinase*) <sup>156</sup> conducen a la disminución de la actividad de HNF4 $\alpha$  y a una inhibición en la expresión de sus dianas. Es importante mencionar que las fosforilaciones por la tirosina quinasa c-SRC (*SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*) y por PKC conducen a la disminución de la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ . En el caso de c-SRC, la fosforilación sobre un residuo de tirosina localizado en el dominio AF-1, conduce a la degradación específica de proteínas HNF4 $\alpha$  derivadas del promotor P1 a través del proteasoma <sup>157</sup>. También la fosforilación por PKC en la serina S78 conduce a la deslocalización citoplasmática de HNF4 $\alpha$  y su consecuente degradación por el proteasoma <sup>128,153</sup>. El efecto de la fosforilación por otras proteínas como la quinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK, *p38 mitogen-activated protein kinase*) no está consensuado, ya que algunos trabajos indican el aumento en la actividad <sup>158,159</sup> mientras que otros sugieren un papel inhibitorio <sup>160</sup>.

#### 4.1. Papel de HNF4 $\alpha$ en la fisiología hepática

El factor HNF4 $\alpha$  es imprescindible para la expresión y función hepato-específica en todos los estadios del desarrollo hepático. Así, HNF4 $\alpha$  controla, de manera constitutiva, la expresión de numerosos genes hepato-específicos involucrados en funciones diversas como el metabolismo de lípidos, glúcidos y xenobióticos, la síntesis de ácidos biliares y de factores de la coagulación sanguínea <sup>128,129,161,162</sup>, el mantenimiento epitelial y la morfogénesis <sup>163,164</sup> o el mantenimiento de la diferenciación de los hepatocitos <sup>67,131,165</sup>.

La caracterización de su papel en la fisiología hepática se ha establecido mediante el uso de modelos de experimentación en roedores o en cultivos de células hepáticas delecionados para *HNF4α* durante las diferentes fases de la organogénesis del hígado <sup>67,129–131,163,164,166</sup>, aunque debido a su papel crítico en el desarrollo, ha sido difícil estudiar el rol de *HNF4α* en los ratones adultos.

Durante el desarrollo embrionario, *HNF4α* resulta esencial para la supervivencia de los embriones, de forma que su falta promueve la muerte prematura <sup>49</sup>. En el hígado embrionario, la deleción dirigida de *HNF4α* resulta en la disminución de factores de transcripción claves para la diferenciación hepática, como por ejemplo *HNF1α*, *HNF1β*, *HNF3β*, *HNF6* o *LRH-1* <sup>38</sup>. Además, entre sus dianas se encuentran numerosos genes que codifican para proteínas de uniones intercelulares y de adhesión celular <sup>163,164</sup>. Como consecuencia de su falta, se produce una disrupción de la arquitectura hepática <sup>163</sup> y de las funciones metabólicas características del hígado como son la gluconeogénesis o la síntesis de glucógeno <sup>45,164</sup>. Sin embargo, la falta de *HNF4α* durante este estadio no afecta a la proliferación celular <sup>164</sup>. De este modo, *HNF4α* es un regulador esencial en la transformación epitelial del hígado fetal, controlando el establecimiento de la arquitectura hepática normal, incluyendo la organización del endotelio sinusoidal <sup>163,164,167</sup>, y controlando la correcta expresión del programa del transcriptoma hepatocelular <sup>49,67,131,164</sup>, todos ellos eventos esenciales para el inicio de la función del órgano <sup>163</sup>.

Durante la maduración y el mantenimiento del fenotipo adulto, la expresión de *HNF4α* es necesaria para mantener tanto la estructura del parénquima hepático como para la homeostasis metabólica hepática <sup>67</sup>. Entre las dianas de *HNF4α* se encuentran factores de transcripción que también tienen relevancia en la función hepática como *HNF1α* <sup>38,49,161,168–171</sup>, y genes implicados en el metabolismo de la glucosa, los lípidos, los aminoácidos y los xenobióticos <sup>128,172,173</sup>. Concretamente, *HNF4α* regula la expresión directa de enzimas del metabolismo del colesterol y los ácidos grasos <sup>129</sup>, transportadores y enzimas de síntesis y conjugación de ácidos biliares <sup>174</sup>, o de enzimas de la gluconeogénesis y glucogenogénesis como la *GYS2* <sup>175</sup>. En consecuencia, la deleción específica de *HNF4α* en el hígado induce un fenotipo caracterizado por hepatomegalia, una deposición anormal de glucógeno y de lípidos (esteatosis) en el hígado, una reducción en los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre y un incremento de ácidos biliares <sup>128–130,176</sup>.

HNF4 $\alpha$  es también un importante regulador de la expresión de genes hepato-específicos implicados en el metabolismo y la eliminación de xenobióticos del organismo como algunos miembros del CYP450, por ejemplo, *CYP3A4*, uno de los más importantes en el metabolismo de fármacos, aunque no regula a *CYP2E1*<sup>8</sup>. También regula un alto número de enzimas de Fase II de la familia de las *SULT* y de las *UGT*, y de transportadores implicados en la eliminación de xenobióticos<sup>8,128,177</sup>. Así mismo, controla la expresión de genes que codifican para factores de coagulación y para proteínas plasmáticas como las apolipoproteínas, la transferrina<sup>162</sup>, la TTR<sup>178</sup> o la ALB<sup>179</sup>, y regula la expresión de dianas implicadas en funciones diversas como la apoptosis, la respuesta inmune, procesos de reparación del DNA o la respuesta al estrés, incluyendo la enzima superóxido dismutasa 2 (*SOD2*, *superoxide dismutase 2*)<sup>68</sup>. En relación con este último punto, la falta de HNF4 $\alpha$ , tanto en un modelo de células madre embrionarias humanas diferenciadas hacia hepatocitos<sup>152</sup> como en células epiteliales intestinales<sup>180</sup>, induce estrés oxidativo.

Por otra parte, HNF4 $\alpha$  controla directamente la expresión de genes relacionados con el ciclo celular<sup>68</sup> y la proliferación celular, inhibiendo su expresión<sup>166,181,182</sup>. En consecuencia, su falta altera la quiescencia de los hepatocitos y resulta en un incremento en la expresión de genes implicados en la proliferación celular, como el oncogén de mielocitomatosis (*c-Myc*, *Myelocytomatosis oncogene*), la Ciclina D1 o la vía de la  $\beta$ -catenina<sup>166,182,183</sup>. En relación con ello, la delección de *Hnf4 $\alpha$*  en ratones tratados con dietilnitrosamina (DEN, *diethylnitrosamine*) exacerba la aparición de tumores hepáticos<sup>183</sup>. Por ello, se ha postulado que HNF4 $\alpha$  podría actuar como un gen supresor de tumores<sup>143,184</sup>. La regulación de estos genes es relevante durante los procesos de regeneración hepática ya que la disminución transitoria de HNF4 $\alpha$  permite la proliferación de los hepatocitos para recuperar el parénquima perdido<sup>67</sup>. Además, HNF4 $\alpha$  es necesario para mantener el fenotipo polarizado del hepatocito y para reprimir el programa mesenquimal, ya que entre sus dianas se encuentran reguladores clave de la transición epitelio-mesénquima y genes mesenquimales a los que inhibe su transcripción<sup>129-131,166,182</sup>.

De este modo, HNF4 $\alpha$  es un factor clave en la identidad hepática y, de hecho, ha sido identificado como uno de los pocos factores de transcripción capaces de promover la reprogramación celular *in vitro* hacia hepatocitos<sup>185,186</sup>. El control de todas estas funciones lo ejerce en colaboración con otros factores de transcripción hepáticos clave, dado que existe una regulación recíproca entre ellos<sup>67</sup>.

La variabilidad de funciones regulatorias que controla HNF4 $\alpha$  a lo largo del desarrollo podrían explicarse por el uso alternativo de los promotores. En este sentido, los ratones que solo emplean el promotor P2 presentan diferencias en el metabolismo lipídico con respecto a los ratones que utilizan P1 <sup>138</sup>. También se ha relacionado la inducción de isoformas desde P2 en sujetos humanos con el desarrollo de resistencia a la insulina <sup>187</sup> y, en ratones, su expresión mantenida contribuye al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 <sup>188</sup>.

#### **4.2. Desregulación de HNF4 $\alpha$ en la patología hepática**

Como se ha señalado más arriba, el progreso de la enfermedad hepática está mediado, en parte, por la desdiferenciación hepatocelular, proceso caracterizado por la pérdida de expresión génica hepato-específica. En este sentido, numerosos estudios describen el impedimento en la expresión HNF4 $\alpha$  y de su actividad regulatoria durante la enfermedad hepática crónica, incluyendo la hepatitis alcohólica <sup>98,189</sup>, la esteatohepatitis no alcohólica <sup>190</sup>, la cirrosis <sup>93,96,97,104,191,192</sup> o el HCC <sup>191,193</sup>, así como en el fallo hepático agudo <sup>94,104,192,194</sup>. Es importante señalar que se ha establecido una correlación directa entre el grado de disminución en la expresión de HNF4 $\alpha$  y el grado de disfunción hepática <sup>97</sup>. Así, en el progreso del HCC, la pérdida de la expresión de este factor constituye un marcador determinante que contribuye al desarrollo de un fenotipo tumoral agresivo, caracterizado por la desdiferenciación hepática, el aumento en la tasa de proliferación tumoral o el aumento en la expresión de genes fetales y/o tumorales como la *AFP* <sup>105,195,196</sup>.

Resulta relevante que, algunos estudios tanto en modelos animales de HCC inducido <sup>197</sup> como en muestras de pacientes con hepatitis alcohólica <sup>98</sup> o con HCC <sup>143,198,199</sup>, demuestran que la reducción de la expresión de HNF4 $\alpha$  se acompaña de un cambio en el uso de su promotor, inhibiendo la expresión desde el promotor P1 y favoreciendo la expresión desde el P2. Un aumento en la expresión de variantes de P2 puede tener importantes consecuencias funcionales, ya que, como se ha indicado más arriba, exhiben diferencias significativas con respecto a las variantes de P1 en cuanto a su especificidad y potencia en impulsar la expresión génica <sup>135,138,200</sup>. De hecho, el aumento de las isoformas de P2 se correlaciona con un peor pronóstico del HCC, favoreciendo la desdiferenciación, la invasión celular y disminuyendo la supervivencia <sup>199</sup>.

Aunque los mecanismos de regulación que llevan a la disminución de la expresión de HNF4 $\alpha$  en el daño hepático todavía no se conocen con precisión, diferentes modelos *in vitro* e

*in vivo* han ayudado a entender su papel central en la hepatoprotección. A nivel transcripcional, la represión de *HNF4α* podría estar mediada por la activación de TGFβ a través de la inducción del factor de transcripción WT1, un gen de expresión fetal que se reactiva en la enfermedad hepática y promueve la desdiferenciación hepatocelular <sup>111</sup>, y cuya inducción en pacientes con cirrosis correlaciona inversamente con los niveles de *HNF4α* <sup>93</sup>. Otros estudios *in vitro* describen que la disminución de la expresión de *HNF4α* podría estar mediada por la activación de la señalización de la MAPK <sup>201</sup>, que frecuentemente se activa en el HCC <sup>202</sup>, o por las señales extrínsecas asociadas al daño hepático como citoquinas, factores de crecimiento o el incremento en la rigidez de la matriz extracelular <sup>165</sup>. Además, en condiciones de estrés celular, la inducción de la proteína supresora de tumores 53 (TP53, *tumor suppressor protein 53*) puede interferir en la transcripción de *HNF4α* derivada del promotor P1 en células humanas de HCC <sup>203</sup>.

Por otra parte, el hecho de que algunos estudios hayan descrito que la desregulación en la expresión de *HNF4α* durante la enfermedad hepática afecta mayoritariamente a nivel de proteína, sin apenas afectar los niveles del mRNA <sup>97,193</sup>, sugiere la existencia de mecanismos post-transcripcionales que afecten a la regulación de *HNF4α*. En este sentido, se ha descrito que pacientes con cirrosis avanzada presentan una deslocalización de *HNF4α* al citoplasma de los hepatocitos <sup>204</sup> que puede estar asociada a su fosforilación <sup>153</sup> o su acetilación <sup>151</sup>. En un estudio en ratones <sup>205</sup>, el estrés oxidativo asociado a la enfermedad del hígado graso promueve la traslocación de *HNF4α* al citoplasma a través de su fosforilación por PKC y, consecuentemente, la pérdida de actividad de *HNF4α* induce esteatosis en estos ratones. Otro mecanismo diferente propuesto implica la participación de la oncoproteína Gankirina, cuya expresión se induce en las hepatitis crónicas y en la cirrosis, como mediador de la degradación de *HNF4α* a través del proteasoma en células de HCC sin afectar a sus niveles de mRNA <sup>102</sup>. De acuerdo con ello, la expresión de *Gankirina* y de *HNF4α* correlacionan inversamente en muestras humanas de HCC <sup>102</sup>. También en muestras de pacientes con HCC se ha descrito una fuerte correlación negativa, dependiente del grado de progresión tumoral, entre la disminución de la expresión de *HNF4α* y el aumento de la expresión de la proteína asociada a Yes 1 (YAP1, *Yes1 associated transcriptional regulator*), una proteína implicada en la cascada de señalización Hippo/YAP que controla la proliferación y diferenciación celular <sup>193</sup>. Mecánicamente, la inducción de YAP1 mediaría la degradación de *HNF4α* a través del proteasoma <sup>193</sup>. Finalmente, en un estudio reciente en células humanas hepáticas, la activación del receptor EGFR disminuye los niveles de proteína *HNF4α1*, potenciando el efecto de TGFβ

que a su vez estimula la expresión de isoformas de *HNF4α* derivadas de P2 a través de la señalización de c-SRC <sup>98</sup>.

Dado el estrecho control que *HNF4α* tiene sobre la regulación de genes hepato-específicos y el consecuente desarrollo de la función hepática, la pérdida de su expresión durante la enfermedad hepática tiene importantes consecuencias. En un primer momento, ante un daño agudo o inflamatorio, la respuesta natural del hígado pasa por reprimir transitoriamente la expresión de genes implicados en la diferenciación y quiescencia de los hepatocitos, como es el caso de *HNF4α*, para permitir la activación de genes involucrados en el control del estrés y en el ciclo celular, promoviendo así una rápida respuesta regenerativa del parénquima hepático <sup>67,69-71</sup>. Sin embargo, ante un daño persistente, la imposibilidad de recuperar la expresión normal de *HNF4α* disminuye significativamente la expresión de sus genes diana hepato-específicos. Así, por ejemplo, en modelos animales de cirrosis descompensada, la expresión de genes como la *Afp*, la *Ttr*, las apolipoproteínas o algunas isoformas del CYP450, se ve drásticamente disminuida <sup>96</sup>. También en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, la reducción hepática de *HNF4α* se acompaña de una disminución significativa en la expresión de genes diana implicados en la diferenciación hepática (como *HNF1α*), en el metabolismo de xenobióticos, lípidos o ácidos biliares, o en la coagulación sanguínea, entre otros <sup>190</sup>. En pacientes con cirrosis clasificados por el grado de disfunción hepática según el índice Child-Pugh, la disminución en la expresión de *HNF4α* se ha asociado con una menor expresión de genes hepato-específicos implicados en la secreción de proteínas, en la producción de aminoácidos y en el metabolismo de xenobióticos <sup>97</sup>. Así mismo, y a consecuencia del detrimento del fenotipo hepático, la disminución de la expresión de *HNF4α* correlaciona con el grado de pérdida de función hepática en cada estadio de la enfermedad <sup>67,96,97,191,204</sup>.

En conjunto, la pérdida de expresión del factor de transcripción *HNF4α* durante la enfermedad hepática juega un papel muy relevante en la desdiferenciación progresiva del parénquima hepático y en el deterioro asociado de la función hepática que ocurre a lo largo de la progresión de la enfermedad.

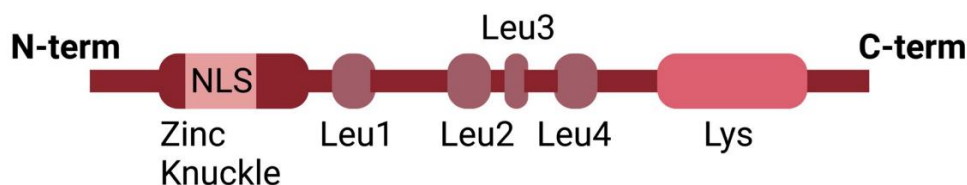


## 5. EL FACTOR DE *SPLICING* SLU7

El factor de *splicing* SLU7, que originalmente se describió en levaduras, se ha definido como un componente del espliceosoma necesario para completar la segunda reacción de transesterificación del *splicing* del mRNA<sup>206–210</sup>. Durante los últimos años nuestro grupo ha demostrado que el papel de SLU7 se expande más allá del *splicing*, situándolo como un eje integrador de la regulación de la expresión génica a diferentes niveles, incluyendo la remodelación epigenética del DNA, la modulación de la transcripción y la estabilidad de proteínas, y ha caracterizado su papel en la fisiopatología hepática, evidenciando su participación en el mantenimiento de la diferenciación y función hepatocelular<sup>55,56,211,212</sup>. Todos estos resultados están recogidos en el artículo de revisión enviado a la revista *International Journal of Molecular Sciences*<sup>213</sup>.

El gen *SLU7* en humanos se encuentra en el cromosoma 5 y, según se ha descrito, se pueden generar diferentes transcritos de mRNA, aunque a día de hoy solo se ha caracterizado el papel biológico del transcrito canónico. Este transcrito está compuesto por 3480 pares de bases y contiene 16 exones, 15 de ellos codificantes para una proteína de 586 aminoácidos, y un tamaño molecular aproximado de 75 kDa<sup>214</sup>. La estructura de la proteína está constituida por cuatro dominios principales: una señal de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*), un dominio de zinc (*zinc-knuckle*), cuatro dominios ricos en leucina y una región rica en lisinas<sup>214</sup> (Figura 5). La presencia de estos dominios se encuentra estrechamente relacionada con la localización subcelular y la función de SLU7 como regulador del *splicing*. Así, los dominios NLS y *zinc-knuckle*, localizados en el extremo N-terminal, forman una estructura funcional única que retiene a SLU7 dentro del núcleo de la célula y previene su traslocación al citoplasma<sup>214</sup>. En cambio, los cuatro dominios de leucina pueden favorecer la traslocación de SLU7 al citoplasma a través de la vía de mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1, *chromosomal region maintenance 1*). Finalmente, el dominio rico en lisina, ubicado en el extremo C-terminal, permite la interacción de SLU7 con ácidos nucleicos y otras proteínas<sup>214</sup>. Estudios realizados con microscopía crioelectrónica revelaron que dos amplios segmentos de SLU7, los residuos 62-196 y 265-371, permiten la interacción de SLU7 con dos componentes del espliceosoma: el factor 8 de procesamiento del pre-mRNA (PRP8, *pre-mRNA processing factor 8*) y la proteína CWC22 asociada al *splicing* (*CWC22 spliceosome associated protein homolog*)<sup>215</sup>. Además, la presencia de tres regiones ricas en residuos básicos (Arginina y Lisina) le permiten participar en la correcta selección del sitio de *splicing* 3' del intrón durante la segunda reacción catalítica del proceso de *splicing*<sup>215</sup>. Por último, se ha descrito que la

estructura proteica de SLU7 presenta sitios susceptibles de modificaciones post-transcripcionales como fosforilación, acetilación, SUMOilación y ubiquitinación <sup>150</sup>, aunque todavía no se ha caracterizado su implicación biológica.



**FIGURA 5. Estructura de la proteína SLU7 en humanos.** Representación esquemática de la proteína SLU7 que incluye sus cuatro dominios funcionales: una señal de localización nuclear (NLS), un dominio de zinc (*zinc-knuckle*), cuatro dominios ricos en leucina (*Leu 1-4*) y una región rica en lisinas (*Lys*). Adaptado de Shomron N y cols. *Mol Biol Cell* (2004) <sup>214</sup>.

De manera fisiológica, SLU7 se localiza principalmente en el núcleo <sup>214</sup>. Sin embargo, bajo condiciones de estrés celular, SLU7 puede traslocarse al citoplasma <sup>216,217</sup>. Concretamente, estímulos *in vitro* como la radiación ultravioleta C o el estrés por calor activan la señalización de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK, *c-jun N-terminal kinase*) que permite la traslocación de SLU7 al citoplasma, interfiriendo así sobre las funciones que normalmente desarrolla dentro del núcleo <sup>216</sup>. Otros tipos de estrés como el inducido por taspigargina promueve no solo la traslocación de SLU7 al citoplasma, sino que favorece su distribución en vesículas que recuerdan a los gránulos de estrés <sup>217</sup>.

SLU7 se expresa de forma generalizada en todos los tejidos humanos. A pesar de que todavía no se conocen con precisión los mecanismos que regulan su expresión, se han descrito algunos factores implicados. En primer lugar, la expresión de SLU7 está condicionada por el desarrollo embrionario. Así, mientras que la expresión de SLU7 es abundante en el corazón en desarrollo <sup>218</sup>, los niveles en el hígado de ratones no alcanzan su expresión máxima hasta la maduración de los hepatocitos <sup>55</sup>. En estos hígados adultos, la expresión de SLU7 está regulada por la alimentación, de manera que la activación de la señalización de la insulina tras una comida promueve la disminución de la expresión de SLU7 <sup>55</sup>.

A nivel transcripcional, la expresión de SLU7 está regulada por al menos dos factores de transcripción que se unen a su promotor y controlan la expresión génica de manera inversa y dosis dependiente. El factor de transcripción proteína específica 1 (SP-1, *specificity protein 1*) que reconoce elementos promotores ricos en GC y promueve la expresión de *SLU7*, y el factor de transcripción que reconoce sitios de unión ETS (ELK-1, *ETS-Like Gene 1*) que reconoce sitios

de unión Ets e inhibe la transcripción de *SLU7*<sup>218</sup>. De acuerdo con ello, nuestro grupo ha demostrado que la disminución en la expresión de *SLU7* detectada durante la enfermedad hepática crónica está mediada por la activación de la fosforilación de ELK-1 inducida por el factor de crecimiento AREG<sup>124</sup>.

Así mismo, durante la regeneración hepática, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de *SLU7* en el hígado se reduce transitoriamente para permitir la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular<sup>55</sup>, aunque la recuperación de su expresión es necesaria para progresar adecuadamente en la mitosis evitando la parada del ciclo celular y la inestabilidad genómica<sup>56</sup>.

### 5.1. Papel de *SLU7* en la fisiología hepática

Como se ha mencionado, el hígado participa en numerosas funciones para mantener la homeostasis sistémica y, para ello, es necesario que los hepatocitos mantengan la expresión de diferentes factores de transcripción o de factores de *splicing* que controlen correctamente la expresión génica hepato-específica. En este sentido, el factor de *splicing* *SLU7* juega un papel relevante en el mantenimiento de la diferenciación hepatocelular, la función metabólica y la quiescencia de los hepatocitos<sup>55</sup>.

Nuestro grupo ha demostrado que *SLU7* controla la correcta expresión de dos reguladores clave de la función y diferenciación hepáticas como son el factor de *splicing* *SRSF3* y el factor de transcripción *HNF4α*<sup>55,56</sup>. En cuanto a *SRSF3*, su expresión está controlada por *splicing* alternativo, de manera que pueden generarse dos isoformas, *SRSF3-ISO1*, cuya proteína es la responsable de su actividad biológica, o *SRSF3-ISO2*, un transcrito aberrante que incorpora un codón de terminación temprana y que en condiciones normales se degrada por el sistema de degradación de los mRNA sin sentido (NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*)<sup>219</sup>, pero que cuando se acumula codifica una proteína truncada con actividad dominante negativa sobre *SRSF3-ISO1*<sup>56</sup>. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de *Slu7* altera el *splicing* de *Srsf3*<sup>55</sup> y favorece la acumulación de las isoformas truncadas *SRSF3-ISO2*<sup>56</sup>. Con respecto a *HNF4α*, el silenciamiento de *Slu7* altera el correcto uso del promotor, inhibiendo la expresión desde P1 y favoreciendo la expresión desde P2, de las isoformas fetales<sup>55</sup>.

De acuerdo con ello, el silenciamiento de *Slu7* en modelos de experimentación promueve la pérdida de la expresión génica hepato-específica al disminuir la expresión de genes como

*Alb* o *Hnf1α*, así como de genes implicados en el metabolismo de los lípidos, del colesterol o de la glucosa, como las enzimas ácidos grasos sintasa (*Fasn*, *Fatty acid synthase*), *Srebp* o *Gys2*. Además, su falta también induce la expresión de marcadores oncofetales como *Afp*, *Mat2a* o *Wt1*, y de genes de respuesta al estrés como el factor de transcripción activador 3 (*Atf3*, *Activating transcription factor 3*) o *Tp53*<sup>55</sup>. Es importante señalar que, por una alteración en el *splicing* alterativo, el silenciamiento de *Slu7* promueve la reactivación de un patrón de expresión génica característico de los hepatocitos fetales o transformados, que incluye la inducción de isoformas como la *Hk2*, la *Pkm2* o la isoforma B del receptor de la insulina (*InsrB*, *Insulin receptor B*), en paralelo a la inhibición de las correspondientes isoenzimas adultas la *Gck*, la piruvato quinasa hepática (*Lpk*, *L-pyruvate kinase*) o la *InsrA*<sup>55</sup>.

Como se ha mencionado, nuestro grupo ha demostrado que SLU7 puede actuar regulando la expresión génica a otros niveles diferentes del *splicing*, como es la transcripción. Así, SLU7 se ha definido como un coactivador de la vía del cAMP regulando directamente la transcripción gluconeogénica mediada por la vía cAMP-CREB<sup>55</sup>. Concretamente, SLU7 es necesario para el correcto ensamblaje del complejo de transcripción que incluye a la enzima RNA Polimerasa II, al factor de transcripción P-CREB y al cofactor CBP, sobre los promotores de genes de respuesta al cAMP, como las enzimas PEPCCK y la subunidad catalítica de la G6PC, ambas implicadas en la gluconeogénesis, función fundamental hepática<sup>55</sup>.

Dada la participación de SLU7 en la correcta expresión de genes hepato-específicos, su falta compromete la función del órgano. En este sentido, el silenciamiento específico de *Slu7* en el hígado de ratones adultos promueve alteraciones en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, resultando por ejemplo en una reducción en el almacenamiento del glucógeno intrahepático y en resistencia a la insulina<sup>55</sup>. De acuerdo con su actividad transcripcional, la pérdida de expresión de SLU7 reduce la actividad gluconeogénica de los hepatocitos a la vez que favorece un cambio hacia un fenotipo glucolítico<sup>55</sup>, similar al encontrado en los hígados fetales o tumorales<sup>220,221</sup>.

Por otra parte, la reversión a un patrón de expresión génica fetal mediada por el silenciamiento de SLU7, promueve la inducción de genes relacionados con la proliferación y la entrada en el ciclo celular, que consecuentemente activan la proliferación de los hepatocitos e incrementan la masa hepática<sup>55</sup>. De hecho, tras una hepatectomía parcial, se induce una represión transitoria en la expresión de SLU7 que permite regenerar el parénquima<sup>55</sup>.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado un nuevo papel de SLU7 en la regulación de la expresión génica, en este caso a nivel epigenético. Concretamente, SLU7 asegura la estabilidad de la proteína DNA metiltransferasa 1 (DNMT1, *DNA methyltransferase 1*) y consecuentemente la integridad del complejo proteico formado por DNMT1, la proteína similar a la ubiquitina con dominios PHD y dedo anillo 1 (UHRF1, *ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*) y la histona eucromática lisina metiltransferasa 2 (G9a, *euchromatic histone lysine methyltransferase 2*), necesario para mantener la correcta metilación del DNA. De esta forma, la falta de SLU7 promovería también una metilación aberrante del DNA<sup>212</sup> que participaría en el desarrollo de la enfermedad.

En conjunto, nuestros datos hasta la fecha indican que SLU7 tiene un papel esencial en el mantenimiento de la fisiología hepática, asegurando la expresión génica característica de los hepatocitos adultos a nivel de la transcripción, del *splicing* y de la epigenética.

## 5.2. SLU7 en la patología hepática

Como describió nuestro grupo, la expresión del mRNA de *SLU7* se encuentra disminuida durante la enfermedad hepática crónica, tanto en el hígado de pacientes con cirrosis como en el HCC, o en el hígado sano que porta un HCC<sup>124</sup>. En cuanto al mecanismo, la reducción de *SLU7* puede estar mediada por la vía de señalización AREG-EGFR. La expresión del factor de crecimiento AREG se induce durante la enfermedad hepática en el hígado dañado en respuesta a señales inflamatorias<sup>222</sup>, y se une a su receptor EGFR, promoviendo la activación de las señalizaciones de JNK y ELK-1, que finalmente inhiben la expresión de *SLU7*<sup>124</sup>. De acuerdo con ello, también se ha descrito una disminución de la expresión intestinal de *SLU7* en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>223</sup>. Sin embargo, existe también un estudio que muestra la inducción de la expresión hepática de SLU7 en el hígado de pacientes con enfermedad hepática alcohólica<sup>224</sup>. Son necesarios más estudios para aclarar la regulación de la expresión de SLU7 en el hígado dañado.

Dado el papel que juega SLU7 en el mantenimiento de la identidad hepatocelular, es factible pensar que la disminución de su expresión durante la enfermedad hepática participe en la desdiferenciación y pérdida de función asociados a la progresión de la enfermedad. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que SLU7 podría desempeñar un importante papel en el proceso de hepatocarcinogénesis. Así, la reducción en la expresión de SLU7 favorece la reactivación de isoformas oncofetales y genes de proliferación<sup>55,212</sup>, induce la generación de

estrés oxidativo <sup>211</sup>, de inestabilidad genómica y de daño en el DNA <sup>56</sup> y promueve la hipometilación del DNA <sup>212</sup>, todo ello generando un microambiente favorable a la instauración de tumores.

Más concretamente, el silenciamiento de *SLU7* en líneas hepáticas o en el hígado de ratones adultos inhibe la expresión de genes característicos de los hepatocitos adultos e induce la de isoformas del hígado fetal como, por ejemplo, los marcadores oncofetales *H19* y *AFP*, o el factor de transcripción *WT1*. Además, por alteración del *splicing* alternativo, se favorece la formación de las isoformas fetales de las isoenzimas *CYP4F3A*, glutaminasa 2 (*GLS2*, *glutaminase 2*) o *INSRA* <sup>55</sup>. Cabe señalar que esta alteración en el *splicing* mediada por la falta de *SLU7* puede tener un papel directo en el desarrollo de la hepatocarcinogénesis. Así, la inducción de las isoenzimas metabólicas *PKM2* y *HK2* por el silenciamiento de *SLU7* <sup>55</sup> favorecen la glucólisis aeróbica, característica de las células fetales y transformadas <sup>220,221,225</sup> y se han implicado directamente con la transformación neoplásica <sup>226–229</sup>. En consistencia, se ha encontrado un aumento de la actividad glicolítica hepática en modelos experimentales de cirrosis y en pacientes en estadios incipientes de cirrosis, como respuesta adaptativa para preservar la homeostasis energética frente a la lesión hepática <sup>161</sup>. La pérdida de *SLU7* en los hepatocitos, mediada por la vía de señalización *AREG-EGFR*, está también implicada en la inducción de otros oncogenes. Así, promueve la producción de una variante aberrante con capacidad tumorigénica del supresor tumoral *TP73*, la isoforma ( $\Delta Ex2p73$ ), deficiente en el exón 2 por una alteración en el *splicing* alternativo <sup>124</sup>. La inducción de esta isoforma truncada, que se acumula en el hígado de pacientes con cirrosis y *HCC* <sup>124</sup>, puede actuar como dominante negativo tanto de *TP73* como de *TP53* <sup>230</sup>.

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que una disminución en la expresión de *SLU7* podría contribuir a la inestabilidad genómica. Por un lado, a la inestabilidad asociada a la transcripción (*TAGIN*, *transcription-associated genome instability*) mediante la formación de híbridos DNA-RNA (*R-loops*) <sup>56</sup>, y a la inducción de daño en el DNA por la generación de estrés oxidativo <sup>211</sup>. Por otro lado, debido a la inducción de defectos mitóticos asociados a alteraciones en la cohesión de las cromátidas hermanas durante la formación de la placa mitótica <sup>56</sup>. Concretamente, hemos demostrado que la falta de *SLU7* se asocia con una alteración en la regulación del *splicing* alternativo y la expresión de los factores de *splicing* *SRSF1*, que previene la formación de *R-loops*, y *SRSF3*, que controla el correcto *splicing* de la *Sororina*, una proteína esencial para asegurar la cohesión de las cromátidas hermanas y la correcta distribución de los cromosomas durante la mitosis <sup>56</sup>.

Además de las alteraciones del *splicing*, las alteraciones en la metilación del DNA juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer. En concreto, la hipometilación global del DNA promueve el desarrollo de tumores, incluido el HCC <sup>231</sup>, por la activación de la expresión de oncogenes y la inducción de inestabilidad genómica <sup>232</sup>. En este sentido, como se ha mencionado, nuestro grupo ha demostrado recientemente un nuevo papel para SLU7 en el control del complejo proteico encargado del mantenimiento de la metilación del DNA <sup>212</sup>. De acuerdo con ello, la disminución de la expresión de SLU7 durante la enfermedad hepática crónica podría también contribuir a las alteraciones en la metilación del DNA asociada al proceso de hepatocarcinogénesis <sup>233</sup>.

Finalmente, es importante mencionar que, en base a todos estos resultados y al hecho de que SLU7 es necesario para el correcto *splicing* y expresión del cluster de microRNAs oncogénico miR17-92, que controla la expresión del gen supresor de tumor inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina (p21, *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) y del gen proapoptótico mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2 (BIM, *Bcl-2 interacting mediator of cell death*) <sup>211</sup>, SLU7 es un factor esencial para la supervivencia de una amplia variedad de células transformadas de diferente origen incluido el HCC <sup>211</sup>. De esta forma, el silenciamiento de la expresión de SLU7 en las células transformadas induce estrés oxidativo, autofagia, daño en el DNA <sup>211</sup>, inestabilidad cromosómica y estrés mitótico <sup>56</sup>, abocando a las células transformadas a la inducción de apoptosis <sup>211</sup> y sugiriendo que SLU7 puede representar una nueva diana terapéutica frente al cáncer.

En resumen, nuestros datos demuestran que SLU7 tiene un papel esencial en la fisiopatología hepática, controlando el patrón de expresión génica característico de los hepatocitos adultos, que asegura la diferenciación, quiescencia y función metabólica hepatocelular <sup>55</sup>. De esta forma, su desregulación durante la enfermedad hepática <sup>124</sup> puede participar en los procesos de dediferenciación y pérdida de función hepática que tienen lugar a lo largo de la enfermedad. Así mismo, dado el papel de SLU7 en el mantenimiento de la integridad del genoma, previniendo la acumulación de estrés oxidativo, *R-loops*, daño en el DNA y errores en la segregación de los cromosomas durante la división celular <sup>56</sup>, así como participando en el mantenimiento de la estabilidad de la proteína DNMT1 para asegurar el correcto funcionamiento del complejo de metilación del DNA <sup>212</sup>, la inhibición de su expresión puede participar en el proceso de la hepatocarcinogénesis. Sin embargo, la participación de SLU7 en todos estos procesos lo convierten también en un factor esencial para la supervivencia de las células transformadas <sup>211</sup>, por lo que, en ese contexto, el silenciamiento

dirigido de SLU7 a las células tumorales podría constituir una estrategia terapéutica anti-tumoral (Figura 5).

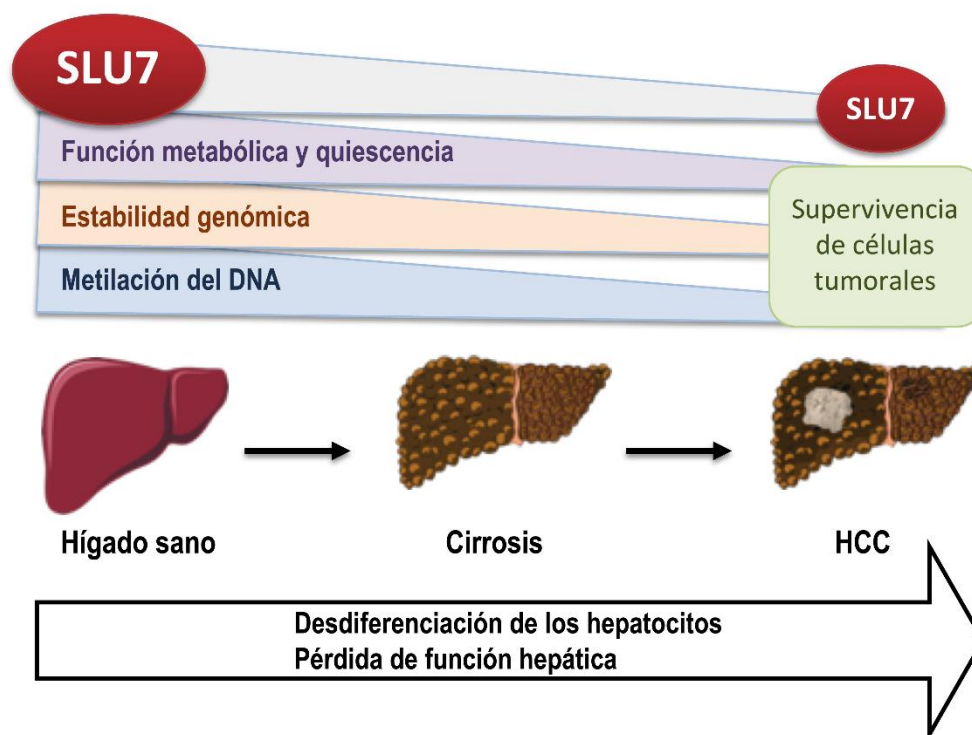


FIGURA 5. Resumen de las funciones en las que participa SLU7 como regulador de la fisiopatología hepática y esquema de la progresión de la enfermedad hepática.

## 6. TERAPIAS DIFERENCIADORAS

A pesar de que todavía no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que subyacen a la desregulación de los factores hepáticos clave de la identidad hepatocelular, su expresión es esencial para establecer y mantener el fenotipo hepático maduro a lo largo de todo el desarrollo del hígado. Por ello, desde hace años se ha especulado con la posibilidad de restaurar la expresión de algunos de estos factores durante diferentes fases de la enfermedad hepática crónica, con el objetivo de recuperar la expresión génica hepatocelular normal y mejorar la función hepática. Así, por ejemplo, en cultivos celulares, la expresión simultánea exógena de HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  y FOXA3 en células de HCC promueve la expresión endógena de factores de transcripción que median la transformación de las células de hepatoma en hepatocitos<sup>234</sup>. También en este sentido, ya se han desarrollado diferentes estrategias para reintroducir HNF4 $\alpha$  en modelos animales de fibrosis, cirrosis y HCC, y que son capaces de



restaurar la diferenciación y las funciones de los hepatocitos, e incluso revertir la fibrosis y la inflamación<sup>96,191,235–239</sup>.

En primer lugar, gracias a la terapia génica se ha conseguido la transferencia genética adenoviral de HNF4 $\alpha$  y HNF1 $\alpha$  en modelos de roedores de daño hepático crónico y HCC, recuperando parcialmente la expresión génica hepato-específica, la función hepática e incluso consiguiendo atenuar la fibrosis y el desarrollo de HCC<sup>107,184,191,235,240</sup>. También, la transferencia del gen HNF4 $\alpha$  en vectores virales adenoasociados (AAV, *adeno-associated virus*) recombinantes en un modelo de daño hepático terminal en rata, consiguió mejorar la supervivencia y la función hepática a partir de las 48 horas de la administración<sup>96</sup>. Con la transfección de una modesta fracción de hepatocitos se consiguió activar la expresión de los factores de transcripción *Hnf1 $\alpha$* , *C/Ebpa* y *Foxa2*, lo que, en consecuencia, reactivó la expresión endógena de HNF4 $\alpha$  y con ello se reanudaron la secreción de ALB, la actividad del CYP450 y la expresión de otros genes hepato-específicos diana de HNF4 $\alpha$ <sup>96</sup>. Es conveniente tener en cuenta que el uso de vectores AAV en pacientes con enfermedad hepática podría desencadenar una respuesta inmune y un daño hepatocelular transitorio como se ha observado en los ensayos clínicos<sup>241</sup>. Además, existe la posibilidad de que el organismo receptor pueda desarrollar anticuerpos neutralizantes frente al serotipo concreto del AAV utilizado, lo que limitaría el uso secuencial de ese serotipo específico<sup>241,242</sup>.

Otra estrategia sería la terapia celular. Se han desarrollado hepatocitos a partir de fibroblastos humanos o de ratón y, una vez trasplantados a ratones, estas células son capaces de repoblar el hígado y protegerlo frente al daño hepático agudo o crónico<sup>236,243,244</sup>. Para ello, se generan células funcionales similares a los hepatocitos, bien a través de la expresión de una combinación de varios factores de transcripción como HNF1 $\alpha/\beta$ , HNF4 $\alpha$ , FOXA1-3 y GATA<sup>236,243,245</sup>, o bien mediante la generación de células hepáticas a partir de células progenitoras multipotentes estimuladas con factores de crecimiento que inducen diferenciación hepatocelular como FGF o HGF<sup>244</sup>.

Como propuesta alternativa al empleo de los AAV se ha estudiado la reactivación de la expresión endógena de los factores de transcripción hepáticos mediante la administración de pequeños oligonucleótidos de RNA (saRNA, *short-activating RNA*) dirigidos a regiones promotoras específicas. En este sentido, la administración de los saRNA frente a C/EBP $\alpha$  en modelos de carcinogénesis asociada a la cirrosis en rata mejoró la función hepática al reinducir la expresión de HNF1 $\alpha$  y HNF4 $\alpha$ <sup>246</sup>. Además, la administración dirigida al promotor P1 de HNF4 $\alpha$  mejoró significativamente el metabolismo de lípidos y glúcidos en un modelo de

esteatohepatitis no alcohólica en rata <sup>237</sup>. Por otra parte, la administración sistémica del microRNA miR-124, diana transcripcional de HNF4 $\alpha$ , suprime el crecimiento del tumor en modelos de HCC en ratón <sup>247</sup>.

Finalmente, la terapia basada en mRNA, cuyo desarrollo ha despuntado en los últimos años, puede tener un gran potencial en el tratamiento de las enfermedades hepáticas con un perfil de efectividad y seguridad que podría ser superior al de la terapia génica <sup>248,249</sup>. Así, la administración del mRNA de *HNF4 $\alpha$*  formulado en nanopartículas lipídicas (LNP, *lipid nanoparticle*) (mRNA-LNPs) a los hepatocitos aislados de pacientes con cirrosis descompensada, promueve la expresión de factores de transcripción claves como HNF1 $\alpha$  y C/EBP $\alpha$ , de proteínas séricas y de genes metabólicos clave <sup>238</sup>. Otro estudio validó también el efecto restaurativo de las partículas HNF4 $\alpha$ -LNPs sobre la función hepática y la reversión de la fibrosis en hepatocitos aislados de pacientes y de modelos de ratón de daño hepático crónico <sup>239</sup>. Como limitación de esta terapia, es conveniente comentar que la expresión transitoria del mRNA requeriría de administraciones repetidas. Sin embargo, el hecho de que consiga restaurar la expresión génica endógena de la red de factores de transcripción hepáticos podría suponer una respuesta terapéutica amplificada y duradera <sup>239</sup>.

De este modo, la restauración de los factores de transcripción o de los factores de *splicing* implicados en el establecimiento del fenotipo hepático maduro, puede ser clave para recuperar el programa transcripcional hepático adulto y la función hepática normal en las enfermedades hepáticas crónicas, mejorando así el pronóstico de los pacientes.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## HIPÓTESIS

La progresión de la enfermedad hepática implica el deterioro paulatino de la arquitectura normal del parénquima hepático, así como una pérdida de la función hepática que dictamina el pronóstico de los pacientes. Este deterioro funcional no solo se debe a la muerte de los hepatocitos sino también a una progresiva desdiferenciación de los hepatocitos remanentes. De este modo, en los hígados enfermos, se establece una pérdida progresiva de la expresión génica específica y característica del hígado <sup>91,93</sup>. En la actualidad, los mecanismos moleculares que conducen a esta desdiferenciación hepatocelular durante la enfermedad hepática crónica y la hepatocarcinogénesis no son bien conocidos.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión del mRNA del factor de *splicing* *SLU7* se reduce significativamente en la enfermedad hepática, incluyendo la cirrosis y el HCC <sup>124</sup>. Así mismo, la caracterización de su papel en la fisiopatología hepática demostró su función como regulador central de la identidad y la quiescencia del hepatocito, controlando la expresión y el *splicing* de diferentes genes fundamentales para el metabolismo y diferenciación de los hepatocitos adultos, entre los que se encuentra el factor de transcripción *HNF4α* <sup>55</sup>. Nuestros datos también muestran que *SLU7* protege frente al estrés oxidativo <sup>211</sup> y que es un importante controlador de la integridad del genoma, al inhibir la inestabilidad genómica y el daño al DNA asociado a la transcripción y al asegurar la correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis <sup>56</sup>. Más recientemente hemos demostrado que *SLU7* asegura la estabilidad de la proteína *DNMT1* y la correcta metilación del DNA <sup>212</sup>. Todos estos resultados sitúan a *SLU7* como un importante regulador de la función hepática a varios niveles, incluyendo la regulación de la transcripción, de procesos de *splicing* y de estabilidad de proteínas.

Por otra parte, el factor de transcripción *HNF4α* es un regulador esencial de la expresión génica hepática, ya que controla la diferenciación celular y las funciones tanto de los hepatocitos fetales como de los hepatocitos adultos <sup>67,129,135</sup>. La pérdida de su expresión en la enfermedad hepática crónica <sup>93,191,193</sup> se ha asociado con una pérdida de funciones hepáticas y un peor pronóstico de la enfermedad <sup>105,196</sup>.

Dado el papel de *SLU7* en el control de la expresión de *Hnf4α* <sup>55</sup> y su implicación en tan variados procesos celulares, nuestra hipótesis de trabajo es que la pérdida de *SLU7* durante la enfermedad hepática podría contribuir a la desregulación de *Hnf4α*, al fenotipo

desdiferenciado de los hepatocitos y a la pérdida de función hepática asociada a la progresión de la enfermedad <sup>32</sup>.

## OBJETIVOS

1. Estudiar si la disminución de la expresión de SLU7 contribuye al desarrollo de la enfermedad hepática.
  - 1.1. Caracterizar el papel de SLU7 en la diferenciación y función hepatocelular durante la enfermedad hepática empleando modelos de daño hepático crónico por CCl<sub>4</sub> y agudo por acetaminofén (APAP) en ratones haploinsuficientes para *Slu7*.
2. Estudiar el papel de SLU7 en la regulación de la expresión de HNF4 $\alpha$ .





## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. MUESTRAS DE HÍGADOS HUMANOS

El uso y el procesamiento de muestras de hígados humanas fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Navarra (CEI 47/2015). Las muestras fueron obtenidas a través del Biobanco de la Universidad de Navarra (ISCIII Ref B.0000612) de acuerdo a la legislación vigente. Las muestras de pacientes con cirrosis, fallo hepático agudo o hepatocarcinoma (HCC) corresponden a pacientes sometidos a hepatectomía parcial o trasplante hepático. Las muestras de hígados sanos o con mínimos cambios proceden de biopsias percutáneas de pacientes con tumores digestivos o de donantes de hígado sanos para trasplante. Agradecemos a todos los pacientes la donación de sus muestras al Biobanco, lo cual ha hecho posible el presente trabajo.

Tras su obtención, todas las muestras se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

## 2. MODELOS ANIMALES

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 de experimentación animal fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Navarra (Protocolo 062-16).

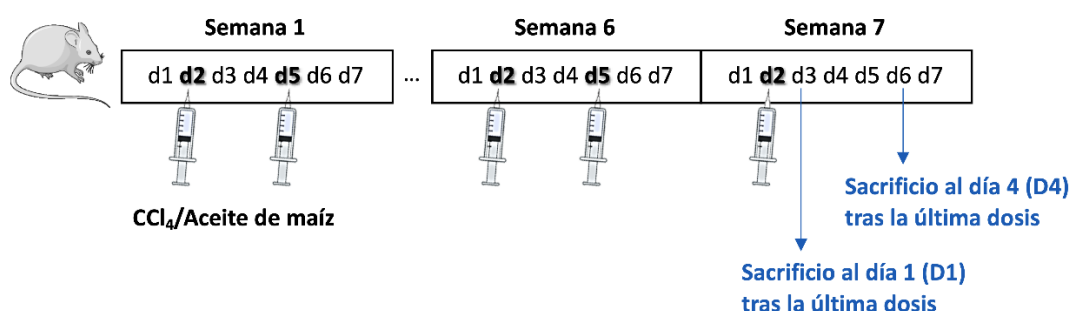
Para los experimentos, se utilizaron ratones haploinsuficientes para *Slu7* (C57BL/6NTac-Slu7<sup>tm1a(KOMP)Wtsi/Wtsi</sup>, *Slu7*<sup>+/-</sup>) obtenidos del Archivo Europeo de Ratones Mutantes (EMMA, *European Mouse Mutant Archive*) que fueron generados mediante células madre embrionarias dirigidas utilizando la estrategia KOMP/EUCOMM. La colonia de ratones se mantuvo en un fondo continuo C57BL/6N, mediante el cruce de ratones macho *Slu7*<sup>+/-</sup> con ratones hembra comerciales C57BL/6N en condiciones adecuadas de estabulación y con acceso a alimentación y agua *ad libitum* en el animalario de nuestro centro de trabajo. Como controles de los experimentos se utilizaron los correspondientes ratones hermanos homocigotos para *Slu7* (*Slu7*<sup>+/+</sup>), identificados tras el correspondiente genotipaje de cada camada.

Para los experimentos se emplearon ratones machos *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> de 14 semanas de edad, que se mantuvieron con una dieta regular o en ayunas durante la noche cuando la experimentación lo requería. Al finalizar los correspondientes tratamientos que se detallan a

continuación, y en los puntos de tiempo indicados, se extrajo sangre del plexo retro-orbital de los ratones. Además, en el momento del sacrificio por dislocación cervical, las muestras de hígado fueron recogidas y congeladas en nitrógeno líquido, así como fijadas en formaldehído al 4 % durante 48 horas y posteriormente incubados en etanol 70 % para proceder a su inclusión en parafina. Se utilizaron al menos cinco ratones por grupo y los experimentos se repitieron al menos dos veces.

### 2.1. Modelo de daño hepático crónico inducido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>)

Para generar un modelo de daño hepático crónico se administró a ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* y *Slu7<sup>+/-</sup>* por vía intraperitoneal una dosis de 0,6 µL/g peso corporal de CCl<sub>4</sub> (289116; Sigma-Aldrich), diluído en aceite de maíz (C8267; Sigma-Aldrich), dos veces por semana durante 6,5 semanas<sup>250</sup>. Los ratones control recibieron una dosis equivalente en volumen del vehículo, aceite de maíz. En la semana 7, tras la última dosis administrada de CCl<sub>4</sub> o del vehículo, los ratones se sacrificaron al día siguiente (día 1; D1) o a los 4 días (día 4; D4) (Figura 6). Durante todo el tiempo de tratamiento los ratones mantuvieron una dieta *ad libitum*.

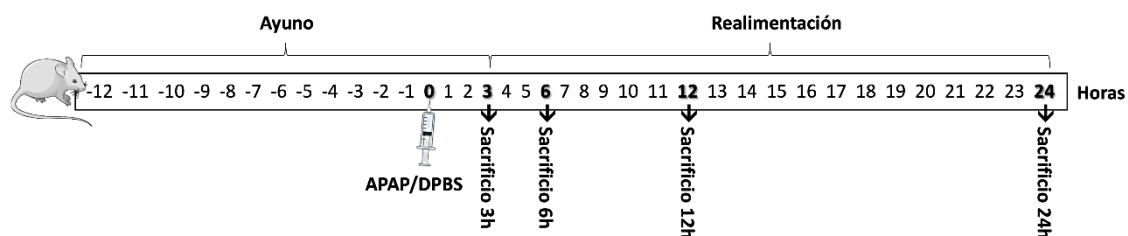


**Figura 6. Representación esquemática del modelo de daño hepático crónico por CCl<sub>4</sub>.** Modelo *in vivo* de daño hepático crónico inducido por la administración intraperitoneal de 0,6 µL/g CCl<sub>4</sub> diluído en aceite de maíz en ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* y *Slu7<sup>+/-</sup>* dos veces por semana durante 6,5 semanas. Los ratones control recibieron el volumen equivalente del vehículo aceite de maíz. Los animales se sacrificaron 1 (D1) o 4 (D4) días después de la última dosis recibida durante la semana 7. Abreviaturas: d, día.

### 2.2. Modelo de daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP)

Para generar un modelo de daño hepático agudo en los ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* y *Slu7<sup>+/-</sup>* se les administró por vía intraperitoneal una dosis única de 300 mg/kg de acetaminofén (APAP, *acetaminophen*) (7085; Sigma-Aldrich). Para prepararlo, el APAP se disolvió en tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) a 55 °C y, posteriormente, se enfrió a 37 °C antes de inyectarlo<sup>251</sup>. Los controles recibieron una dosis equivalente en

volumen del vehículo, DPBS. De acuerdo con los protocolos publicados<sup>252</sup>, los animales habían sido puestos en ayunas durante la noche, 12-14 horas antes de la administración del tratamiento. Tres horas después de la inyección se les repuso la comida *ad libitum*. Los ratones fueron sacrificados a las 3, 6, 12 o 24 horas tras la administración de APAP (Figura 7).



**Figura 7. Representación esquemática del modelo de daño hepático agudo por acetaminofén (APAP).** Modelo *in vivo* de daño hepático agudo inducido por la administración intraperitoneal de una dosis única de 300 mg/kg de APAP disuelto en DPBS en ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* y *Slu7<sup>+/-</sup>*. Los ratones control recibieron el volumen correspondiente del vehículo DPBS. Los animales fueron puestos en ayunas la noche previa y se les repuso la comida a partir de las 3 horas de la administración de APAP. Los ratones fueron sacrificados en los puntos 3, 6, 12 o 24 horas después de la inyección.

### 2.3. Producción e inyección de vectores adenoasociados (AAV)

Para el estudio profiláctico de SLU7 en el daño hepático se emplearon virus adenoasociados (AAV) que sobreexpresan *Slu7* específicamente en el hígado. Para ello se insertó la secuencia de SLU7 de ratón o la secuencia de *Renilla* como control, en vectores adenoasociados de serotipo 8 (AAV8), según lo descrito por nuestro grupo<sup>55</sup>. Los transgenes se expresan bajo el control de un promotor hepato-específico quimérico compuesto por el promotor de la  $\alpha$ 1-antitripsina humana y secuencias reguladoras del potenciador de la albúmina.

Los dos AAV8 de trabajo, el AAV-SLU7 y el AAV-*Renilla* (AAV-Ren), se generaron mediante una doble transfección de células HEK-293T con 20  $\mu$ g de plásmido pAAV8 y 55  $\mu$ g de plásmido empaquetador pDP8.ape (*Plasmid Factory GmbH&Co.* KG, Bielefeld, Alemania) utilizando como vehículo de transfección polietilamina de alto peso molecular y libre de agua, PEI (Sigma-Aldrich), que debe ser testado previamente para optimizar el rendimiento de la transfección, según el protocolo descrito por Gil-Farina y cols<sup>253</sup>.

Por cada producción de plásmido se transfectaron 30 placas de 150 mm (145 cm<sup>2</sup>) (Corning, Thermo Fisher) con 10 mL de Medio Eagle modificado de *Dulbecco* (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado al 2 % con suero fetal bovino (FBS, fetal

bovine serum). Para ello se prepararon dos mezclas en suero fisiológico: una conteniendo el plásmido AAV8 y el plásmido pDP8.ape y otra añadiendo PEI. A continuación, se mezcló lentamente 1 mL de cada mezcla y los 2 mL se añadieron gota a gota a cada placa. Éstas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.

Pasado este tiempo se recogieron las células en el medio y se centrifugaron para obtener un pellet. Éste se resuspendió en 7 mL de tampón de lisis TMS y se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación con hielo seco-Etanol 70 %/baño a 37 °C. Se centrifugó a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante con un filtro de 0,45 µm. Éste fue tratado con desoxirribonucleasa (DNasa, *deoxyribonuclease*) / ribonucleasa (RNasa, *ribonuclease*) (Roche, Mannheim, Alemania) (0,1 mg de cada una por placa) y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

Los AAV se purificaron mediante un gradiente de Iodixanol (*Optiprep™ Density Gradient Medium*, Sigma-Aldrich) en tubos Beckman de centrifuga (*Ultra clear centrifuge tubes* de 25 x 89 mm), y se centrifugó en un rotor 70TI a 69.000 rpm durante 75-90 minutos a 16 °C con aceleración y deceleración máxima. Se recogió la primera fracción (5-6 mL) con una jeringa (BD Microlance agujas de 18 G, 19 G y 21 G) y se concentró el virus con DPBS + 5 % sacarosa (Sigma-Aldrich) en un centricon de 100.000 MWCO de 15 mL (*Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultra-100K* de Milipore), hasta un volumen de 0,5-1 mL mediante 3-4 lavados de 15 mL y centrifugando a 3.000 rpm a 16 °C.

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

Ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* fueron inyectados con los AAV-SLU7 o con los correspondientes vectores control, AAV-Ren. La dosis administrada a cada ratón fue de  $1 \times 10^{11}$  cpg en un volumen de 100 µL a través del plexo retro-orbital<sup>55</sup>. La inyección se realizó con una jeringa BD Micro-Fine de 0,5 mL en ratones anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una disolución 1:9 de xilacina (Rompún 2 %, Bayer, Leverkusen, Alemania) y ketamina (Imalgene 50, Boehringer Ingelheim, Kommanditgesellschaft, Alemania). El inicio del tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub> se llevó a cabo 15 días después de la inyección de los AAV, y se procedió de la misma manera descrita en el apartado 2.1 de Materiales y métodos.

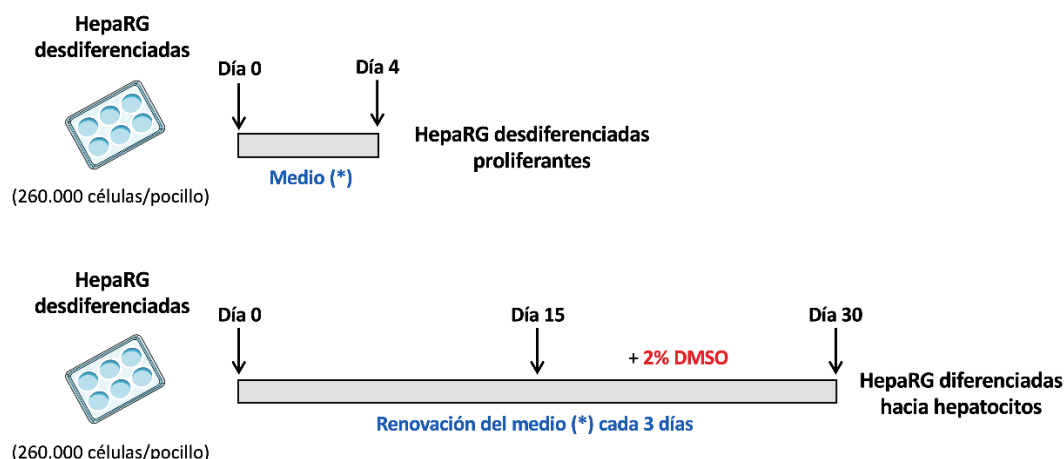
### 3. CULTIVO CELULAR

#### 3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares humanas de hepatocarcinoma PLC/PRF/5 y HepG2 se obtuvieron de la Colección americana de cultivos celulares (ATCC, *American type culture collection*) y se mantuvieron en cultivo en medio DMEM (41966-029) suplementado con 5 % (en el caso de las PLC/PRF/5) o con 10 % (en el caso de las HepG2) de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de glutamina/penicilina/estreptomicina (GPS, *glutamine/penicillin/streptomycin*). Para la producción de los AAV se empleó la línea celular HEK-293T, procedente de riñón embrionario humano. Se cultivó en DMEM suplementado con 10 % FBS y 1 % GPS. Todas las líneas celulares se mantuvieron en un incubador con filtro Hepa (Thermo Forma *Steri-Cycle CO<sub>2</sub> Incubator*) a 37 °C, en una atmósfera al 95 % de humedad, 21 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Cuando el cultivo de las líneas celulares llegaba al 90 % de confluencia, las células eran sembradas a menor densidad para realizar los experimentos correspondientes. Concretamente, se sembraron 150.000 células PLC/PRF/5 y 300.000 células HepG2 por pocillo en placas de 6 pocillos (9,6 cm<sup>2</sup>) (Corning, Thermo Fisher), o 1.000.000 células PLC/PRF/5 por placa de 100 mm (56,7 cm<sup>2</sup>), en los correspondientes medios de cultivo.

La línea celular proliferante derivada de hepatoma humano bien diferenciado, HepaRG, se obtuvo de BioPredic International (Rennes, Francia), y se mantuvo en cultivo en condiciones proliferantes en medio *William's Medium E* (22551-022) suplementado con 7,5 % FBS, 1 % GPS, 5 µg/mL insulina y 50 µM hidrocortisona. Para su diferenciación a hepatocitos se utilizó el protocolo descrito <sup>254</sup>. Brevemente, las células HepaRG, que inicialmente están en estado de desdiferenciación, se sembraron a una densidad de 260.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Estas células se recogieron a los 4 días como células HepaRG desdiferenciadas proliferantes. En paralelo, para inducir la diferenciación hacia hepatocitos, se mantuvieron las células HepaRG 30 días en cultivo renovando el medio cada tres días y suplementándolo con 2 % dimetilsulfóxido (DMSO, dimethyl sulfoxide) (D8418; Sigma-Aldrich) durante los últimos 15 días (Figura 8).



(\*) Medio: *William's Medium E* + 7,5 % FBS, 1 % GPS, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulina, 50  $\mu\text{M}$  hidrocortisona

**Figura 8. Representación esquemática del procedimiento de cultivo de la línea celular HepaRG.** Las células HepaRG, que inicialmente están en estado de desdiferenciación, se sembraron en placas de 6 pocillos. Estas células o bien se recogieron a los 4 días como células desdiferenciadas proliferantes o bien se mantuvieron en cultivo durante 30 días hasta su diferenciación hacia hepatocitos. Para la diferenciación, se cambió el medio cada 3 días y durante los últimos 15 días se suplementó con 2 % DMSO. Abreviaturas: FBS, suero fetal bovino; GPS, glutamina/penicilina/estreptomicina; DMSO, dimetilsulfóxido.

Los medios de cultivo, la tripsina (*Trypsin-EDTA* 0,05 %; 25300-054), el FBS (10270-106), el GPS (10378-016) y el DPBS; 14190-094 utilizados en el cultivo celular proceden de Gibco-Life Technologies (Paisley, UK). La insulina (19278) y la hidrocortisona (H2270) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EEUU). El material empleado para el cultivo celular como placas, pipetas, rascadores y tubos se adquirieron de Costar/Corning (Corning, NY, EEUU) y Sarstedt (Newton, NC, EEUU).

### 3.2. Transfección transitoria de células

#### 3.2.1. RNA de interferencia pequeños (siRNA)

Las líneas celulares humanas empleadas fueron transfectadas con RNA de interferencia pequeños (siRNA, *small interfering RNA*) para el silenciamiento específico de genes. Todos los siRNA utilizados han sido sintetizados por Sigma-Aldrich. Las secuencias concretas de cada siRNA utilizado son las siguientes:



Gen	siRNA	Secuencia 5'-3'
<i>LUCIFERASA</i>	siGL	CGTACGCGGAATACTTCGA
<i>SLU7</i>	siSLU7-1	GGATGAAGATAAATATGCA
<i>SLU7</i>	siSLU7-2	GAATCCAGATGAAGTGAGT
<i>USP10</i>	siUSP10	CGACAAGCUCUUGGAGAUAAA
<i>PKC<math>\alpha</math></i>	siPKC $\alpha$	AAAGGCUGAGGUUGCUGAU
<i>PKC<math>\delta</math></i>	siPKC $\delta$	CGACAAGAUCAUCGGCAGA

Para silenciar la expresión de SLU7 en los experimentos presentados en este trabajo se utilizó el siSLU7-2, denominado siSLU7. El siSLU7-1 solamente se utilizó para corroborar la especificidad de los resultados obtenidos en las células silenciadas con el siSLU7-2. El siGL se utilizó como siRNA control.

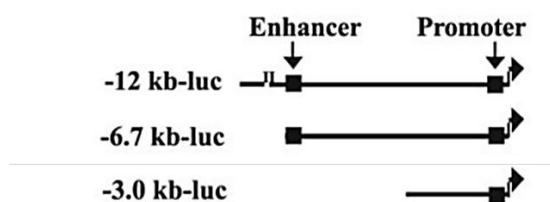
Las células sembradas durante 24 horas (o diferenciadas durante un mes en el caso de las HepaRG) se transfectaron con los oligonucleótidos siRNA específicos para cada ensayo y con el siRNA control (siGL) a una concentración de 75 nM en las transfecciones individuales y de 37,5 nM en las co-transfecciones de los siRNA. Se utilizó como reactivo de transfección Lipofectamina RNAiMax (13778075; Invitrogen) añadiendo 3  $\mu$ L/pocillo en el caso de las placas de 6 pocillos o 15  $\mu$ L/placa en el caso de las placas de 100 mm. El medio de transfección utilizado fue Opti-MEM (31985-047; Gibco) al 10 % FBS y sin antibióticos. Después de 4-6 horas de incubación, el medio se sustituyó por el medio de cultivo correspondiente en cada caso.

Las células se utilizaron en diferentes ensayos y se recogieron a las 24, 36, 48 o 72 horas desde la transfección. Para ello, las células se lavaron con DPBS, se rascaron con *Cell Scrapers* (Sarstedt), se centrifugaron a 4.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C hasta obtener un pellet y se resuspendieron en la solución correspondiente para la posterior extracción de RNA o de proteína.

### 3.2.2. Plásmidos

Para estudiar el efecto específico de SLU7 en la regulación de la transcripción de *HNF4 $\alpha$* , se utilizaron vectores que contenían las secuencias del promotor de *HNF4 $\alpha$*  cedidos por el Dr. Iannis Talianidis (Herakleion, Creta, Grecia) <sup>146,201</sup>. Concretamente, se cedieron tres construcciones de luciferasa que tienen clonadas las regiones promotoras de 12 kb, 6.7 kb o 3 kb por encima de la posición +67 del gen *HNF4 $\alpha$*  humano en el plásmido pGL3. Los tres

plásmidos contienen las secuencias reguladoras del promotor proximal de *HNF4α*, pero solo los plásmidos -12 kb y -6.7 kb contienen una región potenciadora (Figura 9).



**Figura 9. Representación de las construcciones de *HNF4α*.** La construcción -12 kb-luc contiene una región 12 kb por encima de la posición +67 de *HNF4α* que incluye una región potenciadora (*enhancer*). Las construcciones -6.7 kb y -3 kb presentan una delección en el extremo 5', que en el caso de la construcción -3 kb, elimina la región potenciadora. Adaptado de Hatzis y cols. *Mol Cell Biol* (2006) <sup>201</sup>.

Todos los vectores de expresión 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).

La línea celular HepG2 sembrada en pocillos de placa de 6 y transfectada durante 24 horas con el siRNA de SLU7 (siSLU7) o con el control (siGL), se transfectó con 1,8 µg de cada uno de los plásmidos de estudio o con el plásmido control, utilizando 2,5 µL del reactivo Lipofectamina 2000 (11668027; Invitrogen). 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 de las HepG2.

A las 48 horas de la transfección con los siRNA (y 24 horas de la transfección con los plásmidos) se recogieron las células para continuar el análisis de la actividad luciferasa.

### 3.3. Tratamientos

Después de transfectar las células y antes de recogerlas, éstas fueron tratadas con diferentes reactivos según aparece indicado.

Las líneas celulares PLC/PRF/5 y HepG2 se trataron con 10 µM del inhibidor del proteasoma MG-132 (474790; Calbiochem) durante las últimas 12 horas antes de recoger las células. Los pocillos control se trataron con el mismo volumen del vehículo, DMSO.

La línea celular PLC/PRF/5 se trató con 10 µg/mL del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX, *cycloheximide*) (C-7698; Sigma-Aldrich) durante 4, 12 o 24 horas. Los pocillos control se trataron con el mismo volumen del vehículo, DMSO.

Las líneas celulares PLC/PRF/5 y HepG2 se trataron con 10 mM de la molécula antioxidante N-acetilcisteína (NAC, *N-acetylcysteine*) (A8199; Sigma-Aldrich) durante 48 horas. Los pocillos control se trataron con el mismo volumen del vehículo, agua.

Para inducir gránulos de estrés, las células PLC/PRF/5 se trataron con 500 µM de arsenito sódico (NaAsO<sub>2</sub>) (S7400; Sigma-Aldrich) durante 1 hora antes de recogerlas. Los pocillos control se trataron con el mismo volumen del vehículo, agua.

## **4. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN**

### **4.1. Extracción de RNA**

La extracción del RNA total de las células provenientes tanto de los cultivos *in vitro* como de los tejidos hepáticos (ratón y humano) se realizó siguiendo el protocolo del kit *Maxwell RSC Simply RNA Tissue* (AS1340; Promega) en el equipo automatizado *Maxwell RSC Instrument* de Promega (Madison, WI, EEUU).

Para ello, el pellet de células o el tejido hepático congelado se homogeneizó con 200 µL de tampón de homogeneización (Promega). En el caso de las muestras de tejido, los homogeneizados se calentaron a 70 °C durante 2 minutos. Seguidamente, en todos los casos, se añadieron 200 µL de tampón de lisis (Promega) y se cargó cada muestra en el cartucho correspondiente para la extracción automatizada en el equipo mencionado. El proceso incluye un tratamiento con DNasa para eliminar los posibles restos de DNA genómico contaminante. El RNA extraído fue resuspendido en 30-50 µL de agua libre de RNasas y DNasas (Promega).

La concentración y calidad del RNA obtenido se evaluó mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher). Todas las muestras de RNA se almacenaron a -80 °C.

#### 4.2. Retrotranscripción

Previamente al proceso de síntesis de DNA complementario (cDNA, complementary DNA), se realizó un tratamiento con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, *ethylene diaminetetraacetic acid*) (Y02353; Invitrogen) para asegurar la inactivación de la DNasa. Para ello, se partió de 1 µg de RNA y se añadió EDTA durante 10 minutos a 90 °C. Seguidamente, se desnaturalizaron las muestras a 90 °C durante 1 minuto y se llevó a cabo la retrotranscripción del RNA a cDNA añadiendo una mezcla que contenía tampón 5X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl y 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 mM ditioneitol (DTT, *dithiothreitol*; Y00147), 10 ng/µL cebadores aleatorios (RP, *random primers*; 11034731001), 10 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs, *deoxynucleotide triphosphate*; 49036521), 1,2 U/µL inhibidores de RNasa (*RNase Out*; 100000840) y 6 U/µL de la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia de Moloney de ratón (M-MLV, *Moloney Murine Leukemia Virus*; 28025-013). El proceso se completó durante 1 hora a 37 °C y 1 minuto a 95 °C. Todos los reactivos empleados son de Invitrogen excepto los RP y los dNTPs que son de *Roche Diagnostics* (Mannheim, Alemania).

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

#### 5. EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL (qPCR)

Las diferencias de expresión génica se analizaron mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) a tiempo real (qPCR, *real-time PCR*) 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.

Para asegurar la especificidad en la cuantificación de los productos amplificados, la emisión de la fluorescencia en cada ciclo de PCR se midió a la temperatura más elevada antes del inicio de la curva de disociación o *melting* de los diferentes productos.

Para el estudio de la expresión génica se diseñaron cebadores específicos cuya secuencia de nucleótidos se muestra en el Anexo 2.

Las condiciones generales de la reacción, a excepción de la temperatura de hibridación y de la lectura de fluorescencia que se concretaron en cada gen, fueron las siguientes:

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)		

Finalmente, la cuantificación de los niveles de mRNA en cada estudio se calculó utilizando un gen control de expresión constitutiva que en este caso fue la proteína ribosomal *RPLP0* (36B4). Para el cálculo se empleó la siguiente ecuación:

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

## 6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

### 6.1. Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas procedentes de tejido hepático (ratón y humano) se realizó a partir de aproximadamente de 50 mg de hígado. Este se homogeneizó en tampón UREA (7 M urea, 1,97 M tiourea, 65 nM CHAPS, 6 mg/ml DTT) complementado con inhibidores de proteasas *Complete Ultra Tablets EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail* (11697498001; Roche) e inhibidores de fosfatasa *PhosSTOP* (04906837001; Sigma-Aldrich). Los homogeneizados fueron sonicados durante 30 segundos a intensidad alta en el Bioruptor de Diagenode (Liège, Bélgica), y posteriormente se ultracentrifugaron a 4 °C durante 20 minutos a 75.000 rpm en una centrífuga HITACHI *Micro ultracentrifuge* CS15ONX (Japón). Se recogió el sobrenadante para cuantificar las proteínas mediante el método de Bradford (BioRad), como se detalla en el apartado 6.3.2 de Materiales y métodos.

Para la extracción de proteínas de líneas celulares, el pellet celular fue resuspendido en un volumen variable (50-70  $\mu$ L), de acuerdo con la cantidad de células en cada muestra, de tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 0,1 % SDS, 1 % Tritón X-100, 0,5 % deoxicolato sódico) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Seguidamente, las muestras se sometieron a lisis pasiva en un agitador rotatorio tipo noria a 4 °C durante 30 minutos, se sonicaron durante 30 segundos a intensidad alta en el Bioruptor y se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 rpm y 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la concentración

de proteína mediante el método de BCA, como se detalla en el apartado 6.3.1 de Materiales y métodos.

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

## **6.2. Fraccionamiento subcelular**

Para evaluar la localización de SLU7 en las fracciones citoplasmática, nuclear y de unión a la cromatina, se realizó un fraccionamiento subcelular seguido de análisis por *Western blot*. Para ello, 1.000.000 de células PLC/PRF/5 se sembraron en placas de 100 mm. Las células se lavaron, se recogieron en DPBS y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C hasta obtener un pellet. Para separar el núcleo del citoplasma se utilizó el kit comercial *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (78835; Thermo Fisher Scientific). A continuación, partiendo del núcleo, se separó el nucleoplasma de la fracción unida a la cromatina. Brevemente, el pellet de células obtenido se resuspendió en un volumen del tampón incluido en el kit, CER I, calculado según la cantidad de células de la muestra, complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se incubó en hielo durante 10 minutos y se añadió el volumen correspondiente del tampón CER II, mezclando bien la muestra en el vortex e incubando durante 1 minuto en hielo. A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se conservó el sobrenadante en frío como la fracción citoplasmática. El pellet, que contenía la fracción nuclear, se resuspendió en tampón NP40 (15 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glicerol, 0,1 % NP40) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y se incubó durante 30 minutos a 4 °C en un agitador rotatorio tipo noria. Mediante una centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C se separaron la fracción nucleoplasma (sobrenadante) de la fracción unida a cromatina (pellet). Este último se trató con 250 U/μL de benzonasa (E8263; Sigma-Aldrich) en un tampón que contenía 20 mM Tris HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP40 e inhibidores de proteasas y fosfatasas, durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante con las proteínas. En los tres sobrenadantes recogidos correspondientes a las tres fracciones (citoplasma, nucleoplasma y fracción unida a la cromatina) se cuantificó la proteína por el método BCA, como se detalla en el apartado 6.3.1 de Materiales y métodos, y se realizó un análisis por *Western blot*.

### 6.3. Cuantificación de proteínas

#### 6.3.1. Método de BCA

La cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA, *Bicinchoninic acid*; B9643 Sigma-Aldrich) emplea una solución de ácido bicinconínico y otra de cobre (II) en relación 50:1, y se basa en la reducción de cobre (II) a cobre (I) en un medio alcalino para su detección. Para ello, las muestras de proteína se diluyeron en proporción 1:5 en agua y se realizó una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*). Seguidamente, se incubaron las muestras a 60 °C durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm. Con los datos de absorbancia obtenidos se construyó la curva estándar y se extrapolaron los datos de absorbancia de las muestras problema para calcular la concentración de proteína en cada muestra.

#### 6.3.2. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford se basa en la cuantificación de la unión del colorante azul brillante de *Coomassie* a las proteínas de estudio. En nuestro caso se utilizó un reactivo colorimétrico comercial (5000002; BioRad Protein Assay). Para ello, las muestras de proteína se diluyeron en proporción 1:25 en agua y se realizó una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA. Seguidamente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm. Con los datos de absorbancia obtenidos se construyó la curva estándar y se extrapolaron los datos de absorbancia de las muestras problema para calcular la concentración de proteínas en cada muestra.

## 7. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

### 7.1. Inmunodetección de proteínas (*Western blot*; WB)

#### 7.1.1. Electroforesis y electrotransferencia

Las muestras de proteína para la electroforesis se prepararon empleando entre 20-40 µg de extracto proteico (80 µg para detectar la proteína P-JNK) en tampón de carga Laemmli 1X (Stock 5X: 50 mM Tris pH 6,8, 100 mM β-mercaptoetanol, 2 % SDS, 10 % glicerol y 0,01 % azul de bromofenol). Para igualar los volúmenes de carga, se añadió el tampón de extracción

correspondiente (UREA, RIPA o los tampones empleados para el fraccionamiento subcelular) a cada muestra. Las proteínas se desnaturalizaron a 90 °C durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles discontinuos de acrilamida (gel de apilamiento al 6 % y geles de separación del 7,5 % o del 10 % de acrilamida según el tamaño de las proteínas a determinar) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un tampón que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1 % SDS, utilizando una corriente a 100 V en el gel de apilamiento y a 120 V en el gel de separación.

Tras finalizar la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Amersham Protran (GE Healthcare) de tamaño de poro 0,45 µm (excepto cuando se detectó la proteína P-JNK que se utilizó una membrana de tamaño de poro 0,20 µm) en un tampón de transferencia que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20 % metanol, aplicando un voltaje constante de 120 V a 4 °C durante 60-90 minutos, en función del tamaño de la proteína a detectar.

### **7.1.2. Inmunodetección**

Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con solución *Ponceau S* (P7170; Sigma-Aldrich), se lavó con una solución de TBS (25 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl) – 0,1 % Tween (TBS-T) para retirar el exceso del colorante y se digitalizó mediante un escáner para controlar la transferencia correcta de las proteínas y la homogeneidad de la carga. Seguidamente, la membrana fue embebida en una solución de 5 % leche desnatada en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación continua para así bloquear los puntos de unión inespecíficos de los anticuerpos a la membrana. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en 5 % leche en TBS-T (o 5 % BSA en TBS-T en el caso de la proteína P-JNK) en agitación durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos utilizados, así como la concentración empleada en cada caso, se detallan en el Anexo 1. A la mañana siguiente, la membrana se lavó tres veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado para eliminar el anticuerpo no unido a la proteína diana. Seguidamente, se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido 1:6000 en 5 % leche en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con TBS-T (10 minutos cada uno) y una vez con TBS, tras lo cual el complejo anticuerpo-proteína fue detectado por quimioluminiscencia utilizando el kit *Western Lightning-ECL* de Perkin-Elmer Inc. (NEL104001EA; Waltham, MA, EEUU). Se empleó el equipo *ChemiDoc MP Imaging System* de Bio-Rad para obtener el autorradiograma indicador de la señal.



## 7.2. Inmunohistoquímica (IHQ)

Las inmunodetecciones de la proteína SLU7, de las proteínas de HNF4 $\alpha$  derivadas del promotor P2 y de la proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -Smooth muscle actin), se realizaron en cortes de tejido hepático incluido en parafina de 5  $\mu$ m de grosor.

Los cortes se desparafinaron en una estufa a 60 °C durante 1 hora y, a continuación, se hidrataron por sucesivas incubaciones con *Histo-clear II* (30 minutos) (National Diagnostic, Atlanta, GA, EEUU), 100 % etanol-Xilol y dos veces con 100 % etanol (3 minutos cada incubación). Para bloquear las peroxidasa endógenas del tejido se incubaron las preparaciones con agua oxigenada al 20 % en metanol durante 20 minutos. La hidratación de los tejidos continuó con la incubación de los cortes en etanol a concentraciones decrecientes (96 %, 80 %, 70 %) (5 minutos cada uno) y finalmente en agua desionizada.

El desenmascaramiento del antígeno se realizó en el aparato PT LINK (Dako, Santa Clara, CA, EEUU) durante 30 minutos a 95 °C en tampón 10 mM Citrato - 0,5 % Tween a un pH 6 en el caso de SLU7 o en tampón Tris-EDTA pH 9 en el caso de HNF4 $\alpha$ -P2 y  $\alpha$ -SMA. Las preparaciones se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario en 1 % TBS-BSA durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Como se detalla en el Anexo 1, se emplearon los anticuerpos anti-SLU7 de Santa Cruz (Sc-10829) a una dilución 1:500, anti-HNF4 $\alpha$ -P2 de R&D Systems (H6939-00) a una dilución 1:400 y anti- $\alpha$ -SMA de Sigma-Aldrich (A2547) a una dilución 1:000.

A la mañana siguiente los portaobjetos se dejaron atemperar y se lavó el exceso de anticuerpo primario con TBS en tres lavados de 5 minutos cada uno, y seguidamente se hibridó con el anticuerpo secundario. En el caso de HNF4 $\alpha$ -P2 y  $\alpha$ -SMA se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo EnVision anti-ratón-HRP (Dako) y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, mientras que en el caso de SLU7 la hibridación se realizó en dos pasos sucesivos. En primer lugar, se añadió el anticuerpo biotinilado anti-cabra hecho en conejo (Thermo Fisher) a una dilución 1:200 en TBS-BSA 1 % y se incubó durante 30 minutos. Se lavó con TBS en tres lavados de 5 minutos, se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo EnVision anti-conejo-HRP (Dako) y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de dos lavados de 5 minutos con TBS se reveló con diaminobencidina (DAB, *diaminobenzidine*) (A3468; Dako) como cromógeno a una dilución 1:100. La reacción se paró sumergiendo los portaobjetos en un vaso *copling* con agua controlando el marcaje y la precipitación del DAB. A continuación, se contrastó con hematoxilina y eosina de Harris pura (Merck) y se lavó el exceso con agua. Finalmente, se deshidrataron las preparaciones

incubando secuencialmente en baños con agua, 70 % etanol, 80 % etanol, 96 % etanol (dos veces), 100 % etanol, 100 % etanol-xilol o xilol (dos veces) durante 5 minutos cada incubación.

Para visualizar las preparaciones se utilizó el medio de montaje para microscopía DPX (VWR, Radnor, PA, EEUU), y éstas se escanearon en un equipo Aperio C52 de Leica.

### **7.3. Inmunofluorescencia**

La detección de gránulos de estrés se realizó mediante inmunofluorescencia frente a la proteína 1 de unión a la proteína activadora de ras GTPasa (G3BP1, *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*) en células PLC/PRF/5. Para ello, se sembraron 140.000 células sobre cubreobjetos de cristal colocados en los pocillos de placas de 6 pocillos. Después de transfectar las células con el siRNA control (siGL) o el de SLU7 (siSLU7) durante 48 horas, se trataron con 500  $\mu$ M de arsenito sódico durante 1 hora. Seguidamente, las células se lavaron dos veces con DPBS y se fijaron en formaldehído al 4 % durante 10 minutos. Tras dos lavados con DPBS, los cubreobjetos con las células se pasaron a placas de 12 pocillos para realizar la inmunofluorescencia.

En primer lugar, se bloqueó la autofluorescencia de las células añadiendo 500  $\mu$ L de 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en DPBS durante 10 minutos protegidas de la luz. Después de tres lavados de 5 minutos con DPBS las células se permeabilizaron con 0,2 % Tritón X-100 en DPBS durante 5 minutos a 4 °C. Se volvieron a lavar tres veces con DPBS y el exceso de sitios de unión se bloqueó con el tampón comercial *SuperBlock Blocking Buffer* en DPBS (37517; Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.

La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4 °C diluido en 1 % BSA en DPBS. A la mañana siguiente se eliminó el exceso de anticuerpo primario lavando tres veces con 1 % BSA en DPBS y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo rojo y diluido en 1 % BSA en DPBS durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Los anticuerpos utilizados y sus correspondientes concentraciones de uso se describen en el Anexo 1.

Finalmente, las células se lavaron tres veces con 1 % BSA en DPBS y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de cristal con el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU), que incorpora el marcaje DAPI (*4',6-Diamidino-2-*

*phenylindole*) para los núcleos. Las preparaciones se observaron y se tomaron fotos con el microscopio automatizado Zeiss Axio Imager.M1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

## 8. DETECCIÓN DE INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS

### 8.1. Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)

Para detectar interacciones entre proteínas a partir de extractos de líneas celulares, se trabajó con 1.000.000 de células PLC/PRF/5 que se sembraron en placas de 100 mm. A las 48 horas, las células se lavaron y se recogieron en DPBS. Tras una centrifugación a 4.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se realizó una lisis suave de las células para enriquecer los complejos de proteínas de la fracción citoplasmática. Así, el pellet celular se resuspendió en un volumen apropiado de tampón de Co-IP (20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1 % Nonidet, 2 mM EDTA) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y las células se lisaron durante 30 minutos en un agitador rotatorio tipo noria a 4 °C. Seguidamente, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C quedándonos con el sobrenadante y trabajando en hielo en todo momento.

Para detectar las interacciones entre proteínas a partir de extractos de tejido hepático de ratón se partió de aproximadamente 50 mg de tejido que se homogeneizó en 200 µL de tampón de Co-IP complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las células se lisaron durante 30 minutos en un agitador rotatorio tipo noria a 4 °C y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, quedándonos con el sobrenadante y trabajando en hielo en todo momento.

En ambos casos, se cuantificó la proteína en los sobrenadantes por el método de BCA y se trabajó con 800-1000 µg de proteína para cada condición en un volumen final de 300 µL de tampón de Co-IP. Estas muestras se incubaron con 25 µL de las bolas magnéticas *Dynabeads* proteína G (10003D, Invitrogen) en un agitador rotatorio tipo noria durante 2 horas a 4 °C para eliminar las uniones inespecíficas. Paralelamente, se prepararon las bolas magnéticas con los anticuerpos de interés. Para ello, 25 µL de *Dynabeads* proteína G se lavaron tres veces con 250 µL de tampón citrato-fosfato pH 5 – 0,01 % Tween, y se incubaron con 5 µg del anticuerpo primario o del correspondiente anticuerpo inmunoglobulina G (IgG, *immunoglobulin G*) control en tampón citrato-fosfato pH 5 en un agitador rotatorio tipo noria a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, estas bolas magnéticas unidas al anticuerpo se

lavaron tres veces con tampón citrato-fosfato – 0,01 % Tween, y se añadió la muestra preclareada incubándose toda la noche en un agitador rotatorio tipo noria a 4 °C.

A la mañana siguiente, los inmunocomplejos se lavaron tres veces con DPBS frío con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y se eluyeron en 60 µL de tampón de carga Laemmli 1X (Stock 5X: 50 mM Tris pH 6,8, 100 mM β-mercaptoetanol, 2 % SDS, 10 % glicerol y 0,01 % de azul de bromofenol). A continuación, se mezclaron con el vortex, se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y, con ayuda de un imán (123.21D; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega), se separó el sobrenadante, que contenía los inmunoprecipitados, de las bolas magnéticas. Este sobrenadante se sometió seguidamente a WB. Todos los anticuerpos utilizados en este proceso se detallan en el Anexo 1.

## 8.2. Análisis del interactoma de SLU7

Para estudiar las proteínas que interaccionan con SLU7 en condiciones basales en células PLC/PRF/5, se extrajeron las proteínas de las células y se realizó una inmunoprecipitación de SLU7 o de su correspondiente IgG siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.1 de Materiales y métodos, y las muestras inmunoprecipitadas eluidas en tampón de carga Laemmli 2X se sometieron a análisis por espectrometría de masas.

El análisis de las muestras por espectrometría de masas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de acuerdo con el protocolo publicado anteriormente<sup>255</sup>. Brevemente, las muestras eluidas en tampón de carga se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12 % con la peculiaridad de que solo se dejó correr cada muestra hasta apenas entrar 1 cm en el gel de separación, de manera que las proteínas se concentraron en una única banda. A continuación, el gel se tiñó con *coomassie* coloidal, se cortaron las bandas y se digirieron con la enzima tripsina. Estas muestras fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas TRIPLE-TOF (LC-ESI-MS/MS TRIPLE-TOF). Para ello, se inyectó 1 µg de cada digerido y, mediante cromatografía líquida, se separaron los péptidos por su polaridad utilizando una columna de fase reversa C-18 durante 100 minutos. Seguidamente, los péptidos eluidos se fragmentaron en el espectrómetro de masas TRIPLE-TOF.

El análisis de los datos se realizó utilizando el motor de búsqueda Mascot Server (Matrix, Science, Londres, Reino Unido) frente al proteoma de *Homo sapiens* de la base de datos Uniprot. Se consideró que una proteína interacciona con SLU7 cuando al menos 5 péptidos de dicha proteína fueron identificados en el inmunoprecipitado de SLU7, y no en el

inmunoprecipitado control (IgG). Con la lista de proteínas identificadas se realizó un análisis de componentes celulares de Ontología Génica (GO, Gene Ontology), y además se comparó con dos bases de datos de componentes de gránulos de estrés: Proteoma de los Gránulos de Estrés de los Mamíferos (MSGP, *Mammalian Stress Granules Proteome*) (<https://msgp.pt/index/>)<sup>256</sup> y Base de datos de los Gránulos de RNA (<http://rnagranuledb.lunenfeld.ca/>)<sup>257</sup>.

## 9. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN SUERO

A partir de la sangre extraída del plexo retro-orbital de los ratones se obtuvieron las muestras de suero. Para ello, la sangre se conservó a 4 °C durante toda la noche, favoreciendo la completa coagulación de la misma, y se centrifugó a 14.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos para separar el suero del coágulo. Se recogió el sobrenadante (suero) y se diluyó 1:10 con suero fisiológico para la determinación de los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT, *alanine aminotransferase*), aspartato aminotransferasa (AST, *aspartate aminotransferase*) y lactato deshidrogenasa (LDH, *lactate dehydrogenase*) en el analizador *Cobas Hitachi c311 Analyzer* (Roche).

## 10. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL HÍGADO

Las muestras de hígado recogidas en el momento del sacrificio de los animales se fijaron en formaldehído al 4 %, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm con un criostato. Seguidamente, se realizaron una serie de tinciones que se detallan a continuación, se observaron al microscopio y se escanearon en un equipo Aperio C52 de Leica.

### 10.1. Tinción hematoxilina y eosina (H&E)

Para visualizar la morfología hepática las preparaciones de tejido se desparafinaron e hidrataron como se describe en el apartado 7.2 de Materiales y métodos. Seguidamente, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E, *haematoxylin&eosin*) y se deshidrataron y prepararon con el medio de montaje para su visualización.

### 10.2. Tinción rojo sirio

Para visualizar los depósitos de colágeno en el hígado se realizó una tinción de rojo sirio con ácido pícrico (rojo picrosirio), como se describió anteriormente<sup>250</sup>.

### 10.3. Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS)

Para detectar la presencia de glucógeno hepático se realizó una tinción de PAS (*periodic acid Schiff*) con ácido periódico y reactivo de Schiff como se describió anteriormente <sup>55</sup>.

## 11. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE APAP-GLUCURÓNICO

Los niveles del metabolito APAP-Glucurónico (APAP-Gluc, *APAP-glucuronide*) fueron determinados en muestras de suero de ratones tratados con APAP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*) (Waters). El procedimiento fue adaptado a partir de un protocolo de la casa comercial <sup>258</sup>, y se realizó en colaboración con el Programa de Terapias Moleculares de nuestro centro de trabajo.

### 11.1. Preparación de las muestras

Se obtuvieron muestras de suero de ratones tratados con APAP y suero de los correspondientes ratones control y de ratones sin tratamiento. La obtención de todos los sueros se llevó a cabo como se describe en el apartado 9 de Materiales y métodos.

Se preparó una curva de calibrado con las siguientes concentraciones crecientes de APAP-Gluc: 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 161  $\mu\text{g/mL}$ . De acuerdo a estas concentraciones finales se prepararon las muestras de calibrado, añadiendo a tubos *ependorf* 5  $\mu\text{L}$  de suero de ratones sin tratar, 35  $\mu\text{L}$  de metanol (MeOH), 10  $\mu\text{L}$  del estándar interno (Tolbutamida) y 50  $\mu\text{L}$  de la solución correspondiente de APAP-Gluc. Al mismo tiempo, se prepararon los blancos simples (5  $\mu\text{L}$  de suero de ratones sin tratar, 85  $\mu\text{L}$  de MeOH y 10  $\mu\text{L}$  de Tolbutamida), los blancos dobles (5  $\mu\text{L}$  de suero de ratones sin tratar y 95  $\mu\text{L}$  de MeOH) y las muestras de suero a determinar (5  $\mu\text{L}$  de suero de ratones tratados con APAP, 85  $\mu\text{L}$  de MeOH y 10  $\mu\text{L}$  de Tolbutamida). Tanto las muestras de calibrado como los blancos se prepararon por duplicado.

Seguidamente, todas las muestras se mezclaron con vortex durante 10 segundos y se mantuvieron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para precipitar las proteínas. Se centrifugaron a 13.200 rpm durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido se diluyó en 980  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q en viales de inyección de 2 mL (Waters). Finalmente, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra para su análisis en el equipo de cromatografía.

## 11.2. Equipo y análisis

Las muestras inyectadas en el equipo Acquity UPLC al que se le incorporó una columna Acquity HSS T3 C18 2,1x100mm 1,8  $\mu\text{m}$  (Waters) se separaron por cromatografía. A continuación, los compuestos de interés se detectaron gracias al acoplamiento de un equipo espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ MS con fuente de ionización por electrospray (Waters).

Brevemente, para la separación por cromatografía las muestras son arrastradas por las fases móviles A (0,1% ácido fórmico en agua) y B (0,1% ácido fórmico en MeOH) a un flujo de 0,6 mL/min a 40 °C. El perfil del gradiente de elución fue el siguiente:

Tiempo (minutos)	Fase móvil B (%)
0-0,5	5
0,5-1,85	5-7
1,85-1,90	7-8
1,90-2,50	8-10
2,50-2,60	10-95
2,60-3,60	95-100
3,60-4	100
4-4,10	100-5
4,10-5,50	5

El tiempo total de separación por cromatografía de cada muestra fue de 5,5 minutos.

A continuación, los compuestos obtenidos se transportan al espectrómetro de masas a través de un proceso de ionización. La fuente de iones se estableció en modo de ionización negativa y el voltaje capilar en 1,5 Kv. Así mismo, la energía de colisión para la generación de transiciones de APAP-Gluc se estableció en 20 V y se eligió la transición 326>150 mediante el método de Monitorización de Reacción Múltiple (MRM). El tiempo de retención de APAP-Gluc fue de 1,8 min.

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el *Software MassLynx*. La evaluación del efecto de arrastre (fenómeno de *carry-over*) fue negativa puesto que no se detectaron transiciones características de APAP-Gluc en los blancos tras el calibrado. También fue negativa la evaluación del efecto matriz (fenómeno *matrix effect*) puesto que no se encontraron diferencias significativas en el cromatograma al comparar 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de APAP-Gluc en suero de ratones sin tratar con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de APAP-Gluc en agua Mili-Q.

## 12. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN (GSH)

Los niveles de glutatión (GSH, glutathione) fueron determinados en homogeneizados de tejido hepático procedentes de ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* y *Slu7<sup>+/-</sup>* tratados con APAP o con el vehículo DPBS (controles) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). El análisis se realizó en colaboración con el departamento de Muerte y Proliferación Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIB-CSIC) y se siguió el procedimiento descrito con anterioridad <sup>259</sup>.

## 13. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) INTRACELULARES

La estimación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) se realizó en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Para la medición *in vitro*, se sembraron 150.000 células PLC/PRF/5 en placas de 6 pocillos y se transfectaron con el siRNA control (siGL), de SLU7 (siSLU7) o de USP10 (siUSP10). Transcurrido el tiempo total de silenciamiento (48 horas), se añadió 50  $\mu$ M de la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA, *2',7'-dichlorofluorescin diacetate*) (6883; Sigma-Aldrich) y se incubaron las células durante 30 minutos a 37 °C. Tras dos lavados con DPBS, las células se tripsinizaron y se recogieron en DPBS. Estas muestras se colocaron en una placa de 96 pocillos negra de fondo transparente de Perkin-Elmer (Waltham, MA, EEUU) para medir la intensidad de la fluorescencia.

En el caso de las muestras de tejido hepático, se partió de aproximadamente 40 mg de tejido que fueron homogeneizados en tampón frío 40 mM Tris-HCl pH 7,4 (1:10 w/v) e incubados con 10  $\mu$ M de la sonda DCFDA en tampón Tris-HCl a 37 °C durante 35 minutos. Como control se incubó el homogeneizado con el mismo volumen de Tris-HCl.

En todas las muestras, tanto las procedentes de cultivo celular como las de tejido hepático de ratón, la fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm empleando un fluorímetro *Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader* de Tecan (Lyon, Francia). La cuantificación de la concentración de proteína para la normalización de la señal se realizó por el método de Bradford diluyendo las muestras en proporción 1:5 en agua.



## 14. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA DE LOS VECTORES REPORTEROS DE

### *HNF4 $\alpha$*

Para poder cuantificar la regulación de la actividad del promotor de HNF4 $\alpha$  de los vectores reporteros (promHNF4 $\alpha$ -12, promHNF4 $\alpha$ -6.7 y promHNF4 $\alpha$ -3) descritos en el apartado 3.3.2 de Materiales y métodos, se cuantificó la actividad del gen de la *LUCIFERASA*, mediante el kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (E2920; Promega). Brevemente, las células transfectadas simultáneamente durante 48 horas con los siRNA y los plásmidos correspondientes se lavaron con DPBS y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C hasta obtener el pellet celular. Éste se resuspendió en tampón de lisis pasiva (E1941; Promega) diluido 1x en agua, y las células se lisaron durante 30 minutos en un agitador rotatorio tipo noria a 4 °C. Seguidamente, las células se centrifugaron a máxima velocidad (14.000 rpm) durante 1 minuto a 4 °C para eliminar los desechos celulares, quedándonos con el sobrenadante y trabajando en hielo en todo momento. En una placa blanca de 96 pocillos para inmunoanálisis (10396181; Thermo Scientific), se añadieron 20  $\mu$ L de cada muestra y 50  $\mu$ L/pocillo del reactivo *Dual-Glo Luciferase Reagent*, incluido en el kit y reconstituido siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal de luminiscencia se obtuvo mediante lectura en un luminómetro *Orion L Microplate Luminometer* (Titertek Berthold, Pforzheim, Alemania). La cuantificación de la concentración de proteína para la normalización de la señal se realizó por el método de Bradford diluyendo las muestras en proporción 1:5 en agua.

## 15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism* versión 9.3.1. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media; *standard error of the mean*). En primer lugar, se estudió la normalidad de los datos mediante el Test *D'Agostino and Pearson*. Aquellos datos que seguían una distribución normal se compararon entre grupos mediante el test estadístico de dos colas T de *Student*. Por el contrario, los datos que no seguían una distribución normal se compararon entre grupos utilizando el test estadístico U de *Mann-Whitney*. La significación estadística se consideró de la siguiente manera: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . Las diferentes condiciones experimentales se estudiaron al menos por duplicado y los experimentos se repitieron al menos tres veces.



## **RESULTADOS**

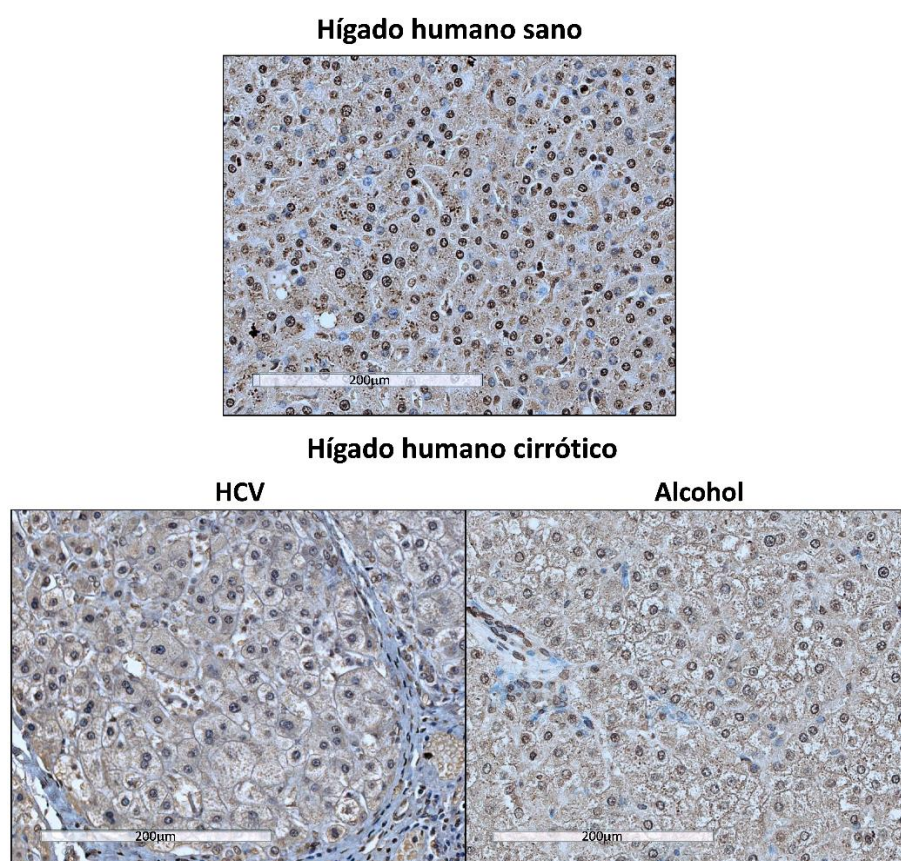
---



## 1. LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE SLU7 SE REDUCE CON EL DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO

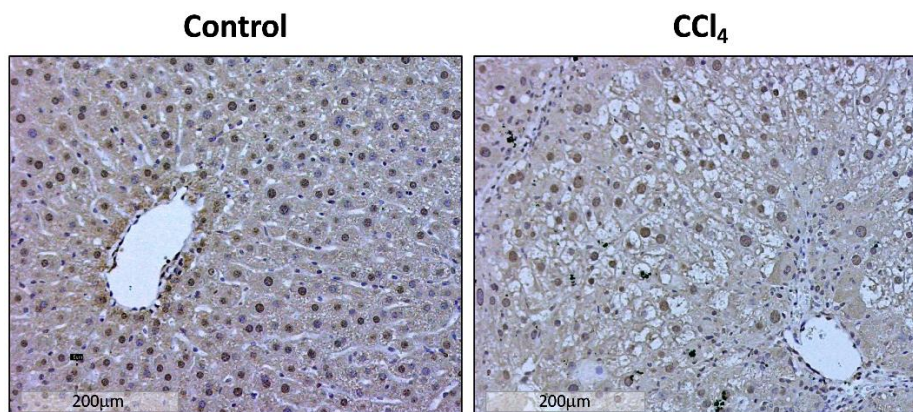
Estudios previos de nuestro grupo demostraron que la expresión del mRNA del factor de *splicing* SLU7 se reduce significativamente en la enfermedad hepática, incluyendo la cirrosis y el HCC <sup>124</sup>. Además, su silenciamiento en el hígado de los ratones resulta en la pérdida de las funciones metabólicas y sintéticas debido a una reprogramación del transcriptoma hepático maduro y diferenciado hacia uno de fenotipo fetal <sup>55</sup>. Por ello, la desregulación de SLU7 en el hígado dañado podría tener un papel en la desdiferenciación y en la pérdida de función hepatocelular observada durante el proceso de hepatocarcinogénesis <sup>4,32,91,93</sup>.

En el presente trabajo evaluamos, en primer lugar, los niveles de expresión de la proteína SLU7 en el hígado sano y de pacientes con enfermedad hepática crónica. El análisis por IHQ confirmó la reducción de la expresión nuclear hepatocelular de SLU7 en las muestras de tejido hepático de pacientes con cirrosis de diferente etiología, incluida la infección por el HCV o el abuso de alcohol (Figura 10).



**Figura 10.** La expresión de SLU7 se reduce en el hígado de pacientes con daño hepático crónico. Inmunohistoquímica de SLU7 en hígados de pacientes sanos y en hígados de pacientes con cirrosis por infección con el virus de la hepatitis C (HCV) o por abuso de alcohol. Los tejidos se contrastaron con hematoxilina y eosina. Barra de escala: 200 μm.

Del mismo modo, evaluamos los niveles de proteína SLU7 en un modelo de daño hepático crónico en ratón, inducido por tratamiento con 0,6  $\mu\text{L/g}$  de  $\text{CCl}_4$  por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 6,5 semanas. La medición de la expresión de SLU7 por IHQ reveló una disminución en los niveles nucleares de SLU7 en los hepatocitos de ratones con daño hepático crónico (Figura 11).



**Figura 11. La expresión de SLU7 se reduce en el hígado de ratones con daño hepático crónico.** Inmunohistoquímica de SLU7 en hígados de ratones con daño crónico inducido por administración intraperitoneal de 0,6  $\mu\text{L/g}$   $\text{CCl}_4$  diluido en aceite de maíz dos veces por semana durante 6,5 semanas. A los ratones control se les administró el volumen correspondiente del vehículo (aceite de maíz). Los tejidos se contrastaron con hematoxilina y eosina. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

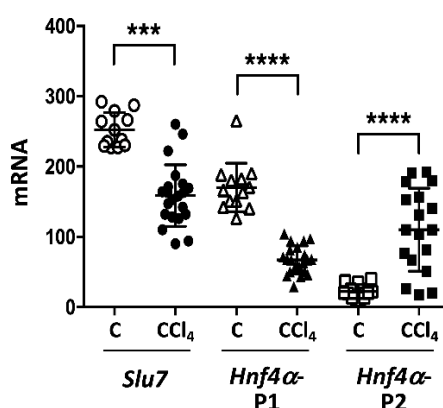
Así, confirmamos que la expresión de SLU7 en el hígado se reduce no solo a nivel de mRNA<sup>124</sup> sino también a nivel de proteína en la enfermedad hepática crónica, lo cual, en base a las alteraciones moleculares y fenotípicas que nuestro grupo ha demostrado que conlleva la disminución de la expresión de SLU7<sup>55</sup>, sugiere su participación en la pérdida de función del hígado enfermo.

## **2. LA DESREGULACIÓN DE SLU7 EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA SE ASOCIA CON LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *HNF4 $\alpha$***

El factor de transcripción *HNF4 $\alpha$*  es un regulador esencial de la diferenciación de los hepatocitos<sup>67</sup>. Como se ha explicado en el apartado de Introducción, se ha descrito que su expresión se encuentra reducida en la enfermedad hepática humana, incluyendo la hepatitis alcohólica<sup>98,189</sup>, la cirrosis<sup>93,104,191</sup> o el HCC<sup>191,193</sup>, así como en modelos animales de daño hepático<sup>96,104,189,191</sup>. Además, se ha descrito un cambio en el patrón de expresión de isoformas de *HNF4 $\alpha$*  desde el promotor P1 (característico del hepatocito adulto) hacia el promotor P2 (característico del hepatocito fetal y de las células transformadas) en muestras humanas de

HCC<sup>143,198</sup> y en hepatitis alcohólica<sup>98</sup>. En este sentido, nuestro grupo demostró que el silenciamiento de *Slu7* en el hígado sano de ratones induce una alteración en el patrón de expresión de *Hnf4α* desde el promotor P1 al promotor P2, favoreciendo la desdiferenciación de los hepatocitos<sup>55</sup>. Así, hipotetizamos que la desregulación de *SLU7* observada en la enfermedad hepática (apartado 1 de Resultados) podría estar relacionada con la alteración descrita en *HNF4α*.

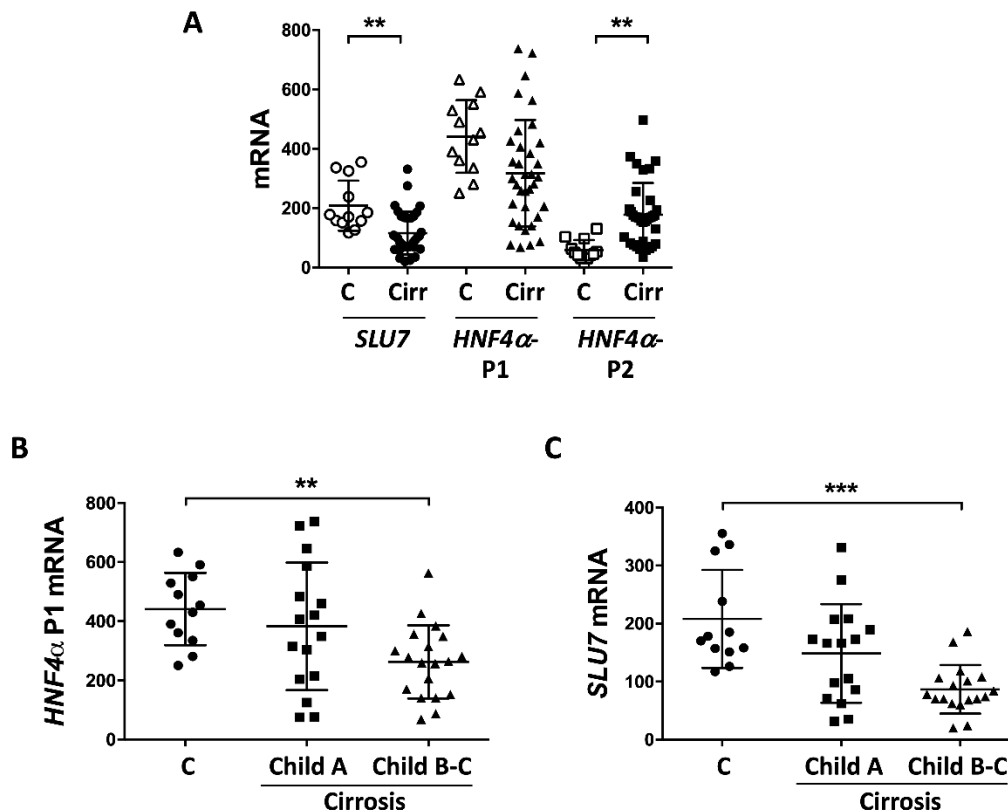
Para confirmarlo, en primer lugar, analizamos la expresión de *Hnf4α* en las muestras de tejido hepático de los ratones tratados con  $\text{CCl}_4$  como se describe en la Figura 11. El análisis de los niveles de mRNA mediante qPCR demuestra que, en los ratones tratados crónicamente con  $\text{CCl}_4$ , se produce no solo una disminución en los niveles de expresión de *Slu7*, sino también una alteración en el uso del promotor de *Hnf4α*. Así, se observa una disminución significativa en la expresión desde el promotor P1 (*Hnf4α*-P1) y un aumento, también significativo, en la expresión desde el promotor P2 (*Hnf4α*-P2) (Figura 12).



**Figura 12.** La reducción en la expresión de *Slu7* en el hígado de ratones con daño hepático crónico es paralela a un cambio en el uso del promotor de *Hnf4α*. Análisis por qPCR de los niveles de expresión del mRNA de *Slu7* y *Hnf4α* P1 y P2 en muestras de hígados de ratones con daño hepático crónico inducido por  $\text{CCl}_4$ , o en ratones control (C). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Del mismo modo, quisimos evaluar, a nivel transcripcional, la expresión de *HNF4α* en muestras de tejido hepático de pacientes con cirrosis. El análisis mediante qPCR confirmó que los niveles del mRNA de *SLU7* se reducen en el hígado cirrótico (Figura 13A), como ya habíamos demostrado<sup>124</sup>. Así mismo reveló la alteración paralela en el uso del promotor de *HNF4α* (Figura 13A). En concordancia con lo descrito en el modelo animal de daño hepático crónico (Figura 12), la actividad transcripcional desde el promotor P2 se induce significativamente en los pacientes con cirrosis (Figura 13A).

En cuanto a la transcripción desde el promotor *HNF4α*-P1, aunque la reducción no sea estadísticamente significativa, hay una clara tendencia a su inhibición en los hígados de un grupo de pacientes con cirrosis (Figura 13A). De hecho, esta tendencia se torna significativa cuando separamos a los pacientes cirróticos en función del índice Child-Pugh, sistema de clasificación empleado para evaluar el pronóstico de una enfermedad hepática crónica de acuerdo a la función hepática<sup>260</sup>. Así, y en concordancia con lo publicado anteriormente por nuestro grupo<sup>93</sup>, se observa que la expresión del mRNA de *HNF4α*-P1 disminuye en pacientes con enfermedad hepática más avanzada y función hepática más comprometida (Child-Pugh B-C) (Figura 13B). De acuerdo con ello, quisimos analizar también la expresión del mRNA de *SLU7* en función del grado de disfunción hepática. Del mismo modo, observamos una mayor reducción, estadísticamente significativa, en la expresión de *SLU7* en los pacientes con enfermedad hepática más avanzada (Child-Pugh B-C) (Figura 13C).



**Figura 13. La reducción en la expresión de *SLU7* en el hígado crónicamente dañado de pacientes se asocia con un cambio en el uso del promotor de *HNF4α*.** (A) Análisis por qPCR de los niveles de expresión de los mRNA de *SLU7* y *HNF4α* P1 y P2 en los hígados de pacientes sanos (n = 12) y de pacientes con cirrosis (n = 35). (B-C) Niveles de expresión del mRNA de *HNF4α* P1 (B) y de *SLU7* (C) en el hígado de pacientes sanos (n = 12) y de pacientes cirróticos clasificados según el índice Child-Pugh como Child-Pugh A (n = 16) y Child-Pugh B-C (n = 19). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Abreviaturas: C, control; Cirr, cirrosis.

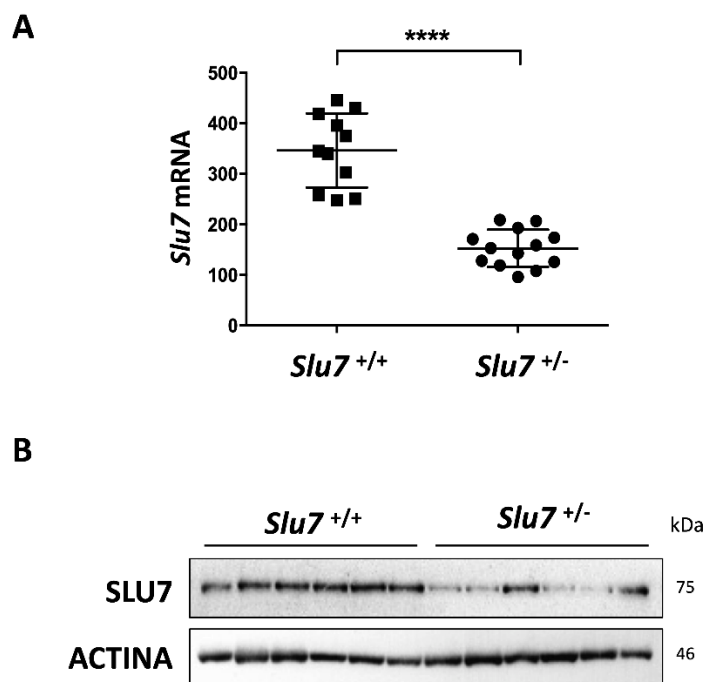


Por todo ello, nuestros datos demuestran que en el hígado crónicamente dañado tanto de pacientes como de ratones se produce una desregulación en la expresión de SLU7 paralela a la alteración en el uso del promotor de *HNF4α*, disminuyendo la expresión de las isoformas *HNF4α*-P1, normalmente expresadas en los hepatocitos adultos, y aumentando la expresión de *HNF4α*-P2, característico de un hígado fetal. Además, demostramos que, en pacientes, estas alteraciones transcripcionales en *SLU7* y en *HNF4α*-P1 se encuentran significativamente asociadas al grado de disfunción y daño en el hígado.

### 3. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE SLU7 SENSIBILIZA AL HÍGADO FRENTE AL DAÑO CRÓNICO

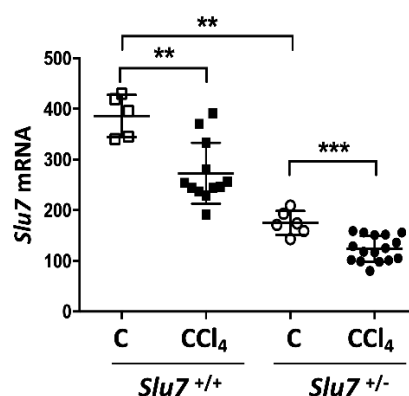
Los resultados hasta el momento sugieren que la desregulación de SLU7 durante el daño hepático crónico estaría contribuyendo a la desdiferenciación hepática que acompaña la progresión de la enfermedad. Para caracterizar la implicación de SLU7 en los mecanismos que subyacen a la patología hepática y estudiar los cambios fenotípicos asociados a la pérdida de SLU7, utilizamos un modelo de ratón transgénico con la expresión de SLU7 inhibida. Los ratones delecionados de *Slu7* (*Slu7*<sup>-/-</sup>) no son viables, debido a que no sobreviven al desarrollo embrionario (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2385598#phenotypesTab>), por ello utilizamos ratones haploinsuficientes para *Slu7* (*Slu7*<sup>+/-</sup>) que expresan SLU7 sólo desde uno de los dos alelos, mostrando así la mitad de la expresión de SLU7.

En primer lugar, confirmamos que la expresión de SLU7 tanto a nivel de mRNA como de proteína en los ratones haploinsuficientes *Slu7*<sup>+/-</sup> se encuentra reducida en comparación con los correspondientes ratones control, hermanos de camada, homocigotos para *Slu7* (*Slu7*<sup>+/+</sup>). Tanto el análisis de mRNA mediante qPCR (Figura 14A) como la detección de proteína por *Western blot* (Figura 14B) demuestran una disminución de alrededor del 50% de los niveles de SLU7 en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup>.



**Figura 14.** Niveles de expresión de SLU7 en los ratones haploinsuficientes *Slu7*<sup>+/-</sup>. Análisis de la expresión de SLU7 a nivel de mRNA mediante qPCR (**A**) y de proteína mediante *Western blot* (**B**) en los hígados de los ratones haploinsuficientes para *Slu7* (*Slu7*<sup>+/-</sup>) en comparación con los correspondientes controles, sus hermanos homocigotos para *Slu7* (*Slu7*<sup>+/+</sup>). La expresión de la actina se muestra como control de carga. Los datos de la gráfica están representados como la media  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

A continuación, establecimos el modelo de daño hepático crónico en estos ratones administrándoles por vía intraperitoneal una dosis de 0,6  $\mu$ L/g CCl<sub>4</sub> dos veces por semana durante 6,5 semanas. En coherencia con los resultados mostrados en la Figura 12, el daño por CCl<sub>4</sub> disminuyó de manera significativa la expresión del mRNA de *Slu7* analizada mediante qPCR en los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> homocigotos para *Slu7* (Figura 15). Además, estos niveles de expresión se redujeron también de forma significativa en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> heterocigotos para *Slu7* (Figura 15).

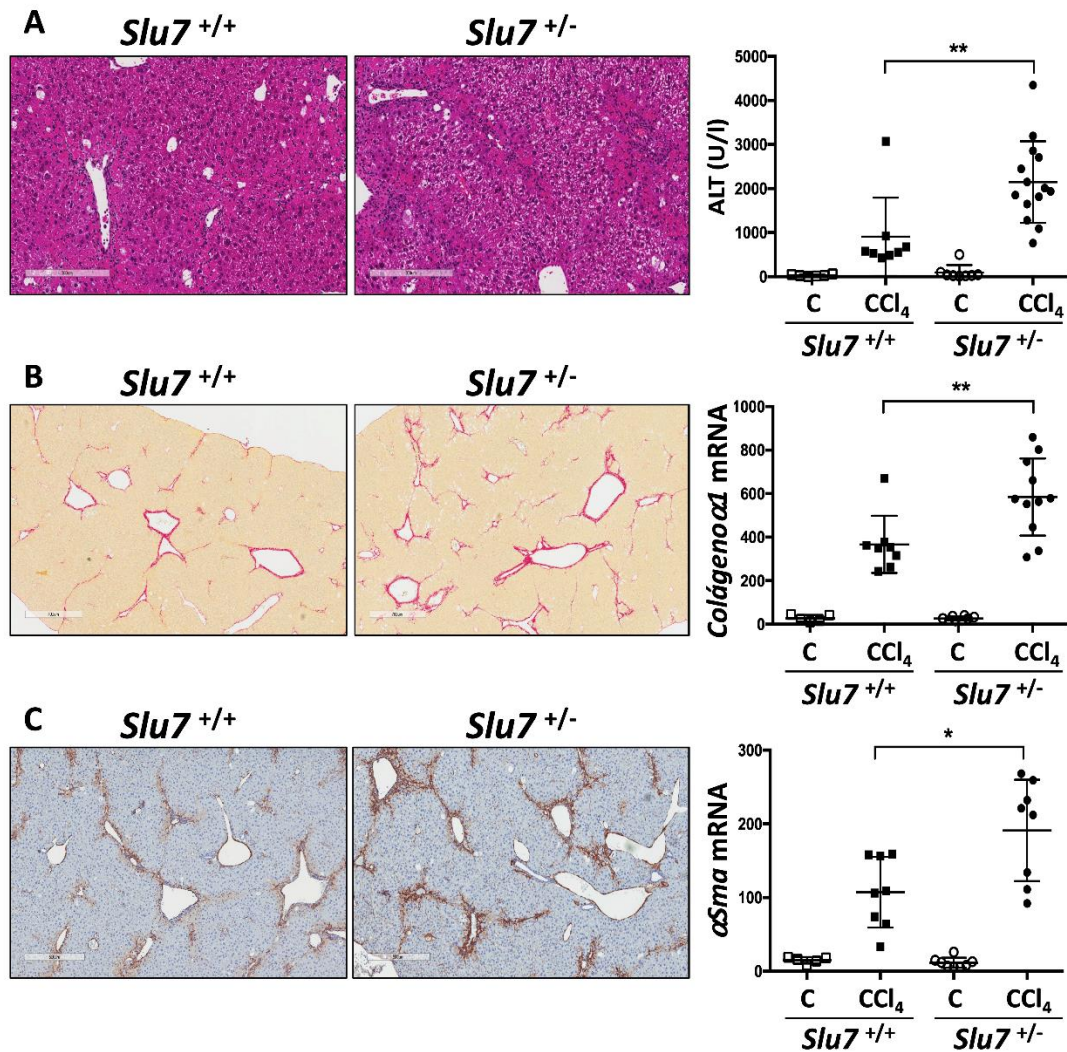


**Figura 15. Niveles de expresión de *Slu7* en los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub>.** Análisis de la expresión del mRNA de *Slu7* mediante qPCR en los hígados de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). Los datos están representados como la media ± SEM. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

Con el objetivo de caracterizar las alteraciones fenotípicas en el hígado asociadas a la falta de SLU7 durante el daño hepático, analizamos diferentes marcadores de daño en los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub>.

La tinción con H&E en secciones representativas de tejido hepático reveló áreas más grandes de parénquima dañado o necrosado en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> en comparación con sus hermanos controles *Slu7*<sup>+/+</sup> (Figura 16A). De acuerdo con ello, los niveles de transaminasas hepáticas en suero estaban significativamente inducidos en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> con respecto a los controles *Slu7*<sup>+/+</sup>, indicando que los niveles de daño en el hígado son más altos cuando la expresión de *Slu7* está reducida (Figura 16A).

Para evaluar el grado de desarrollo de fibrosis en el hígado, realizamos una tinción con rojo sirio. Las tinciones en secciones de tejido hepático demostraron que la fibrosis observada en los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> se incrementaba en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> al contener estos animales depósitos de colágeno formando puentes (Figura 16B). En paralelo, analizamos mediante qPCR los niveles del mRNA de *Colágeno α1*, demostrando un incremento significativo de su expresión en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> en comparación con los controles *Slu7*<sup>+/+</sup> (Figura 16B). Además, en concordancia con esto, analizamos el grado de activación de las células estrelladas hepáticas (HSC) productoras de la matriz extracelular, mediante el análisis de los niveles de α-SMA. La activación de estas células fue mayor en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tal y como se evidencia por las amplias áreas de tinción positiva de la proteína, así como por el aumento significativo de la expresión del mRNA de *αSma* (Figura 16C).



**Figura 16. Los ratones haploinsuficientes para *Slu7* son más sensibles al daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>.** Los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> recibieron por vía intraperitoneal una dosis 0,6  $\mu$ L/g CCl<sub>4</sub> diluido en aceite de maíz, o el correspondiente volumen del vehículo aceite de maíz (Controles), dos veces por semana durante 6,5 semanas. **(A)** Tinción de hematoxilina y eosina en secciones representativas del hígado de ratones tratados con CCl<sub>4</sub> y medición de los niveles de la transaminasa hepática alanina aminotransferasa (ALT) en suero. Barra de escala: 300  $\mu$ m. **(B)** Tinción con rojo sirio en secciones representativas de hígado y análisis por qPCR de la expresión del mRNA de Colágeno  $\alpha 1$ . Barra de escala: 700  $\mu$ m. **(C)** Inmunohistoquímica de  $\alpha$ SMA y niveles de expresión de su mRNA por qPCR. Barra de escala: 500  $\mu$ m. Los datos de las gráficas se representan como media  $\pm$  SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. Abreviaturas: U/l, unidades/litro.

En conjunto, estos resultados indican que la reducción en la expresión de SLU7 hace al hígado más sensible frente al desarrollo del daño crónico debido al aumento de la muerte de los hepatocitos y al desarrollo de fibrosis.

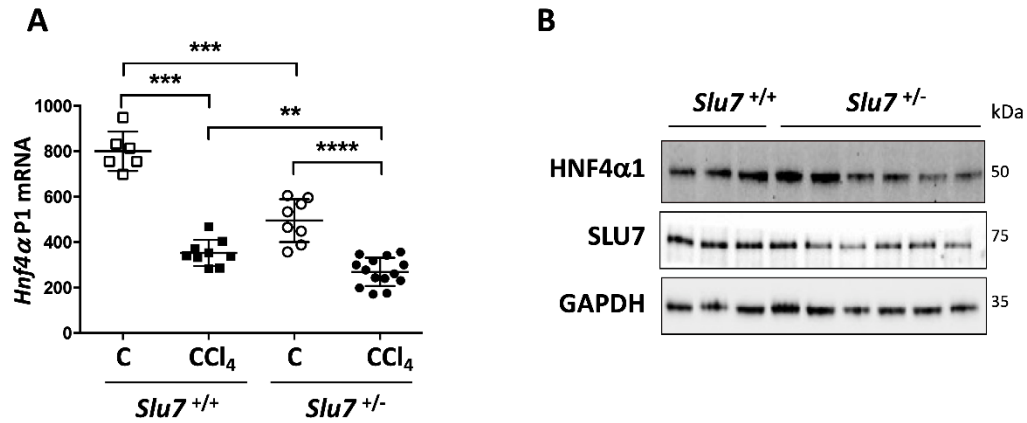
#### 4. SLU7 ES NECESARIO PARA PRESERVAR LA DIFERENCIACIÓN DEL HÍGADO DURANTE EL DAÑO CRÓNICO

El daño hepático crónico está asociado a la pérdida de funciones del hígado debido a dos eventos importantes: la muerte del parénquima hepático y la desdiferenciación de los hepatocitos remanentes, con una menor expresión de genes hepato-específicos y una reactivación de isoformas fetales<sup>91,93,96,112</sup>. En trabajos previos de nuestro grupo hemos demostrado que SLU7 tiene un papel crítico en el mantenimiento de la expresión del transcriptoma hepático maduro y funcional, y su silenciamiento altera la expresión, entre otros, de *Hnf4α*, regulador clave de la diferenciación del hígado<sup>55</sup>. De acuerdo con ello, los datos presentados en este trabajo muestran que, en el hígado dañado de los pacientes y en los modelos de ratón, la expresión de SLU7 disminuye durante el daño hepático crónico en paralelo a una desregulación en el uso del promotor de *HNF4α*, favoreciendo la expresión de isoformas fetales u oncogénicas. Por todo ello, decidimos caracterizar el papel que SLU7 ejerce sobre la desdiferenciación del hígado durante el daño utilizando el modelo de ratones haploinsuficientes de *Slu7*.

##### 4.1. La haploinsuficiencia de *Slu7* exagera la alteración en el uso del promotor de *Hnf4α*

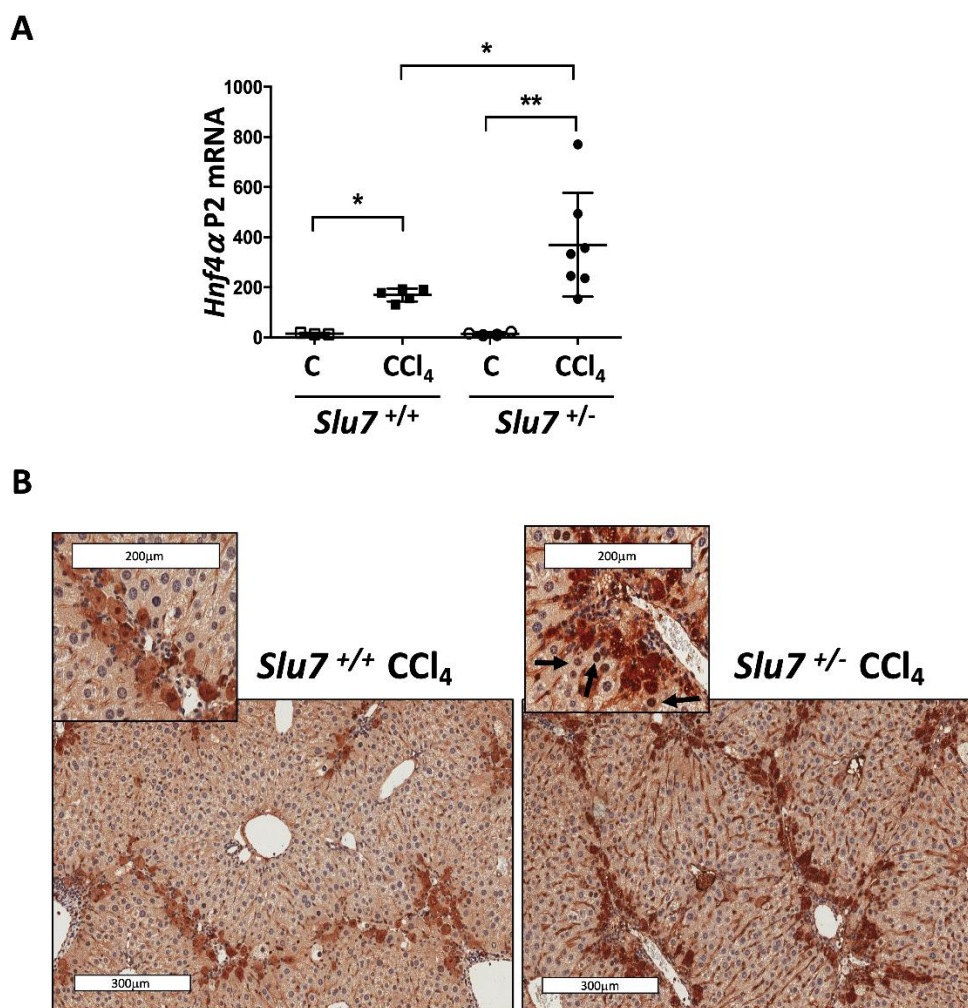
Como se ha mencionado previamente, el factor de transcripción HNF4α, regulador clave de la expresión génica relacionada con la diferenciación y función hepáticas, se expresa en el hígado adulto a partir del promotor P1 y en el hígado fetal a partir del promotor P2<sup>134,261</sup>. En base a los resultados observados en las Figuras 12 y 13, en donde demostramos que se produce una alteración en el uso del promotor de *HNF4α* en el hígado crónicamente dañado de pacientes y en un modelo animal, en paralelo a una desregulación en la expresión de *SLU7*, evaluamos cuál es el papel que puede tener SLU7 en esta regulación de HNF4α. Para ello, analizamos el patrón de expresión de HNF4α en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup> basales y tras la inducción de daño hepático crónico.

El análisis mediante qPCR de la expresión del mRNA de las isoformas de *Hnf4α* derivadas del promotor P1 (*Hnf4α*-P1) reveló una inhibición muy significativa en los ratones control *Slu7*<sup>+/-</sup> que se hace más llamativa cuando estos ratones están tratados con CCl<sub>4</sub> (Figura 17A). Esto se acompañó de una disminución en los niveles de expresión de la proteína HNF4α1 en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> con respecto a los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> que fue confirmada por *Western blot* (Figura 17B).



**Figura 17. La haploinsuficiencia de *Slu7* inhibe la expresión de HNF4α desde el promotor P1. (A)** Análisis por qPCR de los niveles de expresión del mRNA de las isoformas de *Hnf4α* expresadas desde el promotor P1 (*Hnf4α*-P1), en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). **(B)** Análisis por *Western blot* de la proteína HNF4α1 derivada del promotor P1 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup>. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control de la haploinsuficiencia de los ratones y de GAPDH como control de carga. Los datos de la gráfica están representados como la media ± SEM. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001.

Por otra parte, el análisis de la expresión de las isoformas de HNF4α generadas a partir del promotor P2 reveló una inducción significativa de los niveles del mRNA cuantificados por qPCR en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub> con respecto a la inducción observada en los ratones control (Figura 18A). Además, la detección por IHQ de las proteínas de HNF4α derivadas del promotor P2 reveló niveles mayores de estas isoformas en los núcleos de los hepatocitos de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub> (Figura 18B).

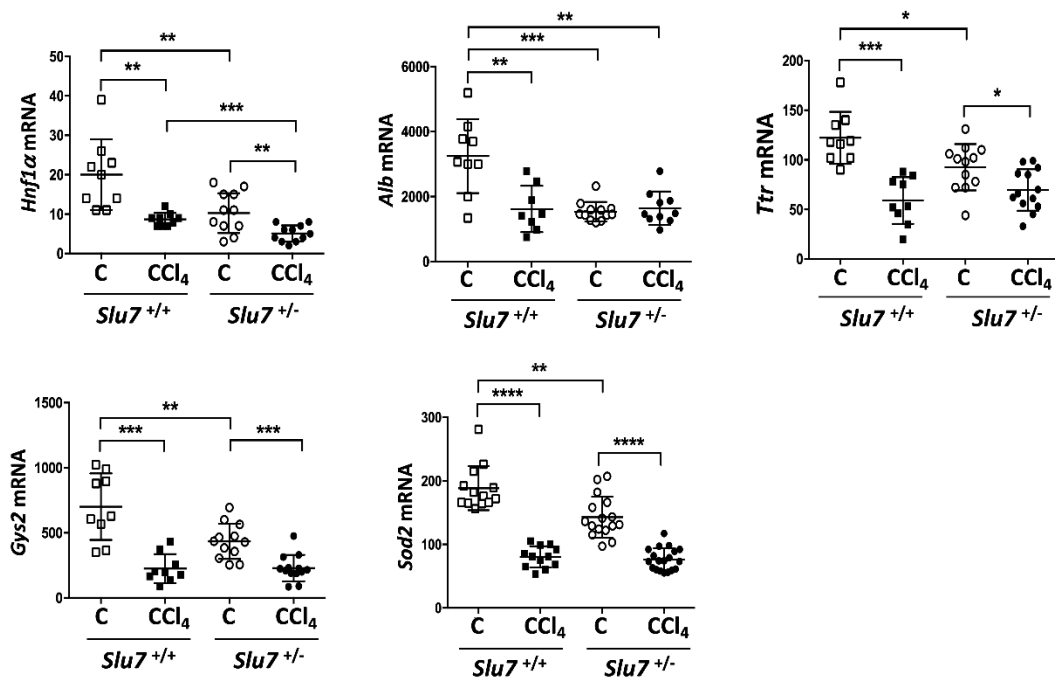


**Figura 18. La haploinsuficiencia de *Slu7* favorece la inducción de la expresión de HNF4α desde el promotor P2. (A)** Análisis por qPCR de los niveles de expresión del mRNA de las isoformas de *Hnf4α* expresadas desde el promotor P2, en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). **(B)** Inmunohistoquímica de las isoformas de HNF4α derivadas de P2 en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados como en A. Barra de escala: 300 μm y ampliificación a 200 μm para destacar la tinción de HNF4α P2 en los núcleos de los hepatocitos de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (flechas). Los datos de la gráfica están representados como la media ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

Nuestros resultados muestran que la alteración en el uso del promotor P1/P2 de *HNF4α* observada en los ratones tratados con CCl<sub>4</sub> se encuentra significativamente exacerbada en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup>. Estos resultados sugieren que la expresión de SLU7 participa en el control del correcto uso de los promotores de *HNF4α*.

#### 4.2. La haploinsuficiencia de *Slu7* promueve la inhibición de la expresión de genes hepato-específicos

La alteración en la expresión de HNF4 $\alpha$  que supone la haploinsuficiencia de *Slu7* podría participar en la pérdida de función del hígado. Para comprobar esto, analizamos el impacto de esta desregulación sobre la expresión de genes hepato-específicos dianas de HNF4 $\alpha$ . El análisis mediante qPCR reveló que los niveles de expresión del mRNA de genes codificantes para el factor de transcripción HNF1 $\alpha$ <sup>170</sup>, para las proteínas plasmáticas de síntesis hepática ALB<sup>192</sup> y TTR<sup>178</sup>, y para las enzimas GYS2<sup>175</sup> y SOD2<sup>68</sup>, se encuentran significativamente disminuidos en los hígados de los ratones tratados de manera crónica con CCl<sub>4</sub> (Figura 19). Además, de acuerdo con la reducción observada en la expresión del mRNA de *Hnf4 $\alpha$ -P1* (Figura 17), sus dianas *Hnf1 $\alpha$* , *Alb*, *Ttr*, *Gys2* y *Sod2* se encuentran significativamente reducidas de manera basal en los hígados de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (Figura 19).



**Figura 19. La haploinsuficiencia de *Slu7* exacerba la caída de genes hepato-específicos.** Análisis por qPCR de los niveles del mRNA de los genes hepato-específicos *Hnf1 $\alpha$* , *Alb*, *Ttr*, *Gys2* y *Sod2* en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001.

Estos resultados confirman que SLU7 participa en el mantenimiento de la diferenciación de los hepatocitos al controlar la expresión de genes hepato-específicos posiblemente a través de la correcta regulación de HNF4 $\alpha$ . Por ello, estas alteraciones podrían estar participando en la pérdida de función hepática observada durante el daño.

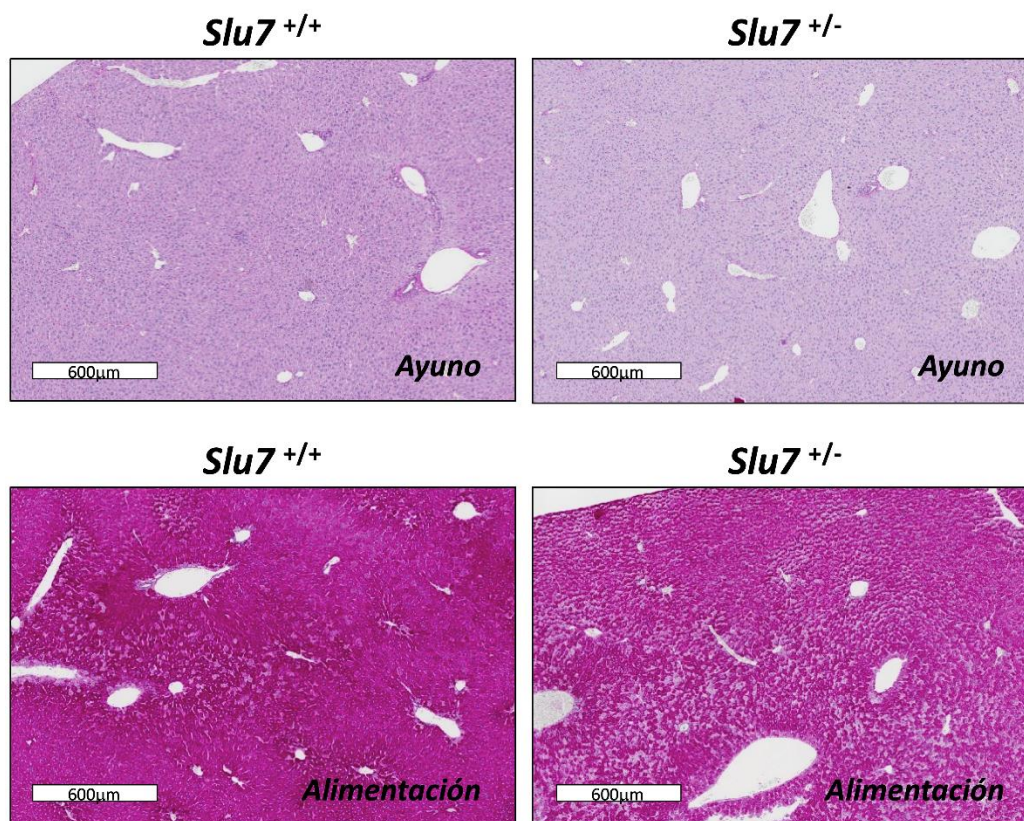


## 5. SLU7 ES NECESARIO PARA MANTENER UNA CORRECTA FUNCIÓN HEPÁTICA

En base a los resultados anteriores, estudiamos qué consecuencias funcionales tiene la alteración en la expresión de estos genes y qué papel puede desempeñar SLU7 en la pérdida de función hepática durante el daño. Para ello, evaluamos la actividad de algunas funciones hepáticas relevantes en los hígados de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup> en condiciones basales y tras la inducción de un daño crónico.

### 5.1. SLU7 regula el correcto almacenamiento de glucógeno en el hígado

Una de las funciones más importantes que realiza el hígado es la regulación del metabolismo de hidratos de carbono. En este sentido, el hígado almacena la glucosa que llega desde la sangre en forma de glucógeno a través de la enzima GYS2<sup>262</sup>. En trabajos anteriores, nuestro grupo demostró que el silenciamiento específico de *Slu7* en el hígado sano de los ratones disminuye la expresión del mRNA de esta enzima y el almacenamiento intrahepático de glucógeno<sup>55</sup>. En concordancia con esto, nuestros datos muestran que la expresión del mRNA de *Gys2* se inhibe también en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (Figura 19). Por ello, mediante tinción de PAS, analizamos los depósitos de glucógeno intrahepáticos en ambos genotipos de ratones (*Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup>), tanto en condiciones de ayuno durante toda la noche (período normal de alimentación de los ratones) o tras alimentación normal. Las tinciones en secciones representativas de hígado muestran que los niveles de almacenamiento de glucógeno son inferiores en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup>, tanto en condiciones de ayuno como de alimentación (Figura 20).



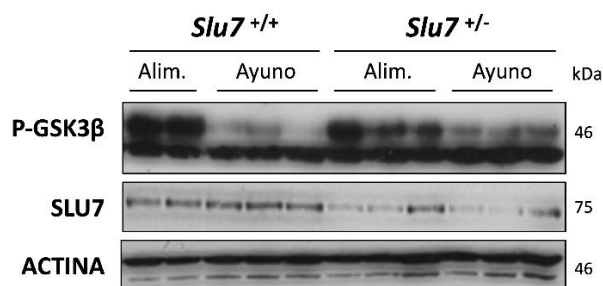
**Figura 20.** La haploinsuficiencia de *Slu7* reduce los niveles de almacenamiento de glucógeno intrahepático. Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) para la detección de glucógeno en secciones representativas del hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> en condiciones de alimentación o de ayuno durante toda la noche. Barra de escala: 600  $\mu$ m.

Estos resultados confirman que SLU7 tiene un papel esencial en la regulación del almacenamiento de glucógeno en el hígado.

## 5.2. SLU7 es necesario para mantener una correcta respuesta a la insulina en el hígado

El almacenamiento de glucógeno en el hígado se produce a través de la enzima GYS2 en respuesta a la insulina. En relación a ello, se ha descrito que los ratones delecionados para *Gys2* (*Gys2*<sup>-/-</sup>) presentan resistencia a la insulina<sup>263</sup>, y nuestro grupo ha demostrado que el silenciamiento específico de *Slu7* en el hígado de ratones genera resistencia a esta hormona a través de un mecanismo que implica la alteración en la vía de señalización intracelular de la fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K-AKT, *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) en el hígado, al no poder inducirse la fosforilación de AKT ni de su diana, la glucógeno sintasa quinasa 3  $\alpha/\beta$  (GSK3  $\alpha/\beta$ , *glycogen synthase kinase 3  $\alpha/\beta$* ) en respuesta a la alimentación<sup>55</sup>. Al no poder fosforilarse esta enzima, continúa en la forma activa, inactivando

a su vez a la GYS2. En base a ello, quisimos estudiar la funcionalidad de esta vía en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup> analizando, por *Western blot*, los niveles de fosforilación de la proteína GSK3 en el hígado. Como se observa en la Figura 21, los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tienen impedida la correcta fosforilación de esta proteína en respuesta a la alimentación.



**Figura 21. Los ratones haploinsuficientes para *Slu7* presentan resistencia a la insulina.** Análisis por *Western blot* de los niveles de fosforilación de la proteína GSK3β en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> ayunados durante toda la noche o tras realimentación durante 4 horas. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control de la haploinsuficiencia de los ratones y de actina como control de carga. Abreviaturas: Alim., alimentación.

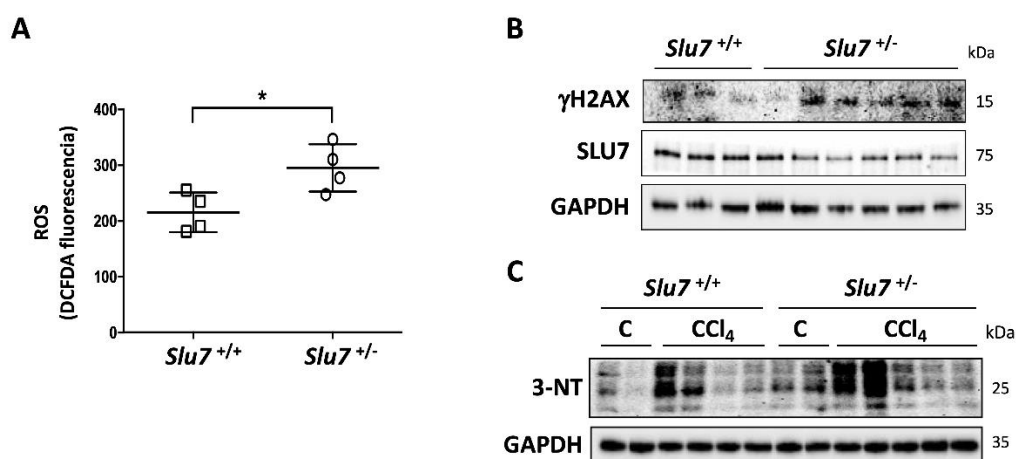
Estos resultados confirman que los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> presentan resistencia a la insulina. Además, dado que la fosforilación de GSK3 es necesaria para la actividad de la GYS2, el impedimento de la fosforilación en los ratones haploinsuficientes para *Slu7* justifica también la menor acumulación de glucógeno observada en los hígados de estos ratones. Por otro lado, la resistencia a la insulina, observada en los ratones haploinsuficientes de *Slu7*, podría estar también relacionada con la expresión de variantes de HNF4α generadas desde el promotor P2, asociación descrita en el hígado humano<sup>187</sup>.

### 5.3. SLU7 protege al hígado frente al estrés oxidativo

Como se ha descrito recientemente, el glucógeno, además de su conocida función como nutriente, tiene un papel como regulador central del metabolismo y el envejecimiento, actuando como un protector frente al estrés oxidativo<sup>264</sup>. Por otro lado, la enzima SOD2, diana de HNF4α, tiene un papel directo en la protección frente al daño oxidativo como se describe en los ratones haploinsuficientes para *Sod2* (*Sod2*<sup>+/-</sup>)<sup>265</sup>. Teniendo en cuenta estas premisas, y los resultados en relación a la menor expresión de la enzima antioxidante *Sod2* (Figura 19) y a los menores niveles de almacenamiento de glucógeno en nuestros ratones haploinsuficientes para *Slu7* (Figura 20), decidimos analizar los niveles de estrés oxidativo en el hígado de estos ratones. Para ello, cuantificamos, mediante fluorescencia, los niveles de especies reactivas de

oxígeno (ROS), siendo significativamente superiores en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> en condiciones basales (Figura 22A). Estos resultados están en consonancia con nuestros datos sobre la inducción de estrés oxidativo tras el silenciamiento de *Slu7* en células de HCC humanas y en el hígado de los ratones silenciados para SLU7<sup>56,211</sup>.

Como resultado del estrés oxidativo generado, detectamos, mediante *Western blot*, por un lado, un aumento en los niveles de la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX) en los hígados de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (Figura 22B), que se corresponde con un incremento en el nivel de daño al DNA mediado por ROS<sup>266</sup>. Así mismo, detectamos una mayor acumulación de proteínas nitradas mediante un anticuerpo anti-3-nitrotirosina (3-NT, *3-Nitrotyrosine*), en los hígados de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub> (Figura 22C), reflejando un aumento de la adición de grupos de nitrógeno a los residuos de tirosina libres de las proteínas por acción del estrés oxidativo, concretamente mediante moléculas reactivas de peroxinitrito<sup>267-271</sup>.



**Figura 22. La haploinsuficiencia de *Slu7* induce estrés oxidativo, daño asociado al DNA y nitración de proteínas.** (A) Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda 2', 7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup>. (B) Análisis por *Western blot* de los niveles de fosforilación de la histona  $\gamma$ H2AX en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup>. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control de la haploinsuficiencia de los ratones y de GAPDH como control de carga. Se representan las mismas muestras analizadas en la Figura 17. (C) Detección por *Western blot* de proteínas nitradas (anti-3-nitrotirosina, 3-NT) en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). Se muestra GAPDH como control de carga. Los datos de la gráfica están representados como la media  $\pm$  SEM. \**P* < 0.05.

#### 5.4. SLU7 es necesario para el correcto catabolismo de las inmunoglobulinas

Entre las múltiples funciones catabólicas del hígado, aunque poco estudiada, se encuentra el catabolismo de las inmunoglobulinas<sup>272-274</sup>. La hiperglobulinemia es una característica de

pacientes con enfermedad hepática crónica <sup>275-278</sup>, y se ha descrito también en modelos animales de daño hepático crónico <sup>276</sup>. Se ha postulado que, debido a la disfunción hepática en pacientes con enfermedad hepática severa, la eliminación de Inmunoglobulinas G (IgG) de la circulación sanguínea se encuentra seriamente comprometida <sup>279</sup>.

En base a esto, analizamos los niveles de IgG en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup>. En los resultados por *Western blot* detectamos una acumulación de IgG en el hígado de los ratones tratados de manera crónica con CCl<sub>4</sub> (Figura 23) y, aumentada considerablemente, en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub> (Figura 23).



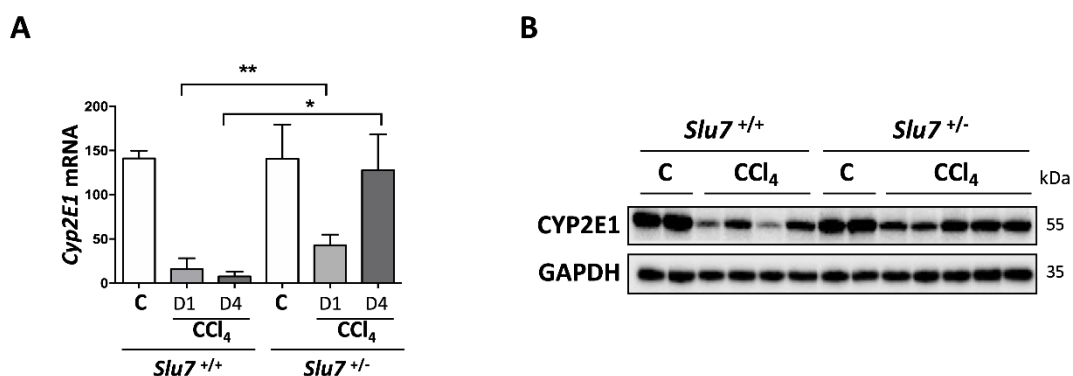
**Figura 23. Los ratones haploinsuficientes para *Slu7* tienen impedido el catabolismo de inmunoglobulinas.** Detección por *Western blot* de la acumulación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas G (IgG) en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). Se muestra GAPDH como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 22C.

Estos resultados confirman una vez más el importante papel de SLU7 en el mantenimiento de la correcta función del hígado, eliminando, en este caso, las IgG de la circulación sistémica.

### 5.5. SLU7 es necesario para la correcta expresión del citocromo CYP2E1 en respuesta al daño

El hígado tiene un papel característico en la biotransformación de xenobióticos a través del sistema del CYP450, bien para su detoxificación del organismo o bien para su activación. Algunas toxinas como el CCl<sub>4</sub> se metabolizan en el retículo endoplasmático, principalmente mediante el Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia E Miembro 1 (CYP2E1, *cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*), lo cual conduce a la bioactivación de la molécula al radical libre triclorometilo (CCl<sub>3</sub><sup>\*</sup>). Esta reacción es el principal factor involucrado en la hepatotoxicidad por CCl<sub>4</sub> <sup>280</sup>. Consecuentemente, los ratones delecionados de *Cyp2e1* (*Cyp2e1*<sup>-/-</sup>) son resistentes a la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> <sup>281</sup>, mientras que la inducción de *Cyp2e1* como consecuencia de la administración de etanol, potencia la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> <sup>281-283</sup>. Además, se ha demostrado que la administración de CCl<sub>4</sub> inactiva y

desestabiliza la proteína CYP2E1, induciendo su degradación e inhibiendo su transcripción<sup>283,284</sup>. De acuerdo con todo ello, y con la mayor sensibilidad al daño de los ratones haploinsuficientes *Slu7*<sup>+/-</sup>, analizamos los niveles de expresión de CYP2E1 en nuestro modelo de daño hepático. El análisis tanto de la transcripción de *Cyp2e1* por qPCR (Figura 24A) como de la expresión de la proteína por *Western blot* (Figura 24B), confirmó la inhibición de su expresión en los ratones control *Slu7*<sup>+/+</sup> tras el tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Cabe destacar que los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> presentan una expresión significativamente mantenida de los niveles de CYP2E1, tanto a nivel de mRNA (Figura 24A) como de proteína (Figura 24B), sugiriendo que la mayor hepatotoxicidad que presentan los ratones haploinsuficientes podría estar mediada por una mayor bioactivación del CCl<sub>4</sub>.

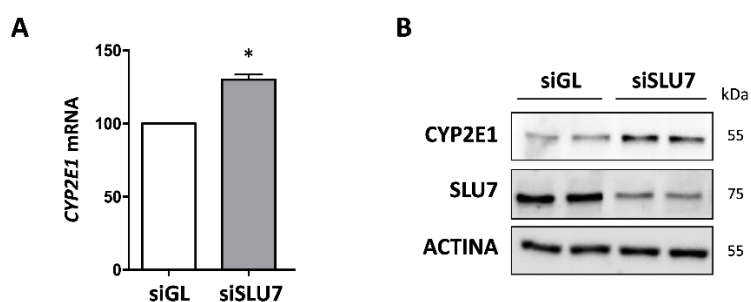


**Figura 24. Los ratones haploinsuficientes de *Slu7* mantienen niveles elevados de la enzima CYP2E1 tras el daño. (A)** Medición por qPCR de los niveles del mRNA de *Cyp2e1* en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>, o en ratones control (C). Los animales fueron sacrificados a día 1 (D1) o a día 4 (D4) tras la última dosis recibida. **(B)** Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína CYP2E1 en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados como en A y sacrificados a D1 tras la última dosis. Se muestra GAPDH como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 22C. Los datos de las gráficas están representados como la media ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

Así mismo, se ha descrito que el incremento en la expresión de CYP2E1 resulta en la generación de mayores niveles de estrés oxidativo<sup>285-287</sup>, de forma que, la expresión mantenida de CYP2E1 en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con CCl<sub>4</sub> podría contribuir a los mayores niveles de ROS y de estrés nitrosativo detectados en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (Figura 22).

Llamativamente, nuestros experimentos *in vitro* confirmaron el importante papel de SLU7 en la regulación de la expresión de CYP2E1. Así, el silenciamiento de SLU7 en la línea de HCC humano HepG2 indujo, de forma significativa, los reducidos niveles basales de expresión de CYP2E1 a nivel de mRNA (Figura 25A). De acuerdo con ello, el silenciamiento de SLU7 en la

línea hepatocelular HepaRG, en condiciones de diferenciación hacia hepatocitos, fue suficiente para inducir la expresión de CYP2E1 a nivel de proteína (Figura 25B).



**Figura 25. El silenciamiento de SLU7 en células hepáticas promueve la expresión de CYP2E1. (A)** Niveles de expresión del mRNA de *CYP2E1* analizados mediante qPCR en tres ensayos independientes realizados por duplicado en células HepG2 transfectadas con el siRNA control (siGL) o siRNA específico para silenciar la expresión de SLU7 (siSLU7) durante 72h. **(B)** Análisis de los niveles de la proteína CYP2E1 mediante *Western blot* en células HepaRG diferenciadas a las 72 horas de la transfección con siGL o con siSLU7. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de actina como control de carga. Los datos de la gráfica están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

El conjunto de estos resultados demuestra que SLU7 es un factor central y relevante para preservar la diferenciación y función hepáticas, y para proteger al hígado frente al daño crónico.

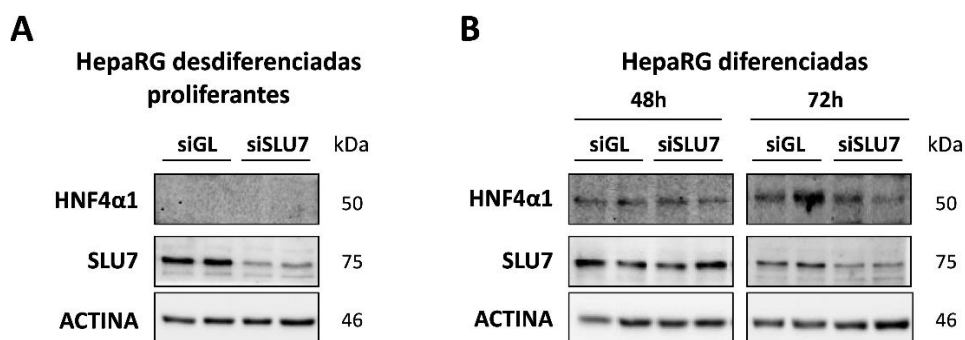
## 6. SLU7 ES NECESARIO PARA CONTROLAR LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA HNF4 $\alpha$ 1

Nuestros datos muestran el papel central de SLU7 en el mantenimiento de la identidad hepática. Muchos de estos resultados podrían depender de la correcta expresión del factor de transcripción HNF4 $\alpha$ , que hemos demostrado que depende de SLU7. Por todo ello, decidimos continuar caracterizando los mecanismos a través de los cuales SLU7 regula la expresión de HNF4 $\alpha$ .

### 6.1. SLU7 es necesario para mantener la expresión post-transcripcional de HNF4 $\alpha$ 1 de manera autónoma en células hepáticas

En primer lugar, analizamos el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre la expresión de la isoforma mayoritaria de HNF4 $\alpha$  derivada de la actividad del promotor P1 (HNF4 $\alpha$ 1) en células hepáticas humanas en cultivo. Como primera elección, utilizamos las células HepaRG, anteriormente mencionadas, como ejemplo de hepatocitos diferenciados. Sin embargo, la

expresión de HNF4 $\alpha$ 1 en estas células no se detecta cuando todavía están en condiciones desdiferenciadas proliferantes (Figura 26A), y sólo es detectable cuando las células están totalmente confluentes y tras el período de 15 días de diferenciación (Figura 26B), condiciones en las que la eficiencia de transfección y el silenciamiento de SLU7 son muy variables entre diferentes experimentos y en algunos casos no perceptibles a las 48 horas (Figura 26B).

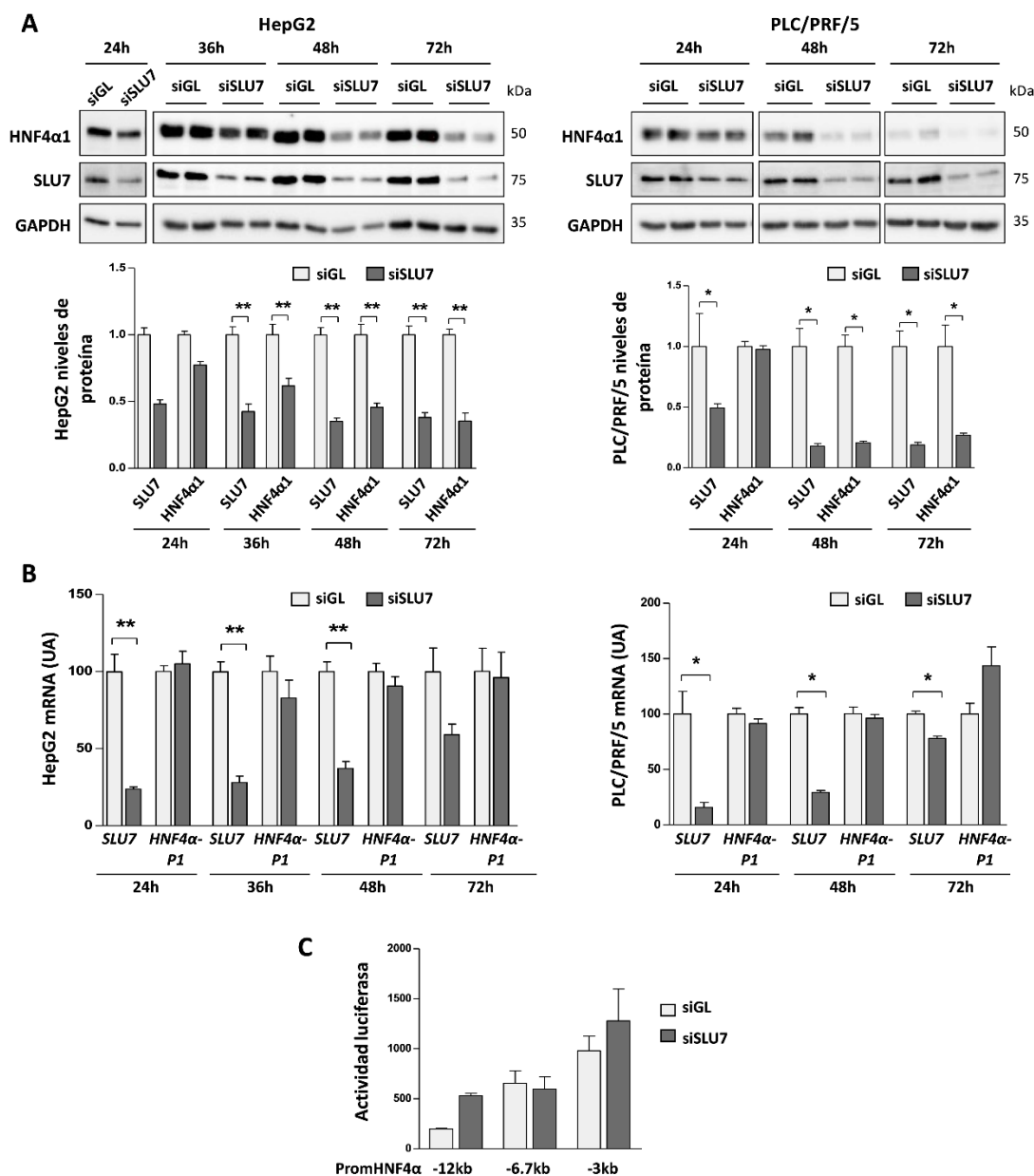


**Figura 26. Expresión de HNF4 $\alpha$ 1 en células HepaRG proliferantes o diferenciadas. (A)** Análisis de los niveles de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 mediante *Western blot* en células HepaRG proliferantes a las 72 horas de la transfección con el siRNA control (siGL) o con siSLU7. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de actina como control de carga. **(B)** Análisis de los niveles de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 mediante *Western blot* en células HepaRG diferenciadas a las 48 o 72 horas de la transfección con siGL o con siSLU7. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de actina como control de carga.

A continuación, evaluamos el efecto del silenciamiento de SLU7 en las líneas de HCC humano HepG2 y PLC/PRF/5, con una expresión de HNF4 $\alpha$ 1 mucho más fácilmente detectable y más fáciles de manejar experimentalmente. Como se observa en la Figura 27A, ya a las 24 horas de la transfección con el siSLU7, ambas líneas celulares presentan una reducción en la expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1, que es muy significativa a las 36 horas (HepG2) y 48 horas (PLC/PRF/5) de silenciamiento. Llamativamente, cuando analizamos los niveles de mRNA, observamos que la expresión de *HNF4 $\alpha$ 1* desde el promotor P1 no se ve significativamente alterada (Figura 27B).

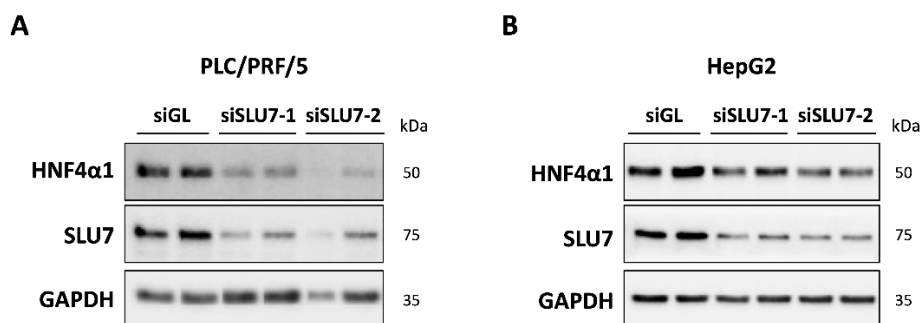
Con el objetivo de descartar una regulación transcripcional de SLU7 sobre *HNF4 $\alpha$* , utilizamos tres construcciones con fragmentos de 12 kb, 6,7 kb y 3 kb de la región promotora del gen *HNF4 $\alpha$* , fusionadas al gen de la *luciferasa*. La medición de la actividad luciferasa en las células HepG2 transfectadas con los plásmidos a las 48 horas del silenciamiento de SLU7 no reveló inhibición en la expresión del promotor en ninguno de los tres casos (Figura 27C). De este modo, confirmamos que SLU7 ejerce un papel sobre la regulación de la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 a nivel de proteína de manera independiente a su transcripción.





**Figura 27. SLU7 regula la expresión post-transcripcional de HNF4 $\alpha$ 1 en células de HCC humano HepG2 y PLC/PRF/5. (A)** Análisis de los niveles de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 mediante *Western blot* en células PLC/PRF/5 y HepG2 a 24, 36, 48 o 72 horas de la transfección con el siRNA control (siGL) o con siSLU7. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga. Los niveles de proteína de SLU7 y de HNF4 $\alpha$ 1 fueron cuantificados en tres experimentos independientes con duplicados biológicos utilizando *Image J software* (histogramas mostrados bajo los *Western blot*). **(B)** Análisis por qPCR de la expresión del mRNA de las isoformas de *HNF4 $\alpha$*  derivadas del promotor P1 y del mRNA de *SLU7* en tres ensayos independientes realizados por duplicado en PLC/PRF/5 o HepG2 como se describe en el apartado A. **(C)** Cuantificación de la actividad luciferasa derivada de la expresión de los plásmidos que contienen el promotor del gen *HNF4 $\alpha$*  en células HepG2 transfectadas con siGL o siSLU7 durante 48 horas. Se emplearon tres construcciones de plásmido diferentes (prom*HNF4 $\alpha$* -12kb, prom*HNF4 $\alpha$* -6.7kb, prom*HNF4 $\alpha$* -3kb) que se transfectaron por duplicado. Se muestran los valores normalizados por la cantidad de proteína. Los datos de las gráficas están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias.

Este punto, decidimos confirmar la especificidad de estos resultados, utilizando otro siRNA específico de SLU7 para silenciar la expresión de SLU7. Como se observa en la Figura 28, tanto en las células PLC/PRF/5 (Figura 28A) como en HepG2 (Figura 28B) a las 48 horas tras el silenciamiento de SLU7 con 2 duplex siRNA dirigidos a diferentes regiones de SLU7, se inhibe la expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1.

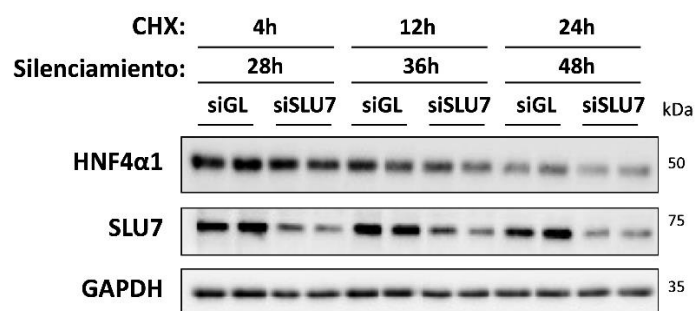


**Figura 28. SLU7 regula la expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 de manera autónoma en la célula.** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de la isoforma HNF4 $\alpha$ 1 derivada del promotor P1 en células PLC/PRF/5 (A) y HepG2 (B) 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL) o con dos siRNA específicos para SLU7 (siSLU7-1 y siSLU7-2). Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga.

En conjunto, estos resultados sugieren que SLU7 es necesario para mantener la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 de forma autónoma en las células hepáticas por un mecanismo post-transcripcional.

## 6.2. SLU7 controla la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 impidiendo su degradación a través del proteasoma

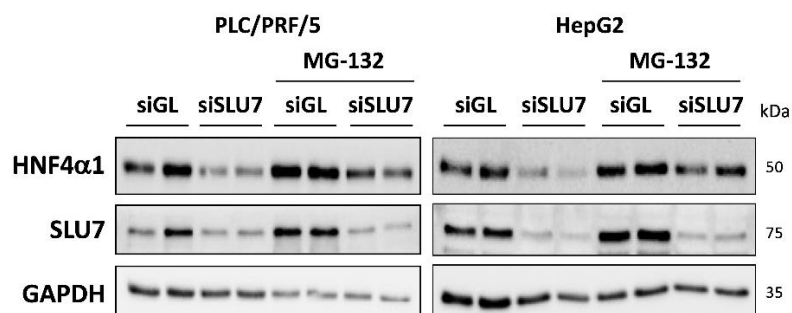
Para descartar que SLU7 tenga un papel en la inhibición de la síntesis de proteínas, analizamos el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre los niveles de HNF4 $\alpha$ 1 en presencia del inhibidor de la traducción cicloheximida (CHX). El análisis en células PLC/PRF/5 transfectadas con el siRNA de SLU7 y tratadas con 10  $\mu$ g/mL de CHX a diferentes tiempos muestra que el silenciamiento de SLU7 es capaz de reducir la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 incluso cuando la síntesis de proteínas está impedida (Figura 29).



**Figura 29. La regulación de SLU7 sobre HNF4 $\alpha$ 1 es independiente de la inhibición de la traducción.** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 derivada del promotor P1 en células PLC/PRF/5 a 28, 36 y 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL) o siSLU7, y del tratamiento con 10  $\mu$ g/mL del inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida (CHX) durante 4, 12 o 24 horas. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga.

Este resultado sugiere que SLU7 es necesario para mantener la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1.

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo por el cual SLU7 estabiliza a la proteína HNF4 $\alpha$ 1, estudiamos la participación del proteasoma, principal mecanismo de degradación de las proteínas en la célula<sup>288</sup>. Para ello, tratamos células PLC/PRF/5 y HepG2, transfectadas con el siRNA de SLU7, con 10  $\mu$ M del inhibidor del proteasoma MG-132 durante las 12 últimas horas de las 48 horas totales de silenciamiento. El análisis por *Western blot* muestra que cuando la actividad del proteasoma está inhibida, la degradación de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por el silenciamiento de SLU7 se ve reducida en ambas líneas celulares (Figura 30).

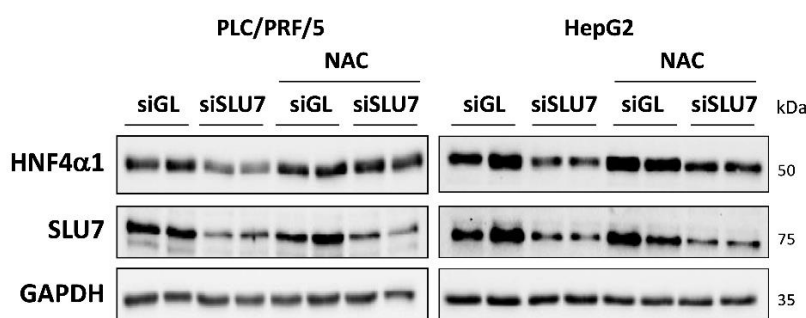


**Figura 30. SLU7 regula la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 a través del proteasoma.** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 derivada del promotor P1 en células PLC/PRF/5 y HepG2 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL) o siSLU7, y del tratamiento con 10  $\mu$ M del inhibidor del proteasoma MG-132 durante las últimas 12 horas. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga.

Este resultado muestra que SLU7 es necesario para mantener la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 al impedir su degradación por el proteasoma.

### 6.3. La estabilidad de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por SLU7 depende de la protección frente al estrés oxidativo

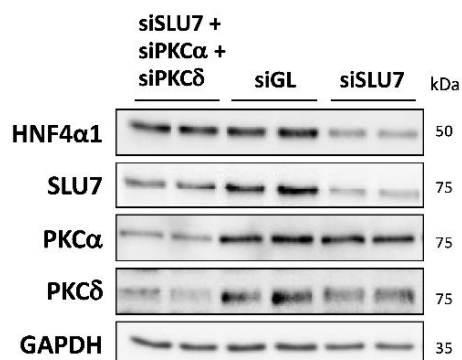
Con objeto de profundizar y caracterizar cómo es el mecanismo de estabilización de la proteína HNF4 $\alpha$ 1, analizamos en la bibliografía los mecanismos descritos que median la degradación de HNF4 $\alpha$ 1. Se ha demostrado que esta degradación puede ser mediada por el estrés oxidativo<sup>205</sup>. Estos datos rápidamente llamaron nuestra atención, puesto que, como se ha mencionado anteriormente, nuestro grupo ha demostrado que el silenciamiento de SLU7 genera estrés oxidativo, no solo en las células de HCC en estudio<sup>211</sup>, sino también, como se muestra en la Figura 22, en el hígado de los ratones haploinsuficientes (*Slu7*<sup>+/-</sup>). Así, decidimos evaluar si el estrés oxidativo mediaba el efecto del silenciamiento de SLU7 sobre la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 tratando las células PLC/PRF/5 y HepG2, transfectadas con siSLU7, con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC). El resultado de *Western blot* muestra que la degradación de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por el silenciamiento de SLU7, se previene de forma significativa cuando se inhibe el estrés oxidativo con NAC (Figura 31).



**Figura 31. La estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 depende del estrés oxidativo.** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de HNF4 $\alpha$ 1 en células PLC/PRF/5 y HepG2 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL) o siSLU7, y del tratamiento con 10 mM del antioxidante N-acetilcisteína (NAC) durante las 48 horas de la transfección. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga.

Estos resultados muestran que el estrés oxidativo está mediando la degradación de HNF4 $\alpha$ 1 en ausencia de SLU7. En este sentido, se ha demostrado que la activación de la PKC induce la retención citoplasmática<sup>205</sup> y la degradación<sup>153</sup> de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 en respuesta al estrés oxidativo<sup>205</sup>. Para testar si PKC participa en la degradación de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por el

silenciamiento de SLU7, empleamos dos siRNA para silenciar específicamente las isoformas PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  en las células PLC/PRF/5, de manera conjunta al silenciamiento de SLU7. Como se observa en la Figura 32, el silenciamiento de PKC impidió significativamente la degradación de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por el silenciamiento de SLU7.



**Figura 32. La disminución de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por el silenciamiento de SLU7 depende de la proteína quinasa C (PKC).** Análisis por Western blot de los niveles de expresión de HNF4 $\alpha$ 1 en células PLC/PRF/5 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL) o con los siRNA de SLU7 (siSLU7) solo o combinado con los de PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  (siPKC $\alpha$  y siPKC $\delta$ ). Se muestran los niveles de expresión de SLU7, PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga.

En conjunto, nuestros datos muestran un nuevo papel de SLU7 en el control de la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1. Así, SLU7 es esencial para prevenir el estrés oxidativo que, a través de PKC, promueve la degradación de HNF4 $\alpha$ 1 por el proteasoma.

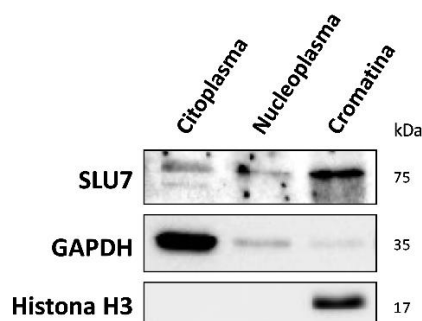
## 7. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE SLU7 FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Los datos obtenidos por nuestro grupo en años anteriores<sup>55,56,211</sup> y en el presente trabajo demuestran que muchos de los efectos observados tras el silenciamiento de SLU7, tanto *in vivo* como *in vitro*, están mediados por la inducción de estrés oxidativo. Esto incluye la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1, tan relevante para la correcta diferenciación y función de los hepatocitos. Por todo ello, en este punto decidimos caracterizar el mecanismo por el cuál SLU7 protege a las células frente al estrés oxidativo.

### 7.1. Análisis del interactoma de SLU7 mediante espectrometría de masas

En primer lugar, decidimos caracterizar con qué proteínas interacciona SLU7, es decir, el interactoma de SLU7, para obtener una visión global de las posibles funciones en las que pueda estar implicado SLU7. De acuerdo con la estructura proteica de SLU7, los dominios NLS y zinc mantienen a la proteína localizada en el compartimento nuclear <sup>214</sup>. En concordancia con ello, SLU7 posee una función canónica como factor de *splicing* nuclear. Sin embargo, los cuatro dominios ricos en leucina de su estructura le permiten trasladarse al citoplasma <sup>214</sup>, por ejemplo, en situaciones de estrés <sup>216</sup>.

Con el fin de confirmar la localización celular de SLU7, realizamos un fraccionamiento celular empleando la línea celular PLC/PRF/5 para extraer las proteínas y, mediante *Western blot*, analizar la expresión de SLU7 en los compartimentos citoplasmático y nuclear, dividido este último en la fracción soluble o nucleoplasma y en la fracción unida a la cromatina. Nuestros datos confirman que la mayor parte de SLU7 se encuentra en el compartimento nuclear, en concreto unido a la cromatina (Figura 33). Sin embargo, hay una fracción que aparece en el citoplasma, y postulamos que es ahí donde SLU7 podría regular mecanismos antioxidantes de la célula independientes de la regulación de la transcripción y/o el *splicing*.

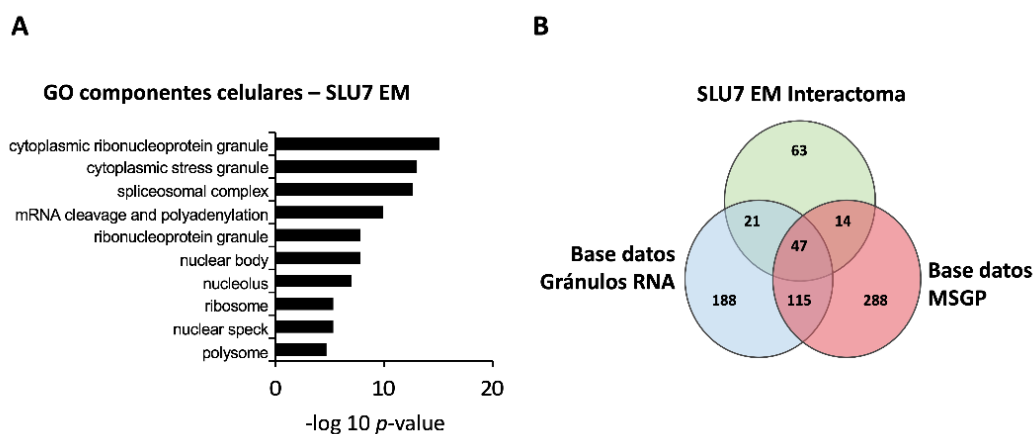


**Figura 33. Localización subcelular de SLU7.** Análisis por *Western blot* de la expresión de SLU7 en los diferentes compartimentos celulares (citoplasma, nucleoplasma y cromatina) tras el fraccionamiento celular en la línea PLC/PRF/5. La expresión de GAPDH y de la histona H3 se muestra como control de carga citoplasmático y nuclear, respectivamente.

Por ello, mediante un lisado suave de las células PLC/PRF/5, enriquecimos el extracto proteico en los complejos de proteínas del compartimento citoplasmático para analizar el interactoma de SLU7 tras su inmunoprecipitación.

Las proteínas que interaccionan con SLU7 fueron identificadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas TRIPLE-TOF. En el análisis de datos, se seleccionaron 145 proteínas (Anexo 3) presentes en los inmunoprecipitados de SLU7, identificadas por al menos 5

péptidos diferentes que, a su vez, estaban ausentes en los inmunoprecipitados realizados con la IgG control. Con esta lista se realizó un análisis por Ontología Génica (GO) de componentes celulares que reveló que la primera y la segunda categorías identificadas se correspondían a proteínas asociadas con los gránulos de estrés citoplasmáticos (SG, *stress granules*) (*cytoplasmic ribonucleoprotein granule* y *cytoplasmic stress granule*) (Figura 34A). La categoría identificada en tercer lugar correspondió con los componentes del espliceosoma (*spliceosomal complex*). Para confirmar estos hallazgos, cruzamos la lista de 145 proteínas obtenidas en la espectrometría de masas con dos bases de datos que recogen las proteínas que constituyen los SG: la base de datos del Proteoma de los Gránulos de Estrés de los Mamíferos (MSGP, *Mammalian Stress Granules Proteome*)<sup>256</sup> y la Base de Datos de los Gránulos de RNA (*RNA Granule Database*)<sup>257</sup>. Llamativamente, encontramos que 82 de estas 145 proteínas (un 56 %) que interaccionan con SLU7 están presentes en estas bases de datos (Figura 34B).



**Figura 34. Análisis por categorías de las proteínas presentes en el interactoma de SLU7. (A)** Análisis por Ontología Génica (GO) de componentes celulares de las 145 proteínas seleccionadas que interaccionan con SLU7 identificadas por espectrometría de masas (EM) en células PLC/PRF/5. **(B)** Diagrama de Venn comparando las 145 proteínas seleccionadas con las proteínas presentes en las bases de datos Gránulos de RNA y Proteoma de los Gránulos de Estrés de los Mamíferos (MSGP).

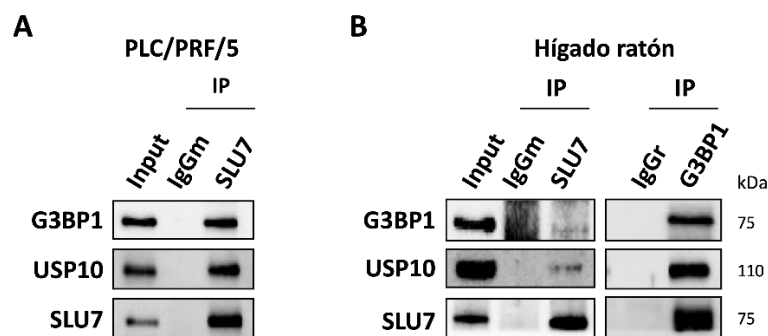
Estos datos demuestran que, en el citoplasma, SLU7 interacciona con proteínas presentes en los SG, componentes importantes de la respuesta antioxidante celular<sup>289</sup>.

## 7.2. SLU7 forma complejos con proteínas clave de los gránulos de estrés

Los SG son gránulos citoplasmáticos constituidos por ribonucleoproteínas que se forman ante situaciones de estrés que inhiben la síntesis de proteínas, con el objetivo de proteger el mRNA citoplasmático hasta que cesa el estrés<sup>289,290</sup>. Estas situaciones incluyen la inducción de

estrés oxidativo, dado que componentes de estos SG poseen actividad antioxidante <sup>291</sup>. Los datos obtenidos en el experimento de espectrometría de masas revelan que SLU7 interacciona con proteínas presentes en estos gránulos, de manera que quisimos validar estas interacciones mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.

De la lista de componentes de los SG, seleccionamos dos de las proteínas principales que, además, controlan la actividad antioxidante de los SG: la proteína 1 de unión a la proteína activadora de ras GTPasa (G3BP1, *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*) y la proteasa 10 específica de ubiquitina (USP10, *ubiquitin-specific protease 10*) <sup>291</sup>. Como se observa en la Figura 35A, la inmunoprecipitación de SLU7 en células PLC/PRF/5 confirmó su interacción con ambas proteínas, G3BP1 y USP10 en condiciones basales, es decir, en ausencia de estrés. Estos datos estarían en consonancia con la existencia de complejos proteicos pre-SG preformados que facilitan la rápida coalescencia en SG en respuesta a un estrés <sup>292,293</sup>. A pesar de que se estima que más de un 20% de la diversidad y naturaleza de los SG es dependiente del tipo de estrés y/o del tipo celular <sup>292</sup>, quisimos analizar las interacciones entre SLU7 y estos componentes de los gránulos de estrés en el hígado sano de los ratones. La inmunoprecipitación tanto de SLU7 como de G3BP1 confirmó las interacciones de SLU7 con G3BP1 y USP10 en el hígado *in vivo* (Figura 35B). Estos datos sugieren un importante papel de SLU7 en la respuesta al estrés.



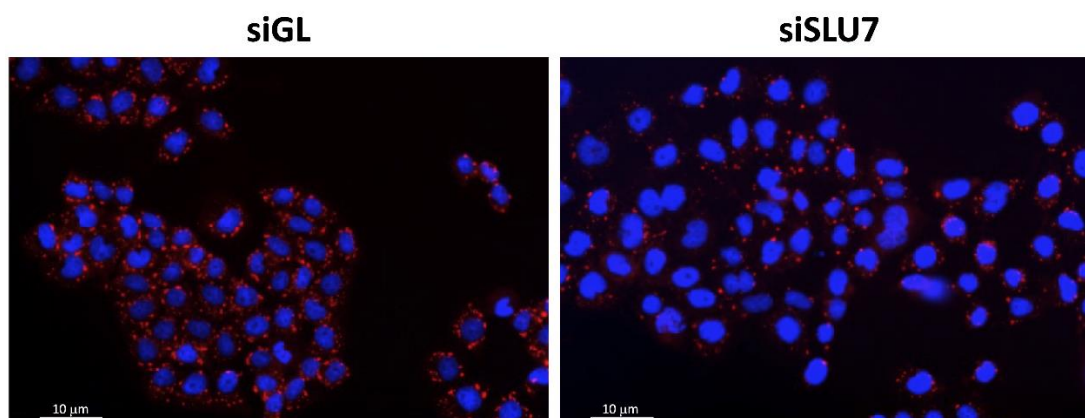
**Figura 35. Interacción de SLU7 con proteínas antioxidantes constituyentes de los gránulos de estrés.** Análisis por *Western blot* de la expresión de las proteínas G3BP1, USP10 y SLU7 en extractos de células PLC/PRF/5 (A) o en extractos de tejido hepático de ratón (B), enriquecidos en la fracción citoplasmática e inmunoprecipitados con un anticuerpo para SLU7 (células PLC/PRF/5 e hígado de ratón) o con un anticuerpo para G3BP1 (hígado de ratón). Como control de la inmunoprecipitación se muestran los inmunoprecipitados realizados con IgG de la misma especie que el anticuerpo específico, es decir de ratón (IgGm) para SLU7 y de conejo (IgGr) para G3BP1. Los inputs representan el control de la expresión de las proteínas analizadas en el extracto inmunoprecipitado. Abreviaturas: IP, inmunoprecipitados.



En resumen, nuestros datos muestran que SLU7 interacciona con proteínas con función antioxidante que son componentes de los gránulos de estrés, ya en condiciones basales, tanto en muestras de cultivo celular como en muestras de hígado de ratón.

### 7.3. SLU7 es necesario para la correcta formación de los gránulos de estrés, controlando la expresión de G3BP1 y USP10

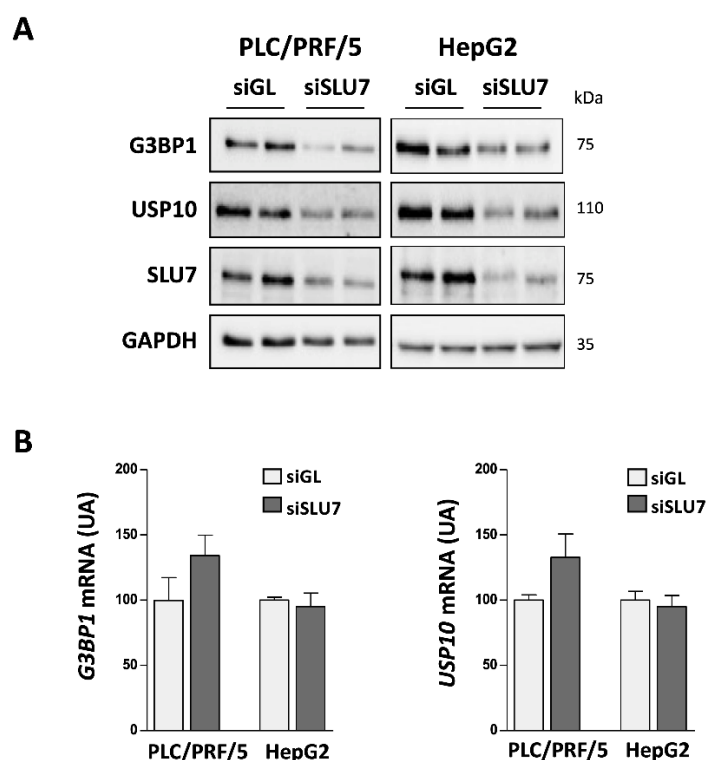
En base a estos novedosos resultados, quisimos profundizar en el papel que desempeña SLU7 en la formación de los SG. Para ello, silenciamos la expresión de SLU7 en células PLC/PRF/5 mediante el siRNA de SLU7 e indujimos la formación de los SG en respuesta al estrés oxidativo inducido por la adición de 500  $\mu$ M arsenito sódico ( $\text{NaAsO}_2$ ) durante 1 hora<sup>294</sup>. La inmunofluorescencia frente a G3BP1 reveló una inhibición en el número de SG formados que contienen G3BP1 en las células silenciadas para SLU7 (Figura 36), sugiriendo que SLU7 es necesario para la correcta formación de los SG en respuesta al estrés oxidativo.



**Figura 36. SLU7 es necesario para la correcta formación de los gránulos de estrés.** Detección de los gránulos de estrés por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-G3BP1 (rojo) en células PLC/PRF/5 transfectadas con el siRNA control (siGL) o con siSLU7 durante 48 horas y tratadas con 500  $\mu$ M de  $\text{NaAsO}_2$  durante 1 hora. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Se ha demostrado que G3BP1 es una proteína esencial para el ensamblaje de los SG<sup>295</sup>. De acuerdo con esto, nos preguntamos si la menor formación de SG que contienen G3BP1 está causada por una alteración en la expresión de esta proteína al silenciar la expresión de SLU7. El análisis por *Western blot* en células PLC/PRF/5 y HepG2 transfectadas durante 48 horas con el siRNA de SLU7 o el siRNA control (siGL) reveló que tanto la expresión proteica de G3BP1 como la de USP10 se reducen drásticamente al silenciar SLU7 (Figura 37A). Llamativamente, el análisis por qPCR de los niveles de los mRNA de *G3BP1* y de *USP10* en estas mismas muestras,

reveló que la caída de la proteína no está asociada a una inhibición transcripcional (Figura 37B).



**Figura 37. SLU7 regula la expresión de las proteínas G3BP1 y de USP10. (A)** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de las proteínas G3BP1 y USP10 en células PLC/PRF/5 y HepG2 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL) o con el siSLU7. Se muestran los niveles de expresión de SLU7 como control del silenciamiento y de GAPDH como control de carga. **(B)** Niveles de expresión de los mRNA de *G3BP1* y de *USP10* analizados mediante qPCR en tres ensayos independientes realizados por duplicado como se describe en el apartado A. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias.

Así, nuestros datos muestran que SLU7 es necesario para la correcta formación de los SG en respuesta al estrés oxidativo, por un mecanismo que implicaría la regulación de la expresión de las proteínas G3BP1 y USP10.

#### 7.4. SLU7 controla la estabilidad de HNF4 $\alpha$ 1 a través de la actividad antioxidante de USP10

Como se ha mencionado anteriormente, G3BP1 y USP10 tienen una función antioxidante en los SG<sup>291</sup>. Se ha demostrado que la depleción tanto de G3BP1<sup>296</sup> como, más específicamente, de USP10<sup>291</sup> inducen estrés oxidativo. Así pues, quisimos comparar la

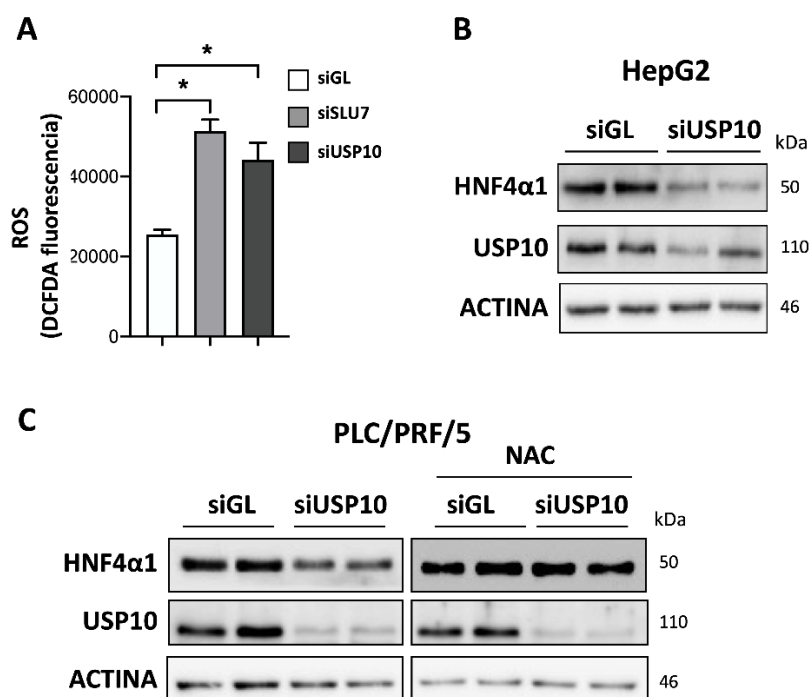
extensión del estrés oxidativo generado al silenciar SLU7 con el que se induce al silenciar USP10.

Para ello, transfectamos células PLC/PRF/5 con los siRNA de SLU7 (siSLU7), de USP10 (siUSP10) o el control (siGL) durante 48 horas y cuantificamos los niveles de ROS empleando la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA). La medición por fluorescencia reveló una acumulación de ROS muy similar en las condiciones siSLU7 y siUSP10 (Figura 38A), indicando que ante la falta de una de las dos proteínas la célula reduce su capacidad antioxidante a niveles parecidos.

Llegados a este punto y teniendo en cuenta que:

1. La estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 es dependiente del estrés oxidativo generado al silenciar SLU7 (Figuras 31 y 32),
2. El silenciamiento de SLU7 disminuye los niveles de la proteína USP10 (Figura 37),
3. La disminución de USP10 genera estrés oxidativo (Figura 38A),

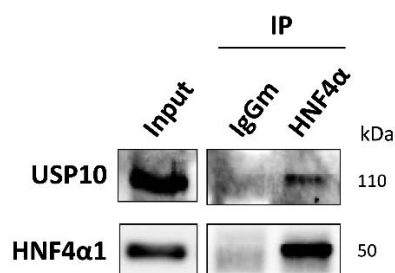
decidimos estudiar si la función antioxidante de USP10 podría mediar la regulación de HNF4 $\alpha$ 1 por SLU7. Para ello, silenciamos la expresión de USP10 en células HepG2 y PLC/PRF/5 mediante un siRNA específico para USP10 durante 48 horas y, mediante *Western blot*, detectamos una notable disminución en la expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 en las dos líneas celulares (Figura 38B: HepG2 y 38C: PLC/PRF/5). Además, observamos que el tratamiento con 10 mM del antioxidante NAC a las células PLC/PRF/5 silenciadas para USP10 (siUSP10) resultaba en la completa prevención de la desestabilización de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 (Figura 38C), confirmando así que su estabilidad está mediada por la inducción de estrés oxidativo generado al disminuir la expresión de USP10.



**Figura 38.** El silenciamiento de USP10 inhibe la expresión de la proteína HNF4α a través de la inducción de estrés oxidativo. **(A)** Cuantificación por fluorescencia mediante la sonda 2', 7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos en las células PLC/PRF/5 48 horas después de la transfección con el siRNA control (siGL), el siSLU7 o el siUSP10. **(B)** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de HNF4α1 en células HepG2 48 horas después de la transfección con siGL o con siUSP10. Se muestran los niveles de expresión de USP10 como control del silenciamiento y de actina como control de carga. **(C)** Niveles de expresión de la proteína HNF4α1 mediante *Western blot* en células PLC/PRF/5 48 horas después de la transfección con siGL o siUSP10, en ausencia o presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC, 10 mM) durante el tiempo de la transfección. Se muestran los niveles de expresión de USP10 como control del silenciamiento y de actina como control de carga. Los datos de la gráfica se representan como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

De este modo, nuestros resultados muestran un novedoso mecanismo por el cuál SLU7 mantiene la estabilidad de la proteína HNF4α1 a través de la actividad antioxidante del componente de los gránulos de estrés USP10.

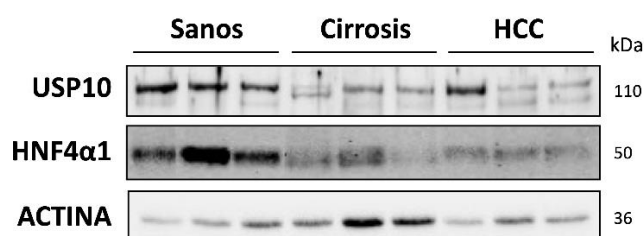
No obstante, una revisión bibliográfica reveló que, además, puede existir una interacción entre HNF4α1 y la desubiquitinasa USP10<sup>297</sup>, por lo tanto, procedimos a evaluar si dicha interacción se daba en nuestro sistema experimental. Como se observa en la Figura 39, HNF4α1 interacciona con USP10 en las células PLC/PRF/5, no pudiendo descartar una acción directa de USP10 en la estabilización de HNF4α1.



**Figura 39. Interacción de HNF4 $\alpha$  con USP10.** Análisis por *Western blot* de la expresión de las proteínas USP10 y HNF4 $\alpha$ 1 en extractos celulares de PLC/PRF/5 inmunoprecipitados con un anticuerpo para HNF4 $\alpha$  o con la IgG de ratón (IgGm) como control. Los inputs representan el control de la expresión de las proteínas en los extractos inmunoprecipitados. Abreviaturas: IP, inmunoprecipitados.

### 7.5. La expresión de HNF4 $\alpha$ 1 y USP10 disminuye en la cirrosis y en el hepatocarcinoma

Nuestros datos sugieren la existencia de un nuevo mecanismo por el que SLU7 regula los niveles de HNF4 $\alpha$ 1 dependiente de USP10. Por ello, en este punto quisimos comprobar si este mecanismo podía también operar *in vivo* en el proceso de hepatocarcinogénesis. Para ello, analizamos los niveles de expresión de las proteínas USP10 y HNF4 $\alpha$ 1 en el hígado humano de pacientes con enfermedad crónica, donde ya hemos demostrado que la expresión de SLU7 se reduce de manera notable (Figura 10). Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión de ambas proteínas tanto en el hígado cirrótico como en los hepatocarcinomas (Figura 40), demostrando la relevancia clínica de nuestros resultados.



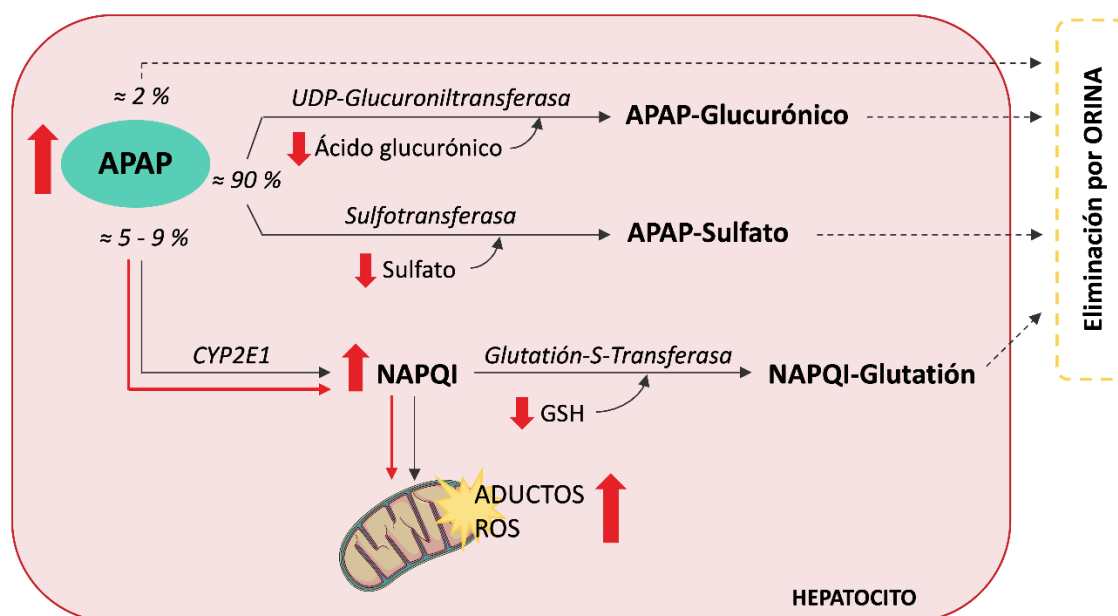
**Figura 40. La expresión de USP10 y de HNF4 $\alpha$ 1 disminuye en el hígado de pacientes con enfermedad hepática crónica.** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de USP10 y de HNF4 $\alpha$ 1 en el hígado de pacientes sanos o con enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y hepatocarcinoma (HCC). La expresión de actina se muestra como control de carga.

En global, nuestros resultados muestran que SLU7 es necesario para mantener los niveles de proteína USP10, protegiendo así a las células frente al estrés oxidativo y previniendo la pérdida de expresión del factor de transcripción HNF4 $\alpha$ 1, lo que conduciría a la dediferenciación y pérdida de función de los hepatocitos, eventos característicos del proceso de hepatocarcinogénesis.

## **8. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE SLU7 SENSIBILIZA AL HÍGADO FRENTE AL DAÑO AGUDO**

En el presente trabajo hemos demostrado que SLU7 regula la sensibilidad del hígado frente al daño hepático crónico y regula la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1, de forma que la falta de SLU7 *in vivo* potencia la desdiferenciación de los hepatocitos y la pérdida de función hepáticas mediada por la desregulación de HNF4 $\alpha$ 1. A continuación, quisimos estudiar si estos mecanismos participan también en la pérdida de función y en el desarrollo del daño hepático agudo, utilizando el modelo de daño inducido por acetaminofén (APAP).

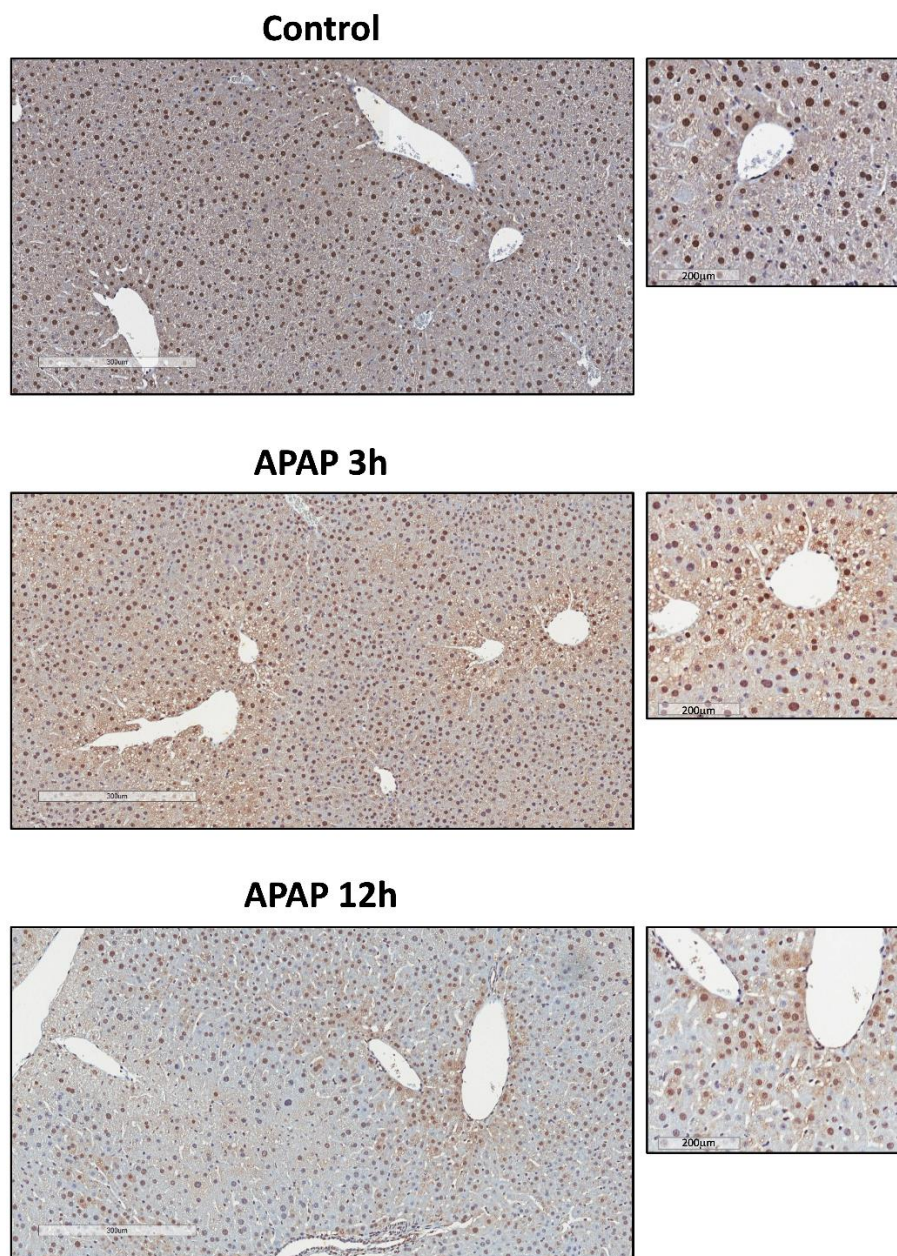
El APAP, más conocido como paracetamol, es un analgésico no opioide históricamente muy empleado a nivel mundial debido a su gran seguridad y eficacia en el alivio del dolor y la fiebre <sup>298</sup>. Sin embargo, el uso de APAP a dosis elevadas es la principal causa de daño hepático inducido por fármaco (DILI) en los países occidentales <sup>299</sup>. A dosis terapéuticas, la mayor parte de APAP se conjuga en el hígado con ácido glucurónico y con sulfato para ser excretado directamente por orina, mientras que alrededor de un 5-9 % se metaboliza a través del sistema enzimático CYP450, principalmente por el CYP2E1, dando lugar a un metabolito intermedio altamente reactivo denominado N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI). Este último es rápidamente neutralizado por el tripéptido glutatión (GSH), formando un conjugado polar y soluble que es eliminado por la orina <sup>300</sup>. Sin embargo, una dosis excesiva de APAP satura los depósitos de ácido glucurónico y sulfato, incrementándose sustancialmente la cantidad de APAP metabolizado por CYP450 y con ello, la formación de NAPQI, la depleción de GSH y la formación de aductos proteicos y amplificación del estrés oxidativo <sup>301</sup> (Figura 41).



**FIGURA 41. Metabolismo de APAP en los hepatocitos.** Representación esquemática de las principales vías metabólicas del acetaminofén (APAP) en el hepatocito, que incluye los procesos de conjugación con ácido glucurónico o con sulfato, y la oxidación a través de la subunidad CYP2E1 del citocromo. Una excesiva dosis de APAP (flechas en rojo) depleciona los niveles de ácido glucurónico y sulfato, favoreciendo la vía de CYP2E1, deplecionando también el glutatión (GSH) e incrementando los niveles del metabolito reactivo N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) y sus efectos negativos sobre la célula. Abreviaturas: ROS, especies reactivas de oxígeno.

### 8.1. Alteración en la expresión y localización celular de SLU7 durante el daño agudo por APAP

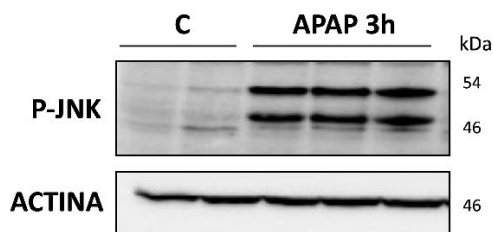
En primer lugar, comprobamos cómo afecta a la regulación de SLU7 en el hígado de los ratones una dosis subletal de APAP. Para ello, tratamos a ratones con 300 mg/kg de APAP y los sacrificamos a las 3 o a las 12 horas de la administración. El análisis de SLU7 por inmunohistoquímica en secciones representativas de hígado reveló que el daño por APAP reduce notablemente la expresión de SLU7 de manera progresiva en el tiempo. Además, este efecto se acompaña de una mayor detección de la tinción de SLU7 en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 42).



**Figura 42. La expresión de SLU7 disminuye ante el daño agudo por APAP.** Inmunohistoquímica de SLU7 en el hígado de ratones con daño agudo inducido por administración de una dosis única intraperitoneal de 300 mg/kg de acetaminofén (APAP) disuelto en tampón fosfato salino (DPBS) o con el volumen correspondiente del vehículo DPBS (Control). Los ratones se sacrificaron a las 3 y a las 12 horas tras la administración. Barra de escala: 300 µm y ampliación a 200 µm para destacar la localización de SLU7 en los núcleos (Control) o en el citoplasma (APAP) de los hepatocitos.

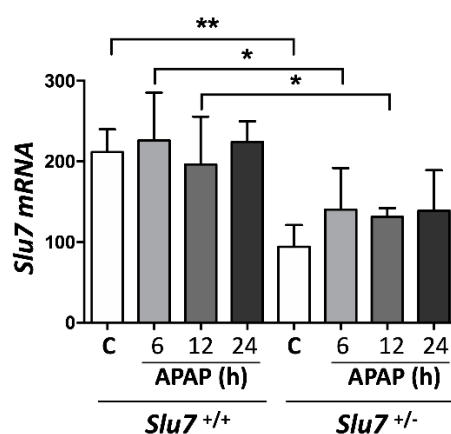
La traslocación de SLU7 del núcleo al citoplasma se ha relacionado con la activación de JNK en respuesta al estrés <sup>216</sup>. Analizamos por *Western blot* los niveles de P-JNK en el hígado de los ratones tratados con 300 mg/kg de APAP y sacrificados a las 3 horas, detectando un incremento en su activación tras el tratamiento con APAP (Figura 43), en paralelo a la detección de SLU7 en el citoplasma (Figura 42).





**Figura 43. Activación de P-JNK durante el daño hepático agudo por APAP.** Análisis por *Western blot* de los niveles de fosforilación de la proteína JNK (P-JNK) en el hígado de ratones con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 3 horas tras la administración. La expresión de actina se muestra como control de carga.

El análisis por qPCR no mostró evidencias de alteraciones de *Slu7* a nivel transcripcional en el hígado de los ratones tratados con APAP durante 6, 12 o 24 horas, ni tampoco en el caso de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (Figura 44).



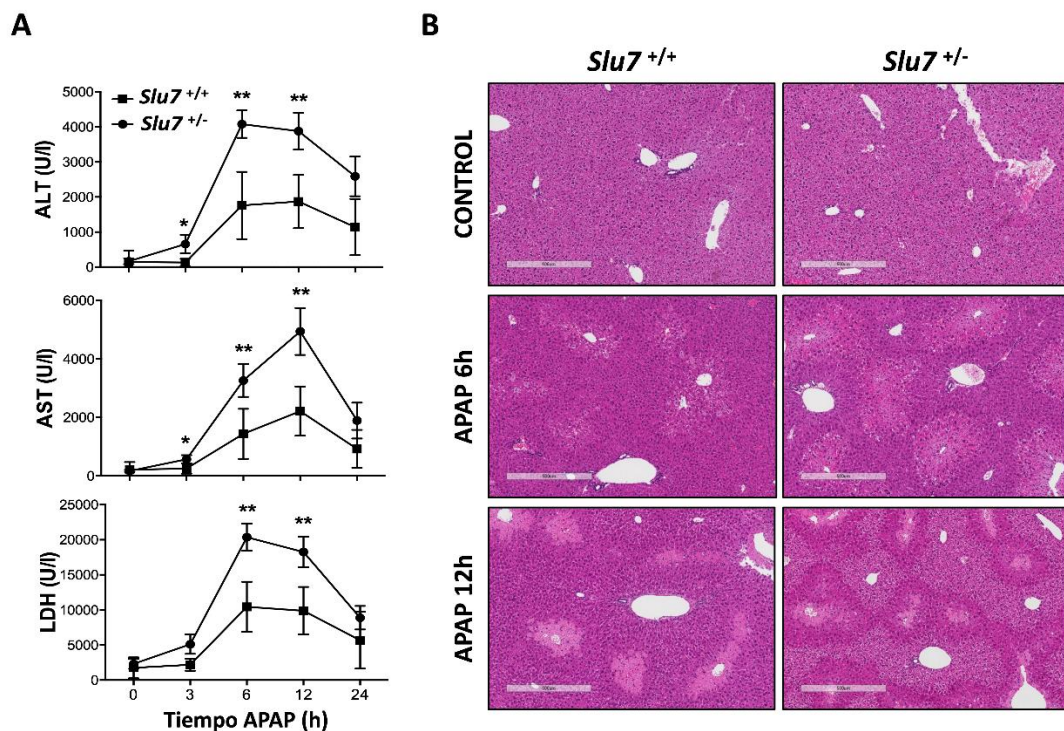
**Figura 44. Expresión del mRNA de *Slu7* durante el daño hepático agudo por APAP.** Niveles de expresión del mRNA de *Slu7* analizados mediante qPCR en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6, 12 o 24 horas tras la administración. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

En base a estos resultados demostramos que el daño hepático agudo por APAP induce la disminución y la deslocalización de la proteína SLU7 en los hepatocitos, que podría estar mediado por la activación de P-JNK.

## 8.2. El daño hepático agudo inducido por APAP se exagera en los ratones haploinsuficientes para *Slu7*

Para estudiar el papel que pueda desempeñar SLU7 en la instauración y desarrollo del daño hepático agudo por APAP, empleamos los ratones haploinsuficientes para *Slu7*, los

tratamos con una dosis única subletal de APAP (300 mg/kg), y comparamos la sensibilidad al daño a diferentes tiempos frente a los correspondientes ratones hermanos con expresión diploide de *Slu7* (*Slu7*<sup>+/+</sup>). Para ello, medimos los niveles de transaminasas hepáticas en suero como marcador de daño hepático, encontrando un incremento significativo en los niveles de ALT, AST y LDH en los ratones *Slu7*<sup>-/-</sup> tratados con APAP (Figura 45A). En paralelo, evaluamos el grado de daño en el parénquima hepático mediante tinción H&E en secciones representativas de tejido hepático, encontrando una mayor superficie de parénquima dañado o necrosado en los ratones *Slu7*<sup>-/-</sup> (Figura 45B).



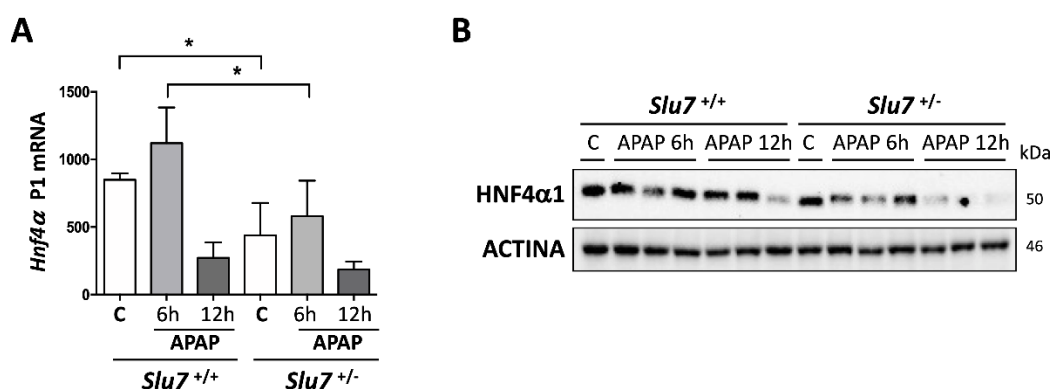
**Figura 45. Los ratones haploinsuficientes para *Slu7* son más sensibles al daño hepático agudo inducido por APAP.** A los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>-/-</sup> se les indujo daño hepático agudo por administración intraperitoneal de una dosis única de 300 mg/kg de acetaminofén (APAP) disuelto en tampón fosfato salino (DPBS) o el correspondiente volumen del vehículo DPBS (control). Se tomaron muestras de sangre a las 3, 6, 12 y 24 horas de la administración y los ratones se sacrificaron a las 6, 12 y 24 horas. **(A)** Cuantificación de los niveles de transaminasas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH) en suero a diferentes puntos tras la administración de APAP. **(B)** Tinción de hematoxilina y eosina en secciones representativas del hígado de ratones tratados con APAP durante 6 o 12 horas. Barra de escala: 500  $\mu$ m. Los datos de las gráficas se representan como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Abreviaturas: U/l, unidades/litro.

Así, estos resultados muestran que la reducción en la expresión de SLU7 hace al hígado también más sensible frente al daño agudo inducido por APAP.

### 8.3. SLU7 es necesario para preservar la diferenciación y función del hígado y protegerlo frente al daño oxidativo durante el daño agudo

A continuación, quisimos evaluar si, al igual que ocurre en el daño hepático crónico, SLU7 participa en el mantenimiento del fenotipo normal hepático durante el daño agudo por APAP.

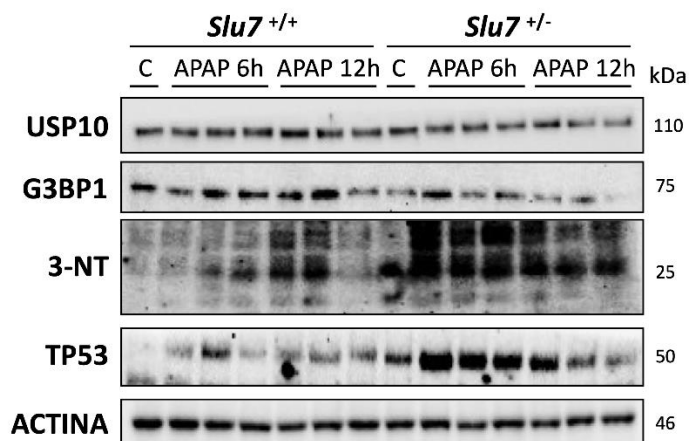
En primer lugar, analizamos la expresión desde el promotor P1 de HNF4 $\alpha$  como marcador de diferenciación de los hepatocitos adultos. En concordancia con los resultados obtenidos en el modelo de daño crónico por CCl<sub>4</sub>, la expresión del mRNA por qPCR de *Hnf4 $\alpha$ -P1* se reduce significativamente tanto en los hígados de ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> no tratados como en los tratados con APAP durante 6 horas (Figura 46A). Así mismo, el análisis por *Western blot* reveló que esta disminución se acompaña de una depleción muy importante de los niveles de proteína HNF4 $\alpha$ 1 en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> a las 12 horas de la administración de APAP (Figura 46B).



**Figura 46. La haploinsuficiencia de *Slu7* exacerba la disminución de HNF4 $\alpha$ 1 en el daño hepático agudo por APAP. (A)** Niveles de expresión del mRNA de las isoformas de *Hnf4 $\alpha$*  derivadas del promotor P1 analizados mediante qPCR en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6 o 12 horas tras la administración. **(B)** Análisis por *Western blot* de HNF4 $\alpha$ 1 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados como en el apartado A. Se muestra actina como control de carga. Los datos de la gráfica están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

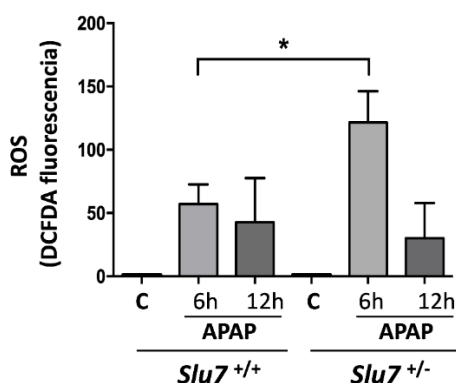
Por otra parte, está bien documentado que APAP induce estrés oxidativo<sup>10</sup> y, como ya hemos demostrado en este trabajo, SLU7 participa en su prevención. Así, en concordancia con el mecanismo descrito más arriba, analizamos la expresión de las proteínas USP10 y G3BP1 mediante *Western blot* en el hígado de ratones tratados con 300 mg/kg APAP, encontrando una notable reducción en ambas proteínas en el hígado dañado de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> (Figura 47), sugiriendo que efectivamente la desregulación de SLU7 en el daño juega un papel relevante en los mecanismos de estrés inducidos por APAP. Para confirmar esto, analizamos

otros marcadores de estrés oxidativo en este modelo de daño. Por ejemplo, detectamos por *Western blot* un aumento en los niveles de proteínas nitradas (3-NT) y una estabilización de la proteína TP53 (Figura 47) en los ratones *Slu7*<sup>-/-</sup> tratados con APAP durante 6 horas.



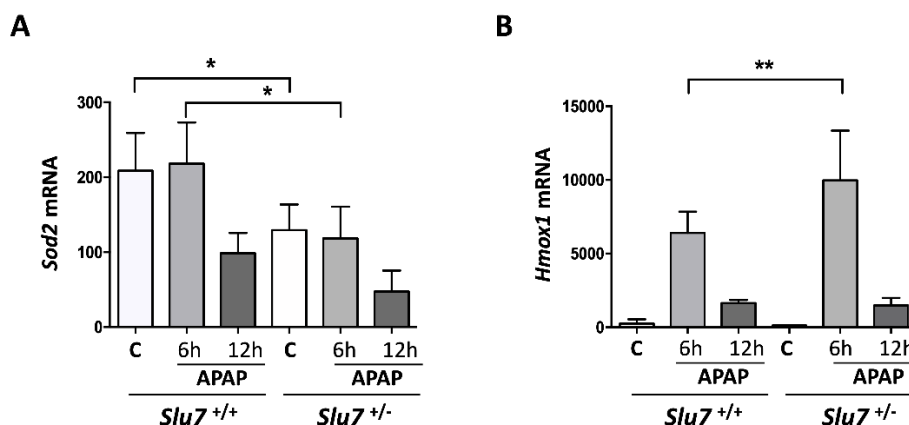
**Figura 47. La haploinsuficiencia de *Slu7* promueve la generación de estrés oxidativo en el daño hepático agudo inducido por APAP.** Análisis por *Western blot* de los niveles de las proteínas USP10, G3BP1, proteínas nitradas (3-nitrotirosina, 3-NT) y TP53 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>-/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6 o 12 horas tras la administración. Se muestra actina como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 46B.

Además, la cuantificación de ROS a través de la fluorescencia de la sonda DCFDA reveló una producción más elevada en los ratones *Slu7*<sup>-/-</sup> a las 6 horas del tratamiento (Figura 48).



**Figura 48. La haploinsuficiencia de *Slu7* exacerba los niveles de ROS en el daño hepático agudo por APAP.** Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de fluorescencia mediante la sonda 2', 7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>-/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6 o 12 horas tras la administración. Los datos están representados con respecto a los ratones control como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

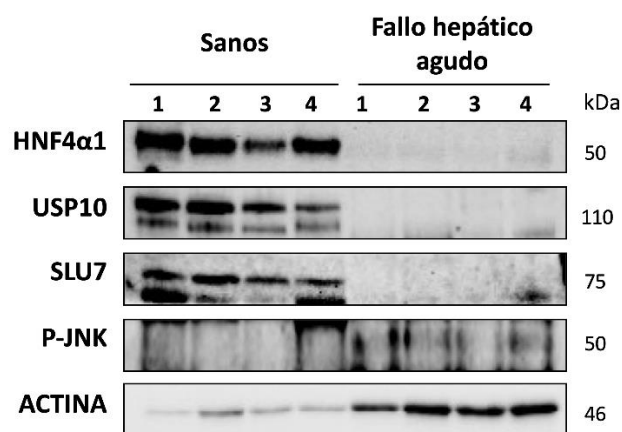
También analizamos, mediante qPCR, la expresión del mRNA de la enzima antioxidante diana de HNF4 $\alpha$ , *Sod2*, encontrado una disminución de la misma en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> de manera basal y en los ratones tratados con APAP (Figura 49A). A esto le acompaña una inducción significativa en la expresión de la enzima de respuesta al estrés oxidativo hemo-oxigenasa-1 (*Hmox1*, *Heme oxygenase 1*) en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> con respecto a los *Slu7*<sup>+/+</sup> a las 6 horas del tratamiento con APAP (Figura 49B).



**Figura 49.** La haploinsuficiencia de *Slu7* altera la regulación de la expresión de enzimas de respuesta al estrés oxidativo en el daño hepático agudo por APAP. Niveles de expresión de los mRNA de *Sod2* (A) y de *Hmox1* (B) analizados mediante qPCR en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6 o 12 horas tras la administración. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Todos estos resultados, apoyan la implicación que SLU7 tiene en el mantenimiento de la diferenciación hepática y la prevención del estrés oxidativo durante el daño hepático agudo por APAP.

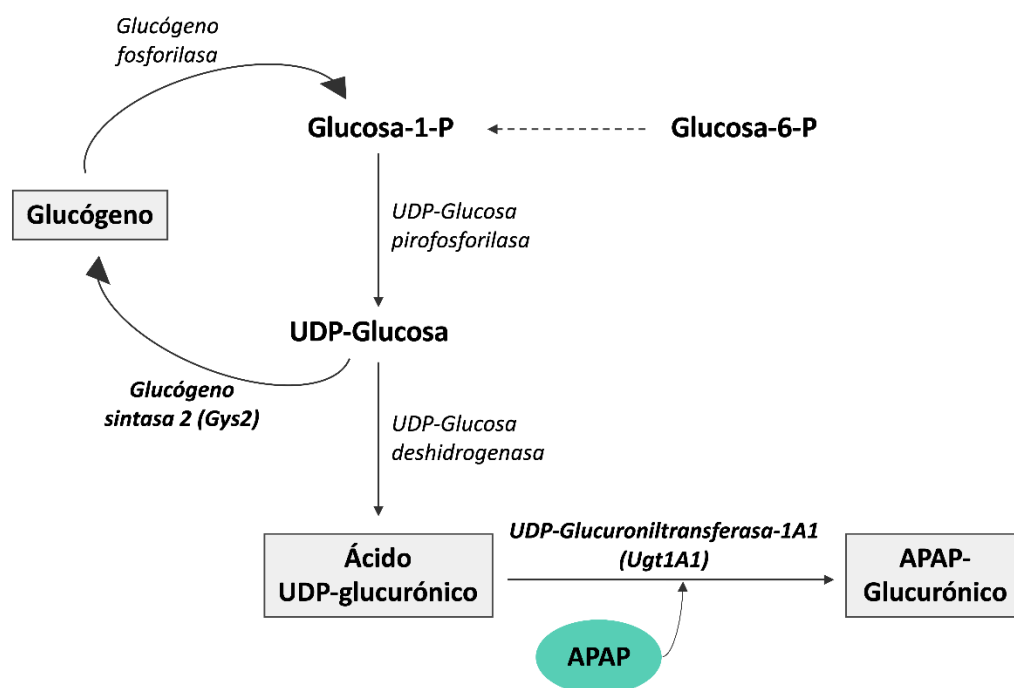
Relevantemente, y en consistencia con los resultados obtenidos en el modelo animal, observamos que, en el hígado de pacientes con fallo hepático agudo, la expresión de las proteínas HNF4 $\alpha$ 1, USP10 y SLU7, disminuye de manera drástica en paralelo con la ya descrita<sup>302</sup> activación de P-JNK (Figura 50).



**Figura 50.** La expresión de HNF4 $\alpha$ , USP10 y SLU7 disminuye en el hígado de pacientes con fallo hepático agudo. Análisis por *Western blot* de los niveles de las proteínas HNF4 $\alpha$ 1, USP10 y SLU7, y de la fosforilación de la proteína JNK (P-JNK) en el hígado de pacientes sanos o con fallo hepático agudo. La expresión de actina se muestra como control de carga. Las etiologías de las hepatitis agudas fulminantes en los pacientes incluyen: secundaria a *bypass* gástrico, tóxico-farmacológica, farmacológica durante la gestación y una etiología no filiada.

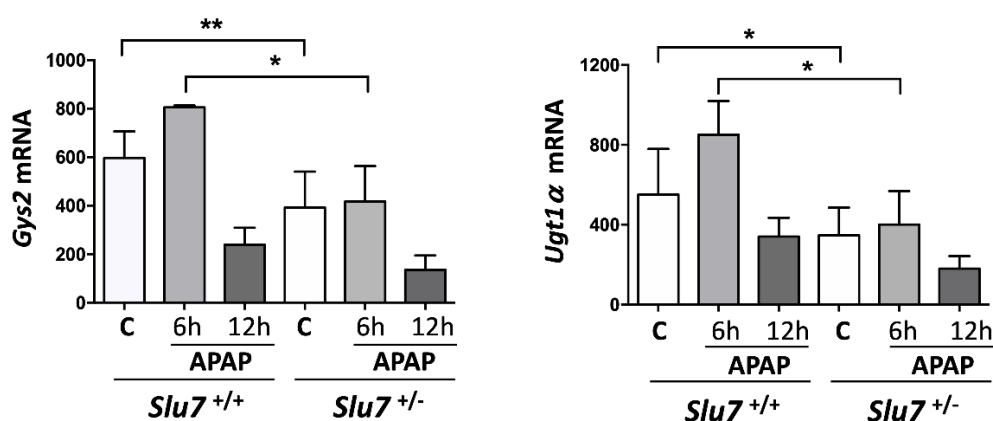
#### 8.4. La haploinsuficiencia de *Slu7* disminuye la capacidad del metabolismo no tóxico de APAP

Para tratar de caracterizar el mecanismo por el cuál SLU7 participa en la instauración y desarrollo del daño por APAP, estudiamos las diferentes vías de metabolismo de este fármaco. Como se ha mencionado antes, una de las primeras vías de inactivación del APAP, que protege de su hepatotoxicidad, es la conjugación con ácido glucurónico para su transformación en un metabolito soluble, fácilmente excretable por orina<sup>303</sup> (Figura 41). Se ha demostrado que la glucogenolisis es la principal fuente de ácido UDP-glucurónico para su conjugación con APAP<sup>304,305</sup>. (Figura 51). En este proceso intervienen dos enzimas importantes y que además son dianas de HNF4 $\alpha$ : la *Gys2*<sup>175</sup>, necesaria para el almacenamiento de glucógeno hepático, y la UDP-glucuroniltransferasa-1A1 (*Ugt1 $\alpha$* , *UDP-glucuronosyltransferase Family 1 Member A1*)<sup>174,306</sup>, que es la responsable del proceso de conjugación de APAP con el ácido UDP-glucurónico<sup>300</sup> (Figura 51).



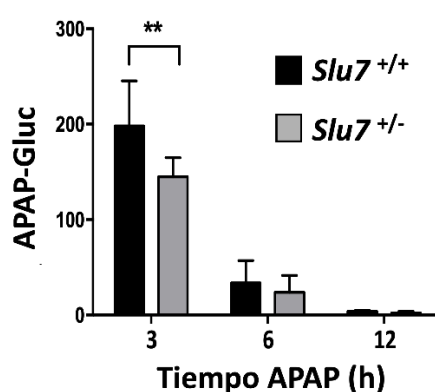
**FIGURA 51.** Representación esquemática de las vías de la glucogenólisis y la síntesis de ácido UDP-glucurónico. Abreviaturas: APAP, acetaminofén; UDP, uridina difosfato.

Teniendo esto en cuenta, para medir indirectamente la contribución de la vía de la glucuronidación en los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con 300 mg/kg de APAP, cuantificamos los niveles de los mRNA de estas dos enzimas mediante qPCR. En ambos casos, la expresión de las enzimas ya se encuentra significativamente disminuida en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> de manera basal, y se mantiene esta tendencia tras la administración de APAP (Figura 52).



**Figura 52.** La haploinsuficiencia de *Slu7* altera la expresión de enzimas del proceso de glucuronidación del APAP en el daño hepático agudo. Niveles de expresión de los mRNA de *Gys2* y *Ugt1α* analizados mediante qPCR en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6 o 12 horas tras la administración. Los datos están representados como la media ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

Por tanto, estos datos sugieren que la menor capacidad de almacenar glucógeno que presentan los ratones haploinsuficientes para *Slu7* influye en la detoxificación de APAP por la vía de la glucuronidación. Para confirmarlo, decidimos cuantificar los niveles del conjugado APAP-Gluc en el suero de ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup> tratados con 300 mg/kg de APAP. La medición de estos conjugados mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas muestra que los niveles de APAP-Gluc se reducen significativamente en el suero de ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> a las 3 horas de la administración de APAP (Figura 53), sugiriendo que, efectivamente, estos ratones poseen una menor capacidad para metabolizar APAP por esta vía no tóxica.



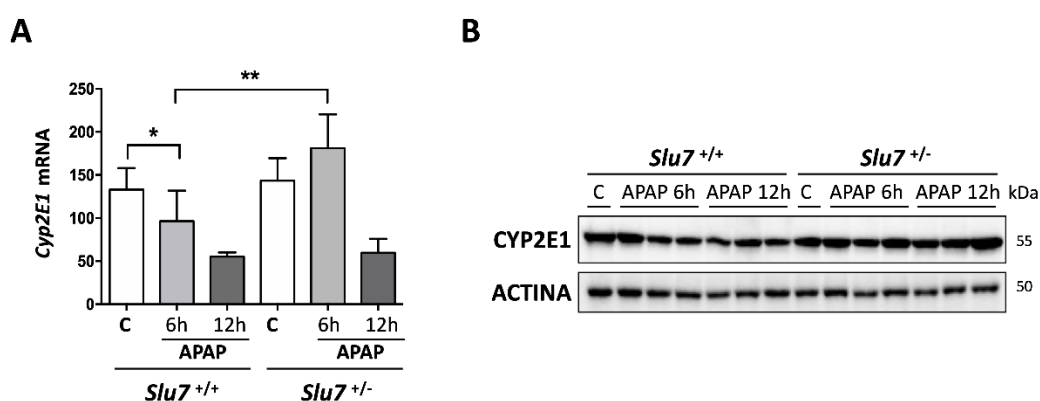
**Figura 53. Los ratones haploinsuficientes para *Slu7* presentan menores niveles del conjugado APAP-Gluc durante el daño agudo por APAP.** Cuantificación de los niveles del conjugado APAP-glucurónico (APAP-Gluc) en suero mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-/MS/MS), en ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con una dosis única intraperitoneal de 300 mg/kg de acetaminofén (APAP) durante 3, 6 o 12 horas. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. **\*\**P* < 0.01.**

### 8.5. La haploinsuficiencia de *Slu7* favorece la hepatotoxicidad de APAP mediada por la vía del CYP450

Siguiendo con el análisis de las vías de metabolismo del fármaco APAP, como se ha mencionado antes, cuando se deplecionan los agentes de conjugación de las vías no tóxicas el APAP se elimina a través del sistema del CYP450. Dentro de la familia de los CYP450, el principal implicado en el metabolismo de APAP y en su hepatotoxicidad, al igual que ocurre en el metabolismo de CCl<sub>4</sub>, es el CYP2E1<sup>300,307</sup>. Consecuentemente, los ratones deficientes para *Cyp2e1* (*Cyp2e1*<sup>-/-</sup>) se encuentran más protegidos frente al daño hepático inducido por APAP<sup>307-309</sup>, mientras que la inducción de CYP2E1 por la ingesta crónica de alcohol incrementa la sensibilidad del hígado al daño por APAP<sup>10,310,311</sup>. Evidencias anteriores<sup>268,309,312-314</sup> demuestran que los niveles de expresión de CYP2E1 disminuyen en ratones ante el tratamiento con APAP.



En relación a ello, analizamos la expresión de CYP2E1 tanto a nivel de mRNA, mediante qPCR, como a nivel de proteína mediante *Western blot*. Los resultados muestran que la expresión de CYP2E1 a ambos niveles (Figura 54A mRNA, Figura 55B proteína) en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> tratados con 300 mg/kg de APAP disminuye, como era esperable. Sin embargo, sorprendentemente y en consistencia con lo observado en el modelo de daño hepático por CCl<sub>4</sub>, los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con APAP presentan un retraso o un impedimento en la reducción de los niveles de CYP2E1, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Figura 54).



**Figura 54. Los ratones haploinsuficientes para *Slu7* presentan una expresión mantenida de CYP2E1 en el daño hepático agudo por APAP. (A)** Niveles de expresión del mRNA de *Cyp2e1* mediante qPCR en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 6 o 12 horas tras la administración. **(B)** Análisis por *Western blot* de la proteína CYP2E1 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados como en el apartado A. Se muestra actina como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 46B. Los datos de la gráfica están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

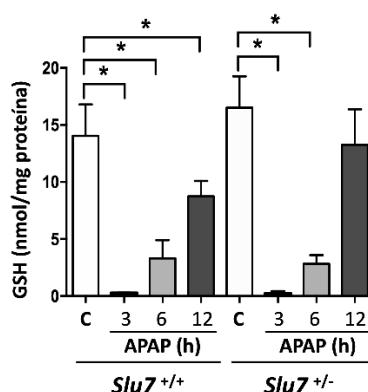
Además de los resultados anteriores, esta expresión mantenida de CYP2E1 podría contribuir a la mayor hepatotoxicidad por APAP de los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> <sup>300,315,316</sup>. En este sentido, se ha descrito que CYP2E1 posee una actividad oxidasa que resulta en un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicales hidroxilo y radicales superóxido <sup>317</sup>, que favorecen la formación de aductos proteicos de nitrotirosina (3-NT) <sup>318</sup>. En consistencia con ello, la estabilización de CYP2E1 en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> podría contribuir al mayor estrés oxidativo que presentan estos ratones, evidenciado por la acumulación de ROS en el hígado (Figura 48) y por el incremento en los niveles de nitración de las proteínas (3-NT) (Figura 47).

En conjunto, con estos resultados demostramos que SLU7 es necesario para mantener la diferenciación hepática que, en este caso, favorece el correcto funcionamiento de la capacidad antioxidante y metabolizadora de fármacos del hígado.

### 8.6. La haploinsuficiencia de *Slu7* no afecta a la detoxificación a través de glutatión

Durante el proceso de metabolismo de APAP a través del CYP2E1, el metabolito reactivo NAPQI generado se detoxifica del organismo por conjugación con GSH. Un acontecimiento diferencial en la toxicidad hepática inducida por APAP es la depleción intracelular de los niveles de GSH, lo que facilita, por tanto, la formación de aductos proteicos entre la molécula NAPQI y proteínas endógenas de los hepatocitos, con la consecuente generación de estrés oxidativo. Se ha demostrado que los ratones *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> recuperan los niveles basales de GSH más rápido que los ratones de cepa salvaje, sugiriendo una recuperación más rápida del estrés oxidativo<sup>317</sup>.

De acuerdo con ello, y para completar el panel de metabolismo de APAP, decidimos medir los niveles de GSH, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> y *Slu7*<sup>+/+</sup> antes y después de la administración del tratamiento de 300 mg/kg APAP. De manera basal, observamos que no hay diferencias significativas en los niveles de GSH entre ambos genotipos, aunque los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> poseen una tendencia a presentar niveles ligeramente superiores (Figura 55). El tratamiento con APAP indujo una rápida y similar depleción de los niveles de GSH en ambos genotipos. Sin embargo, a las 12 horas de la administración de APAP, los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> prácticamente ya habían recuperado los niveles basales de GSH (Figura 55). Estos datos sugieren que SLU7 no participa en la disponibilidad y recuperación de los niveles de GSH para el metabolismo de APAP, de manera que por esta vía no influiría en los mecanismos de hepatotoxicidad.

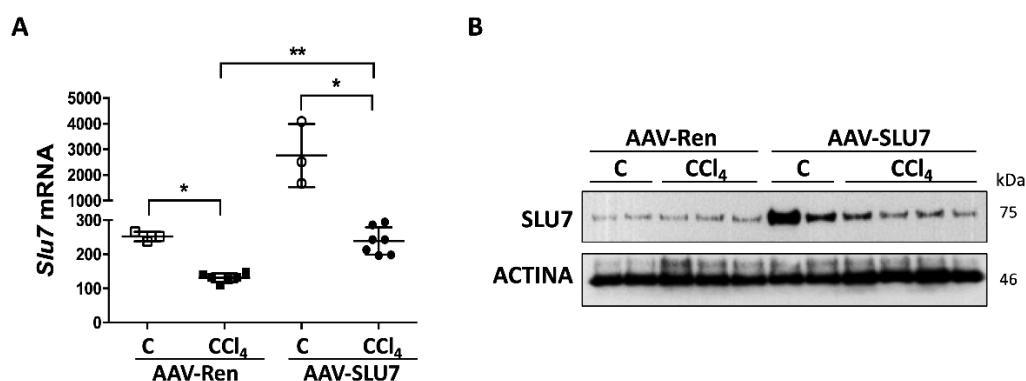


**Figura 55. Cuantificación de glutatión en ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> tratados con APAP.** Cuantificación de los niveles de glutatión (GSH) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> y *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático agudo inducido por acetaminofén (APAP), o en ratones control (C), sacrificados a las 3, 6 o 12 horas tras la administración de APAP. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

En conjunto, nuestros datos demuestran que SLU7, al controlar la diferenciación de los hepatocitos favorece la detoxificación del fármaco APAP por rutas metabólicas no tóxicas.

## **9. LA RESTAURACIÓN DE LOS NIVELES DE SLU7 EN EL HÍGADO PROTEGE FRENTE AL DAÑO CRÓNICO**

Nuestros resultados demuestran que una reducción en la expresión de SLU7 en el hígado incrementa su sensibilidad al daño, en paralelo a una pérdida de la expresión de genes hepato-específicos y de las funciones de dicho órgano, presentando a SLU7 como un agente hepato-protector. Por ello, decidimos evaluar el potencial terapéutico de una estrategia para prevenir la disminución de la expresión de SLU7 durante la lesión hepática. Para ello, utilizamos ratones de cepa salvaje a los que les inyectamos a través del plexo retro-orbital los AAV que expresan SLU7 (AAV-SLU7) o *Renilla* como control (AAV-Ren), bajo el control de un promotor hepato-específico<sup>55</sup>. Después de dos semanas, a estos ratones se les indujo daño hepático crónico con CCl<sub>4</sub> y se analizaron los niveles de SLU7. Los ratones inyectados con el AAV-SLU7 y tratados con el vehículo aceite de maíz expresan niveles elevados de SLU7 (Figura 56A-B). Sin embargo, el tratamiento de estos ratones con CCl<sub>4</sub> redujo significativamente la expresión de SLU7. Esto se debe a que, como se ha mostrado en el apartado 4 de Resultados, el daño crónico por CCl<sub>4</sub> favorece la desdiferenciación del parénquima hepático y la disminución en la expresión de genes hepato-específicos. Este efecto, por tanto, afecta de igual modo a la disminución de la expresión de los promotores hepato-específicos y por lo tanto del trasgen *Slu7* administrado. No obstante, a pesar de la expresión reducida de SLU7, los niveles observados fueron superiores a los de los ratones control AAV-Ren tratados con CCl<sub>4</sub>, y semejantes a los de los ratones control sin daño (AAV-Ren y tratados con el vehículo aceite de maíz) (Figura 56A-B).



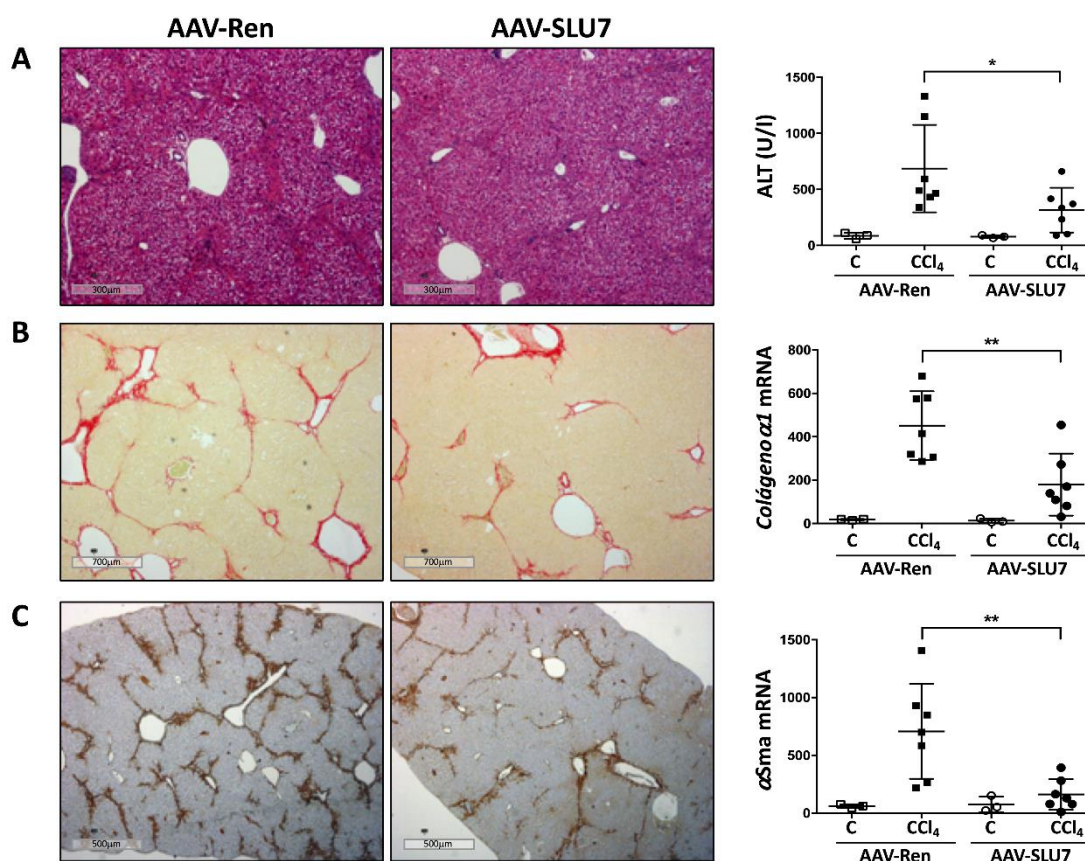
**Figura 56. Niveles de expresión de SLU7 en el hígado de los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> tras la inyección de AAV-Ren y AAV-SLU7 y el tratamiento con CCl<sub>4</sub>.** (A) Análisis de la expresión del mRNA de *Slu7* mediante qPCR en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> infectados con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7) durante 15 días, y que fueron tratados posteriormente por vía intraperitoneal con una dosis 0,6  $\mu$ L/g CCl<sub>4</sub> diluido en aceite de maíz, o con el volumen correspondiente del vehículo aceite de maíz (C), dos veces por semana durante 6,5 semanas. (B) Análisis por *Western blot* de la proteína SLU7 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> tratados como en el apartado A. Se muestra actina como control de carga. Los datos de la gráfica están representados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

De este modo, en nuestro modelo de daño crónico inducido por la administración de CCl<sub>4</sub>, con la administración del vector AAV-SLU7 conseguimos preservar unos niveles fisiológicos de SLU7.

### 9.1. Prevenir la caída de SLU7 mediada por el daño crónico inducido por CCl<sub>4</sub> atenúa el daño hepático

En estas condiciones de experimentación descritas, estudiamos cómo afecta la prevención de la caída de SLU7 en la progresión del daño hepático crónico. Para ello, analizamos diferentes marcadores de daño.

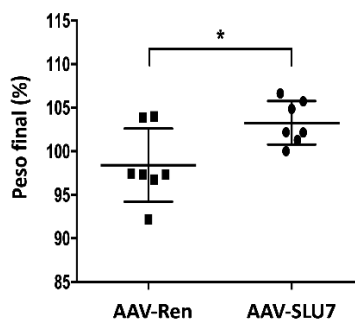
En primer lugar, la tinción con H&E en secciones representativas de tejido hepático reveló una mejora en la arquitectura del parénquima hepático en los ratones AAV-SLU7 tratados con CCl<sub>4</sub> en comparación con los ratones control AAV-Ren, así como una reducción significativa en los niveles de la transaminasa hepática alanina aminotransferasa (ALT) en suero (Figura 57A).



**Figura 57. Preservar la expresión de SLU7 en el hígado protege frente al daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>.** Los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> se inyectaron con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7) durante 15 días, y fueron tratados posteriormente por vía intraperitoneal con una dosis 0,6 μL/g CCl<sub>4</sub> diluido en aceite de maíz, o con el volumen correspondiente del vehículo aceite de maíz (C), dos veces por semana durante 6,5 semanas. **(A)** Tinción de hematoxilina y eosina en secciones representativas del hígado de ratones inyectados con AAV y tratados con CCl<sub>4</sub>, y medición de los niveles de la transaminasa hepática alanina aminotransferasa (ALT) en suero. Barra de escala: 300 μm. **(B)** Tinción rojo sirio en secciones representativas de hígado y análisis por qPCR de la expresión del mRNA de *Colágeno α1*. Barra de escala: 700 μm. **(C)** Inmunohistoquímica de αSMA y niveles de expresión del mRNA por qPCR de *αSma*. Barra de escala: 500 μm. Los datos de las gráficas se representan como media ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. Abreviaturas: U/l, unidades/litro.

Además, evaluamos el efecto de la prevención de la caída de SLU7 sobre el desarrollo de fibrosis en el hígado. La tinción con rojo sirio en secciones hepáticas representativas reveló una menor acumulación de colágeno en los ratones AAV-SLU7 tratados con CCl<sub>4</sub>, y el análisis por qPCR de los niveles del mRNA de *Colágeno α1* también mostró su menor expresión (Figura 57B). En concordancia, en estos ratones detectamos una marcada supresión en la activación de las HSC, evidenciado por una menor expresión de αSMA a nivel de proteína, detectado mediante IHQ, y a nivel de mRNA, cuantificado por qPCR (Figura 57C).

Finalmente, la insuficiencia hepática se ha asociado con una reducción en el tamaño del hígado <sup>319</sup>. Así, como medida indirecta del daño, medimos el peso corporal de los ratones después del tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub>, encontrando una menor pérdida de peso en los ratones AAV-SLU7 (Figura 58).



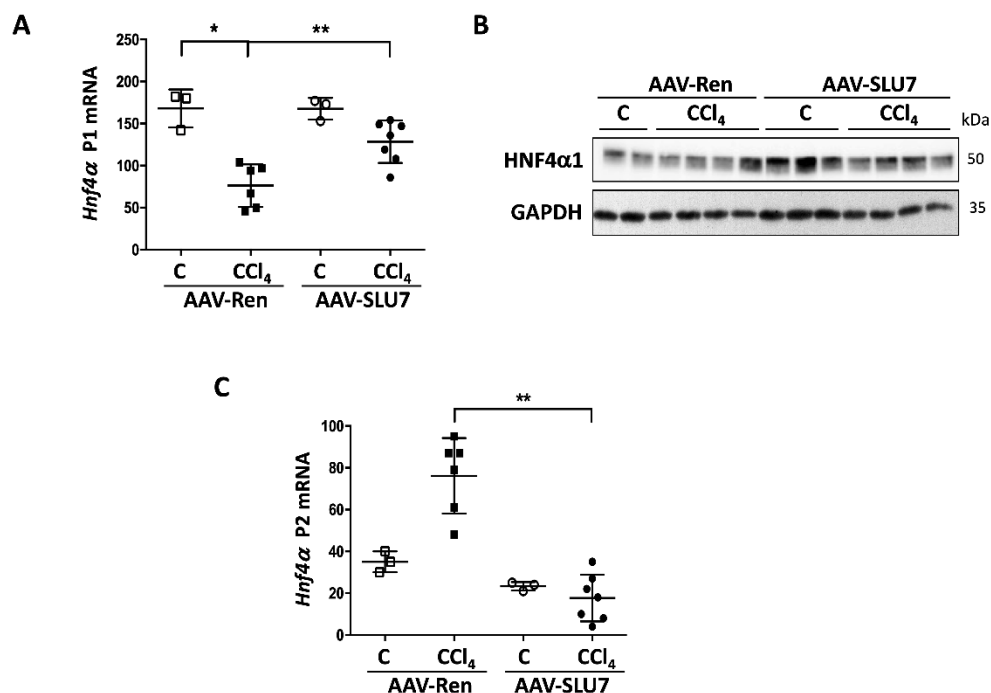
**Figura 58. Representación del peso corporal en ratones ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> inyectados con AAV-Ren o AAV-SLU7 y tratados con CCl<sub>4</sub>.** Medición del peso corporal en los ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> inyectados con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7), y con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub>. El peso se ha representado como el porcentaje con respecto al peso registrado al inicio del tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Los datos se representan como media ± SEM. \**P* < 0.05.

Todos estos datos evidencian que prevenir la pérdida de SLU7 en el hígado lo protege frente al daño crónico.

## 9.2. La sobreexpresión de SLU7 en el hígado previene la desdiferenciación y el estrés oxidativo generados por el daño crónico

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo por el que SLU7 ejerce la protección del hígado frente al daño, evaluamos el estadio de diferenciación hepática a través del análisis de HNF4α y de sus dianas.

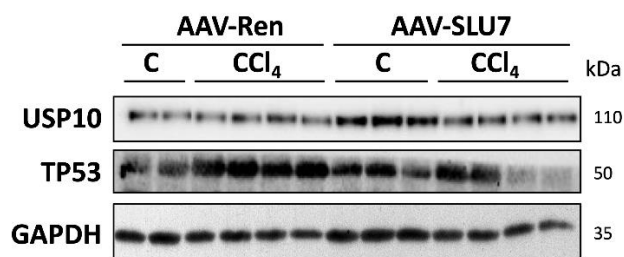
En primer lugar, analizamos la expresión de las isoformas de HNF4α derivadas de sus dos promotores, P1 y P2. La medición de la expresión del mRNA mediante qPCR (Figura 59A), y de proteína mediante *Western blot* (Figura 59B), demostró que la disminución en la expresión desde P1 en el daño por CCl<sub>4</sub> se atenúa en los ratones AAV-SLU7. Además, la actividad desde el promotor P2 inducida por el CCl<sub>4</sub> se inhibió de forma significativa en estos ratones (Figura 59C).



**Figura 59. La sobreexpresión de SLU7 en el hígado previene la alteración en el uso del promotor de HNF4α mediada por el daño crónico por CCl<sub>4</sub>.** (A) Análisis por qPCR de los niveles de expresión del mRNA de las isoformas de *Hnf4α* expresadas desde el promotor P1, en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> inyectados con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7), y con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub> o en ratones control (C). (B) Análisis por *Western blot* de la proteína HNF4α1 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> tratados como en A. La expresión de GAPDH se muestra como control de carga. (C) Análisis por qPCR de los niveles de expresión del mRNA de las isoformas de *Hnf4α* expresadas desde el promotor P2 en el hígado de ratones *Slu7*<sup>+/+</sup> tratados como en A. Los datos de las gráficas están representados como la media ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

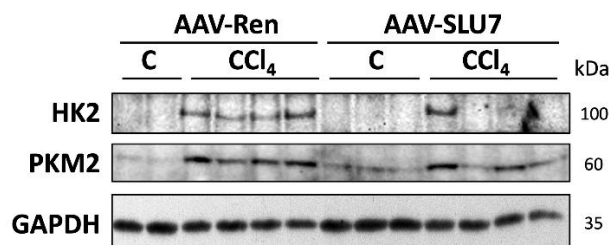
Así, la expresión mantenida de SLU7 fue capaz de preservar la expresión de HNF4α más característica de un hepatocito adulto funcional.

Como describimos en el presente trabajo, la regulación de HNF4α está mediada por el estrés oxidativo y, más concretamente, por USP10. Por ello, evaluamos en este modelo el efecto de mantener la expresión de SLU7 sobre esta regulación. El análisis por *Western blot* reveló una expresión mantenida de USP10 en los ratones AAV-SLU7 tratados con CCl<sub>4</sub> en comparación con los animales AAV-Ren (Figura 60), en concordancia con el mantenimiento de la expresión de HNF4α1 (Figura 59A-B). Adicionalmente, evaluamos los niveles de proteína TP53 como marcador de estrés, encontrando una disminución en su expresión cuando prevenimos la caída de SLU7 durante el daño en los ratones AAV-SLU7 (Figura 60).



**Figura 60.** La sobreexpresión de SLU7 en el hígado revierte el estrés oxidativo mediado por el daño hepático crónico por  $\text{CCl}_4$ . Análisis por *Western blot* de las proteínas USP10 y TP53 en el hígado de ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* inyectados con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7), y con daño hepático crónico inducido por  $\text{CCl}_4$  o en ratones control (C). La expresión de GAPDH se muestra como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 59B.

Para confirmar la implicación de SLU7 en el mantenimiento del fenotipo hepático diferenciado, analizamos la expresión de otros marcadores de desdiferenciación hepática como son las isoformas fetales u oncogénicas HK2 y PKM2. En el análisis por *Western blot* detectamos que estas proteínas se inducen en el hígado de los ratones tratados con  $\text{CCl}_4$ , mientras que la sobreexpresión de SLU7 (AAV-SLU7) fue capaz de atenuar esta elevación (Figura 61).



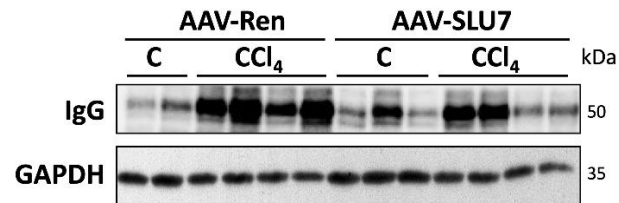
**Figura 61.** La sobreexpresión de SLU7 en el hígado previene la inducción de isoformas fetales durante el daño hepático crónico por  $\text{CCl}_4$ . Análisis por *Western blot* de las proteínas HK2 y PKM2 en el hígado de ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* inyectados con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7), y con daño hepático crónico inducido por  $\text{CCl}_4$  o en ratones control (C). La expresión de GAPDH se muestra como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 59B.

Este resultado confirma que prevenir la caída de SLU7 durante el daño ayuda a mantener un fenotipo hepático más diferenciado.

Finalmente, analizamos qué impacto tiene prevenir la desdiferenciación hepática sobre funciones específicas del hígado. Así, como ejemplo representativo, analizamos el catabolismo de las IgG. El análisis por *Western blot* reveló una reducción en la acumulación de proteínas



IgG en el hígado dañado por CCl<sub>4</sub> de los ratones AAV-SLU7 (Figura 62), sugiriendo que la sobreexpresión de SLU7 promueve una mejora en la preservación de las funciones normales del hígado.



**Figura 62. La sobreexpresión de SLU7 en el hígado recupera el correcto catabolismo de las inmunoglobulinas.** Detección por *Western blot* de la acumulación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas G (IgG) en el hígado de ratones *Slu7<sup>+/+</sup>* inyectados con el virus adenoasociado control (AAV-Ren) o con el virus adenoasociado que expresa SLU7 (AAV-SLU7), y con daño hepático crónico inducido por CCl<sub>4</sub> o en ratones control (C). La expresión de GAPDH se muestra como control de carga. Las muestras son las mismas que las de la figura 59B.

En conclusión, estos resultados demuestran y confirman que SLU7 tiene un papel esencial durante el desarrollo de daño en el hígado, de forma que mantener sus niveles ayuda a preservar las funciones hepato-específicas del hígado y a protegerlo frente al daño crónico, representando una nueva posible estrategia terapéutica.



## **DISCUSIÓN**

---



La carga sanitaria de las enfermedades hepáticas está aumentando en todo el mundo debido a que, junto a los factores etiológicos tradicionales como son el virus de la hepatitis B o C y el consumo excesivo de alcohol, las nuevas tendencias en el consumo de dietas hipercalóricas o el aumento del sedentarismo, han incrementado la prevalencia de obesidad, diabetes y síndrome metabólico, convirtiéndose éstos en los principales factores de riesgo actual, que afectan a un tercio de la población adulta en Europa <sup>13,15,320–323</sup>. Es importante señalar que, durante el desarrollo de la enfermedad hepática aguda o crónica, la pérdida de función hepática dictamina el pronóstico de los pacientes, independientemente de su etiología <sup>32</sup>. Durante los últimos años, numerosos estudios, incluyendo los desarrollados por nuestro grupo, han demostrado que la disfunción hepática no solo se asocia con la muerte de los hepatocitos, sino también con la desdiferenciación del parénquima hepático remanente <sup>4,67</sup>. Esta desdiferenciación se produce por la pérdida de expresión de genes característicos de los hepatocitos a consecuencia de la generación de un microambiente enriquecido en citoquinas, factores de crecimiento, estrés oxidativo y remodelado de la matriz extracelular <sup>4,67,91,93,97,98,111,112,324</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso todavía no se conocen con precisión.

Durante el desarrollo del hígado, la diferenciación de los hepatocitos y la adquisición de las funciones hepáticas dependen de la correcta expresión de una serie de enzimas y proteínas controladas transcripcionalmente mediante la acción de numerosos factores de transcripción entre los que destacan HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$ , HNF6, CEBP $\alpha/\beta$  o FOXA <sup>4,169</sup>. Más recientemente se ha demostrado que en este proceso también participan, de manera esencial, factores de *splicing* como SLU7 <sup>55</sup>, SRSF3 <sup>54</sup> o ESRP2 <sup>52</sup>.

En este sentido, en los últimos años, nuestro grupo ha demostrado que la expresión del factor de *splicing* SLU7 es necesaria para mantener el fenotipo diferenciado y quiescente de los hepatocitos adultos a través de la regulación del transcriptoma hepático <sup>55</sup>. Además, nuestros datos muestran que SLU7 regula la expresión de HNF4 $\alpha$  y de SRSF3, de manera que SLU7 se sitúa jerárquicamente por encima de reguladores hepáticos esenciales para la diferenciación y función hepatocelular <sup>54,105</sup>. Además, nuestros resultados anteriores mostraron que la expresión de *SLU7* a nivel de mRNA se encuentra significativamente reducida en la enfermedad hepática, concretamente en el hígado de pacientes con cirrosis y en el HCC <sup>124</sup>. Todos estos datos previos sugieren que la desregulación de la expresión de SLU7 en el hígado enfermo podría desempeñar un papel en la desdiferenciación de los hepatocitos y en la pérdida de función hepática. Así, en el presente trabajo demostramos, en primer lugar, que la

reducción en la expresión de SLU7 también se produce a nivel de proteína, tanto en el hígado de pacientes con cirrosis como en modelos en ratón de daño hepático crónico por CCl<sub>4</sub> y agudo por APAP. Cabe destacar que, en el modelo de daño agudo, no observamos cambios en la expresión de *Slu7* a nivel de mRNA. Esto podría indicar que existen mecanismos asociados al daño que pueden inducir la deslocalización y degradación de la proteína SLU7. Así mismo, los niveles mantenidos del mRNA de *Slu7* podrían representar un evento compensatorio de inducción de la transcripción, como consecuencia de la rápida reducción observada por inmunohistoquímica en la proteína. Tampoco se puede descartar que la expresión del mRNA de *Slu7* detectada en el extracto de hígado total de los ratones tratados con APAP, provenga de otros componentes celulares como, por ejemplo, células inflamatorias que aumentan su presencia en el hígado rápidamente tras el daño <sup>325,326</sup>, camuflando así la posible reducción del mRNA de *Slu7* en los hepatocitos. Así, aunque los mecanismos quedan por aclarar, nuestros datos confirman que los niveles de SLU7 disminuyen en el hígado dañado. Además, esta disminución es paralela a una clara alteración en la expresión del factor de transcripción HNF4 $\alpha$ , tanto en el hígado de los pacientes como en los modelos animales.

El factor de transcripción HNF4 $\alpha$ , es un regulador esencial para promover la diferenciación de los hepatocitos y la morfogénesis en el hígado fetal <sup>38,49,164</sup> y para mantener la diferenciación y función hepáticas en el hígado adulto <sup>8,67,128,129,131</sup>. La expresión de HNF4 $\alpha$  está controlada por el uso alternativo de los promotores P1 y P2 en función del estado de maduración de la célula de forma que, junto con la regulación por *splicing* alternativo del extremo C-terminal, se pueden generar hasta 12 isoformas diferentes de HNF4 $\alpha$ . Así, el promotor P1 se expresa en el hígado adulto y genera 6 isoformas que incluyen el exón 1A <sup>67,133,134</sup> y que ejercen su actividad sobre la transcripción de genes que codifican para la diferenciación hepática <sup>135,138,200</sup>, mientras que el promotor P2 se expresa fundamentalmente en el hígado fetal durante el desarrollo generando 6 isoformas que incluyen el exón 1D <sup>67,133,134</sup> y que son más eficientes en la activación de genes propios de hepatocitos fetales como la AFP <sup>195</sup>. Es importante señalar que ambos promotores se regulan de forma recíproca. Se ha demostrado que la expresión de proteínas derivadas del promotor P1 activa el promotor P1 <sup>38</sup> e inhibe el promotor P2 <sup>139,147</sup>.

Numerosos estudios apoyan firmemente la participación de la desregulación de HNF4 $\alpha$  en el daño hepático. En este sentido, se ha descrito una disminución en la expresión de HNF4 $\alpha$  en la enfermedad hepática crónica <sup>93,96,97</sup>, incluyendo la hepatitis alcohólica <sup>98,189</sup>, la cirrosis <sup>93,104,191</sup> o el HCC <sup>191,193</sup>, así como en el fallo hepático agudo <sup>94,104,194</sup>. Algunos estudios también

demuestran que tanto en modelos animales <sup>197</sup> como en muestras de pacientes con hepatitis alcohólica <sup>98</sup> o con HCC <sup>143,198</sup>, la reducción de la expresión de HNF4 $\alpha$  se acompaña de un cambio en el uso de su promotor desde el P1 hacia el P2. En concordancia con ello, en el presente trabajo demostramos que existe una alteración en el uso del promotor de *HNF4 $\alpha$* , tanto en pacientes con cirrosis como en el modelo de daño hepático crónico por CCl<sub>4</sub> en ratones, favoreciendo la expresión desde el promotor P2 y reprimiendo la expresión desde el promotor P1. De acuerdo con ello, observamos la pérdida de expresión de proteínas de HNF4 $\alpha$  derivadas del promotor P1 (HNF4 $\alpha$ 1) en el hígado de pacientes con cirrosis, HCC o fallo hepático agudo, así como en los modelos animales de daño hepático.

Los cambios moleculares que promueven la pérdida o la alteración de la expresión de HNF4 $\alpha$  durante el fallo hepático crónico todavía no se conocen con precisión. En este sentido, nuestro grupo ha propuesto que, a nivel transcripcional, la inhibición de la expresión de *HNF4 $\alpha$*  podría estar mediada por el aumento en la expresión del factor de transcripción *WT1* en estadios preneoplásicos <sup>93</sup>. Además, nuestro grupo también ha demostrado que el silenciamiento específico de *SLU7* en el hígado sano de ratones disminuye la expresión de *Hnf4 $\alpha$*  desde el promotor P1 en paralelo a la activación de la expresión de *Wt1* <sup>55</sup>. En base a todo ello, postulamos que existe una relación entre la regulación de *SLU7* y HNF4 $\alpha$ , que puede estar implicada en el desarrollo del daño hepático y la pérdida de función del hígado durante el proceso de hepatocarcinogénesis. Así, en el presente trabajo, mediante el uso de ratones haploinsuficientes de *SLU7*, nos hemos centrado en caracterizar el papel de *SLU7* en la regulación de la expresión de HNF4 $\alpha$ . Nuestros datos muestran que los ratones heterocigotos presentan niveles reducidos de expresión de las isoformas de HNF4 $\alpha$  derivadas del promotor P1 tanto a nivel del mRNA como de la proteína. De acuerdo con ello, tras el daño, no solo se exagera esta disminución en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup>, sino que se observa una mayor inducción de las isoformas de HNF4 $\alpha$  derivadas del promotor P2. Ahondando en los mecanismos implicados y utilizando células en cultivo, observamos que la regulación de HNF4 $\alpha$  por *SLU7* en las células hepáticas no depende de otros componentes celulares o señales del microambiente tisular, y sorprendentemente no es a nivel transcripcional o de síntesis de proteína, sino a nivel de su estabilidad. Así, nuestros datos muestran que:

1. El silenciamiento específico de *SLU7* en líneas celulares hepáticas humanas desestabiliza la proteína HNF4 $\alpha$ 1 a tiempos muy tempranos, sin afectar a sus niveles de mRNA.
2. El silenciamiento específico de *SLU7* no altera la actividad transcripcional de tres construcciones diferentes del promotor de *HNF4 $\alpha$*  analizadas.

3. Además, incluso cuando la síntesis de proteínas está inhibida mediante el tratamiento con CHX, la expresión de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 se reduce tras el silenciamiento de SLU7.
4. Por último, el tratamiento con el inhibidor del proteasoma, MG-132, previene la caída de HNF4 $\alpha$ 1 observada al silenciar SLU7, sugiriendo que el silenciamiento de SLU7 promueve la degradación de HNF4 $\alpha$ 1.

Por todo ello, nuestros datos muestran que SLU7 es necesario para mantener la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1 de manera autónoma en las células hepáticas.

Se han descrito diversos mecanismos post-transcripcionales que afectan a la estabilidad o a la actividad de HNF4 $\alpha$ , incluyendo su acetilación<sup>151</sup> o su fosforilación<sup>153,156,157</sup>. En este sentido, se ha detectado la traslocación citoplasmática de HNF4 $\alpha$  como consecuencia de estas dos modificaciones en los hepatocitos de pacientes con cirrosis avanzada<sup>204</sup>. Así mismo, el estrés oxidativo asociado a la enfermedad del hígado graso induce la retención citoplasmática de HNF4 $\alpha$  en los hepatocitos, mediada por la fosforilación por PKC<sup>205</sup>. Por otro lado, previamente se había descrito que la fosforilación de HNF4 $\alpha$  por PKC en la Ser78 favorece la retención citoplasmática de esta proteína y su posterior degradación a través del proteasoma, con la consiguiente disminución de los niveles endógenos de proteína total<sup>128,153</sup>. Aquí confirmando nuestros datos previos<sup>211</sup>, demostramos que la disminución de la expresión de SLU7 induce estrés oxidativo, tanto en las células en cultivo tras el silenciamiento de SLU7, como en los ratones haploinsuficientes. Por ello, decidimos evaluar la participación del estrés oxidativo en la disminución de la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 mediada por el silenciamiento de SLU7 en células hepáticas, demostrando que tanto un tratamiento antioxidante con NAC como el silenciamiento de la PKC rescatan la caída de la proteína HNF4 $\alpha$  observada tras el silenciamiento de SLU7.

Estos datos muestran un nuevo papel de SLU7 en el mantenimiento de la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1, al prevenir el estrés oxidativo que mediaría su degradación por el proteasoma. De esta forma, y dada la regulación recíproca descrita de los promotores de *HNF4 $\alpha$* <sup>38,147</sup>, postulamos que la disminución de la expresión de SLU7 durante la enfermedad hepática estaría induciendo la degradación de la proteína HNF4 $\alpha$ 1, que sería responsable del cambio en el uso de los promotores de *HNF4 $\alpha$*  inhibiendo el promotor P1 e induciendo el P2. En este punto cabe discutir que este cambio transcripcional no lo observamos en las células en cultivo, quizás porque estamos analizando estos eventos a un tiempo temprano, pudiendo ser necesario más tiempo para observar el efecto autorregulatorio sobre la transcripción.



Tampoco podemos descartar que la regulación transcripcional de *HNF4α* pueda estar alterada al tratarse de células transformadas o que esté influenciada por otros eventos adicionales y/o complementarios que requieran de señales extracelulares no presentes en los cultivos celulares.

Todos estos resultados sugieren que la pérdida de expresión de SLU7 en el hígado durante el daño hepático contribuye a la desdiferenciación y a la pérdida de función hepáticas de forma muy significativa a través de la desregulación de HNF4α1 mediada por el estrés oxidativo. De hecho, además de la estabilidad de la proteína HNF4α1, muchos de los eventos que tienen lugar en la célula<sup>55,56,211</sup> al disminuir la expresión de SLU7 están relacionados con la inducción de estrés oxidativo, como por ejemplo el daño en el DNA. Por ello, en el presente trabajo, tratamos de descifrar los mecanismos de protección frente al estrés oxidativo mediados por SLU7. Se ha descrito que en situaciones de estrés, SLU7 puede sufrir una traslocación desde el núcleo hasta el citoplasma mediada por la fosforilación de JNK<sup>216</sup>. En concordancia con ello, durante el daño hepático agudo inducido por APAP, detectamos un aumento de la expresión de SLU7 en el citoplasma de los hepatocitos en paralelo con la fosforilación de JNK. De manera basal, en líneas celulares, aunque la mayor parte de la proteína SLU7 la encontramos en el núcleo, unido a la cromatina, también detectamos una fracción en el citoplasma. De acuerdo con ello, el análisis por espectrometría de masas y la posterior validación en el laboratorio mediante Co-IP demuestran que SLU7 interacciona con componentes de los SG citoplasmáticos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos gránulos, ante situaciones de estrés que inhiben la traducción de proteínas, se agrupan para proteger mediante ribonucleoproteínas el mRNA citoplasmático hasta que cesa el estrés<sup>289,290</sup>. De hecho, muchas de estas proteínas, y en particular G3BP1 y USP10, poseen además actividad antioxidante<sup>291,292,296</sup>. De esta forma, los SG constituyen una importante respuesta frente al estrés oxidativo en la célula. Nuestros datos actuales muestran que SLU7 interacciona con G3BP1 y USP10, y regula su expresión asegurando, de esta forma, la correcta formación de los SG durante la inducción de estrés oxidativo. En este sentido, estos datos podrían estar de acuerdo con datos publicados que muestran la traslocación de SLU7 al citoplasma y su distribución en vesículas que recuerdan a los gránulos de estrés en respuesta a un estrés inducido por tapsigargina<sup>217</sup>.

Aunque todavía faltan por elucidar los mecanismos específicos que involucran a SLU7 en la estabilización de los componentes de los SG, en este trabajo hemos identificado un nuevo mecanismo por el que SLU7 participa en la respuesta celular frente al estrés oxidativo

regulando la correcta expresión de la proteína antioxidante USP10. Además, y de forma llamativa, esta actividad antioxidante es esencial para mantener la estabilidad de la proteína HNF4 $\alpha$ 1. Nuestros resultados *in vivo* confirman que la haploinsuficiencia de *Slu7* favorece la disminución de la expresión de USP10 durante el daño hepático, lo cuál, podría contribuir al incremento en los niveles de ROS, a la disminución en la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 y a la inducción de resistencia a la insulina <sup>327</sup>. Estos resultados y mecanismos cobran importancia clínica ya que, en pacientes con cirrosis, con HCC o con fallo hepático agudo, encontramos que la disminución en la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 es paralela a la disminución de USP10. De acuerdo con ello, recientemente se ha descrito la reducción de USP10 en el hígado de pacientes con NAFLD <sup>327</sup> y en pacientes con HCC con peor pronóstico <sup>328</sup>. En ambos estudios se describen mecanismos asociados con la función proteasa específica de ubiquitina de USP10, de manera que USP10 estabilizaría proteínas como la Sirtuina 6, la AMPKa o la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN, *phosphatase and tensin homolog*) a través de su interacción con ellas. El papel de la expresión de estas proteínas en nuestros modelos y en el incremento del daño hepático no se puede descartar y requiere de más estudios. Del mismo modo, tampoco podemos excluir un papel directo de USP10, como desubiquitinasa, en el mantenimiento de la estabilidad de HNF4 $\alpha$ 1. De hecho, y de acuerdo con datos publicados <sup>297</sup>, nuestros resultados muestran que USP10 interacciona con HNF4 $\alpha$ 1, haciendo necesarios nuevos experimentos para determinar la relevancia de esta interacción.

Desde un punto de vista fisiopatológico, muchos trabajos han demostrado que la pérdida de expresión de un factor central de la regulación hepática como es HNF4 $\alpha$  supone la alteración de la identidad hepática normal <sup>129-131,164,166,176,182</sup>. Así, el silenciamiento específico de la expresión de *Hnf4 $\alpha$*  en el hígado durante el desarrollo embrionario en ratones supone la disrupción de la arquitectura hepática y de funciones metabólicas características como son la gluconeogénesis o la síntesis de glucógeno <sup>163,164</sup>. En ratones adultos, la delección inducible de *Hnf4 $\alpha$*  en el hígado genera hepatomegalia y resulta en una profunda desregulación de la expresión de múltiples genes metabólicos induciendo, por ejemplo, una deposición anormal de glucógeno y de lípidos en el hígado <sup>129,130,176</sup>, así como un incremento en la expresión de genes implicados en la proliferación celular <sup>166,182,183</sup>. Durante la progresión de la enfermedad hepática, la disminución de la expresión de HNF4 $\alpha$  participa en la pérdida de las funciones hepáticas <sup>96,97,191</sup>. También, se ha demostrado que la disminución en la expresión de HNF4 $\alpha$  en pacientes con cirrosis clasificados por el grado de disfunción hepática según el índice Child-Pugh, se asocia con una menor expresión de genes hepato-específicos implicados en la

secreción de proteínas, en la producción de aminoácidos y en el metabolismo de xenobióticos<sup>97</sup>. En el presente trabajo, hemos demostrado que la expresión de HNF4 $\alpha$ 1 disminuye en la enfermedad hepática y que su disminución parece estar mediada por SLU7. Así, en los ratones haploinsuficientes para *Slu7*, la exacerbada disminución de HNF4 $\alpha$ 1 promueve una reducción en la expresión génica de sus dianas hepato-específicas como son *Hnf1a*<sup>170</sup>, *Alb*<sup>192</sup>, *Gys2*<sup>175</sup>, *Ttr*<sup>178</sup>, *Ugt1 $\alpha$* <sup>8,174,306</sup> y *Sod2*<sup>68</sup>. Estas alteraciones transcripcionales no solo tienen consecuencias funcionales, sino que además contribuyen al desarrollo del daño hepático. En este sentido, se ha demostrado que la respuesta al estrés depende ampliamente del estado de diferenciación celular<sup>152,180,329</sup>. De acuerdo con ello, los ratones haploinsuficientes para *Slu7*, que presentan una reducción basal en la expresión de estos genes, tienen una respuesta al estrés comprometida y, por tanto, están más sensibilizados al daño hepático. Por ejemplo, la menor expresión de *Gys2* y de *Ugt1 $\alpha$*  explicaría el menor almacenamiento de glucógeno, que se ha descrito que posee una función antioxidante<sup>264</sup>, así como la menor glucuronidación del APAP, favoreciendo su metabolismo por la ruta del CYP2E1 que genera metabolitos tóxicos y que, a su vez, induce más estrés oxidativo. Además, la disminución de la enzima antioxidante *Sod2* junto con la depleción de los niveles de glucógeno podría también contribuir al incremento en los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo observados en estos animales, e incrementar, por tanto, su susceptibilidad al daño hepático por CCl<sub>4</sub> o por APAP<sup>330</sup>, como se ha demostrado para los ratones haploinsuficientes para *Sod2*<sup>267,331</sup>.

Por otra parte, las alteraciones en la función hepática pueden también asociarse a la activación alternativa del promotor P2. Las isoformas P2 son más cortas que las P1 y carecen del dominio de activación AF-1 N-terminal, que permite la interacción con cofactores<sup>134</sup>, lo que podría hacer que su actividad fuera menor<sup>135,200</sup>. Así, por ejemplo, los ratones que solo emplean el promotor P2 presentan diferencias fenotípicas relacionadas con el metabolismo de lípidos con respecto a los ratones que utilizan P1<sup>138</sup>. Además, en humanos se ha demostrado que la transcripción desde el promotor P2 se asocia con un peor pronóstico en el HCC<sup>199</sup>, así como con resistencia a la insulina<sup>187</sup>. En nuestro trabajo, la alteración en el uso del promotor P1/P2, podría también influir en la disfunción hepática, y el aumento detectado en la expresión de isoformas de HNF4 $\alpha$  desde el promotor P2 podría contribuir a la resistencia a la insulina que presentan los ratones haploinsuficientes para *Slu7*, o los ratones con la expresión hepática de *Slu7* silenciada mediante AAV<sup>55</sup>.

Como novedad, en este trabajo hemos demostrado que SLU7 es fundamental para el mantenimiento del sistema antioxidante representado por los SG, que jugaría un papel

relevante en la estabilidad de HNF4 $\alpha$ 1 y la diferenciación y función de los hepatocitos. Sin embargo, nuestros datos muestran que existen otras alteraciones al disminuir SLU7 que podrían justificar un aumento del estrés oxidativo. Este es el caso del metabolismo hepático de los xenobióticos. Así, nuestros datos muestran que, tanto en líneas celulares transfectadas con el siSLU7 como en los ratones haploinsuficientes *Slu7*<sup>+/-</sup> con daño hepático, se observa una expresión mantenida de los niveles de CYP2E1, principal isoforma del sistema del CYP450 encargada de metabolizar toxinas hepatotóxicas como el CCl<sub>4</sub><sup>280</sup> o el APAP<sup>307</sup>. Así, el mantenimiento de la expresión de CYP2E1 durante el daño podría favorecer una mayor bioactivación del CCl<sub>4</sub> al radical libre CCl<sub>3</sub>\* y una mayor conversión de APAP en el metabolito altamente reactivo NAPQI, ambos implicados en el aumento de la producción de ROS en los hepatocitos<sup>301,332,333</sup>. Además, en el caso del APAP esta vía oxidante se vería favorecida en los ratones *Slu7*<sup>+/-</sup> al presentar una menor posibilidad de glucuronidación por acumular menos glucógeno y expresar menos niveles de *Ugt1 $\alpha$* . Numerosos datos demuestran el relevante papel que pueden jugar los niveles anormales de CYP2E1. Así, se ha demostrado que los ratones *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> son más resistentes a la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub><sup>281</sup> o por APAP<sup>307</sup>, mientras que la sobreexpresión de CYP2E1<sup>334,335</sup> o su inducción por tratamiento con etanol<sup>336</sup>, por sobreexpresión de interleucina 22 (IL-22, *interleukin 22*)<sup>315</sup> o por desórdenes metabólicos como la obesidad o la diabetes<sup>285,286,337</sup>, se asocia con un incremento en los niveles de estrés oxidativo y con una mayor susceptibilidad al daño hepático. En la enfermedad hepática también se han descrito niveles incrementados de CYP2E1 y de estrés nitrosativo paralelo en pacientes con enfermedad del hígado graso alcohólico, NAFLD y DILI<sup>286</sup>. Finalmente, los ratones inmaduros presentan una mayor susceptibilidad al daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub><sup>287</sup> y por APAP<sup>316</sup>, en comparación con los ratones adultos, y esto se ha asociado con una mayor expresión de CYP2E1. En conjunto, podríamos hipotetizar que la desregulación de SLU7 durante el daño hepático resulta en un hígado más inmaduro y propenso a la instauración del daño en parte mediada por una expresión aberrantemente mantenida de CYP2E1.

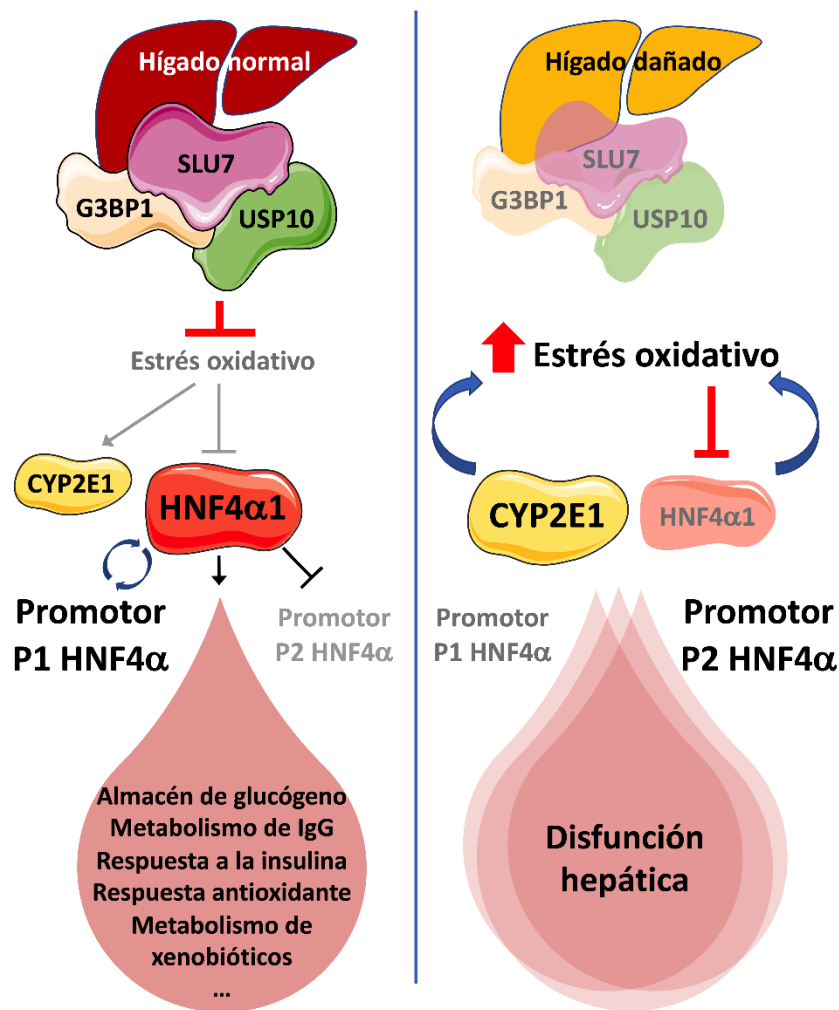
El mecanismo preciso de regulación de CYP2E1 por SLU7 todavía no está definido, pero según nuestros datos podría ser transcripcional y en él podrían participar tanto el estrés oxidativo como la resistencia a la insulina asociados a la disminución de SLU7. En concordancia con ello, se ha descrito que el estrés oxidativo induce la transcripción de *CYP2E1*<sup>338</sup>, y se ha propuesto que la insulina inhibe la transcripción de *CYP2E1*<sup>339</sup>, mientras que la resistencia a la insulina resulta en su inducción<sup>337,340,341</sup>. Así, podríamos especular que en ambos eventos podría participar la desregulación de USP10 mediada por la falta de SLU7 ya que, por un lado,

se asociaría con la inducción de estrés oxidativo y, por otro lado, se ha descrito que la disminución de USP10 se relaciona con la inducción de resistencia a la insulina<sup>327</sup>.

En definitiva, la respuesta celular al estrés oxidativo se orchestra a través de numerosos y diferentes mecanismos que, en última instancia, dictarán el destino final de la célula. El correcto funcionamiento de estos mecanismos depende ampliamente del estado de diferenciación de la célula. Nuestros resultados demuestran por primera vez que, en el hígado, SLU7 integra y conecta una correcta respuesta antioxidante con el mantenimiento de la diferenciación hepatocelular, y demostramos un nuevo mecanismo implicado en el mantenimiento de la estabilidad del factor de transcripción HNF4 $\alpha$ 1. Dada la relevancia de la pérdida de factores clave en el mantenimiento de la diferenciación y función hepatocelular durante la enfermedad hepática, restaurar la expresión de estos factores durante el progreso de la enfermedad para resetear la expresión génica hepatocelular normal y mejorar la función hepática, se plantea como una estrategia terapéutica diferenciadora. Así, por ejemplo, se han desarrollado diferentes estrategias para reintroducir HNF4 $\alpha$  en modelos animales de fibrosis, cirrosis y HCC, que son capaces de reactivar la expresión endógena de HNF4 $\alpha$  y restaurar la diferenciación y las funciones de los hepatocitos, e incluso revertir la fibrosis y la inflamación<sup>4,96,235,237-239,246,342</sup>. Entre estas estrategias se encuentran, por ejemplo, el empleo de la terapia génica, que ha permitido incorporar HNF4 $\alpha$  a través de vectores virales<sup>96,191,235</sup>, o la administración de moléculas saRNA dirigidos a regiones promotoras de HNF4 $\alpha$  que permiten reactivar su expresión<sup>237,246</sup>. De manera más reciente la terapia basada en el mRNA de *HNF4 $\alpha$*  formulado en nanopartículas lipídicas (mRNA-LNPs) no solo ha demostrado su eficacia en la mejora de la función hepática en modelos animales<sup>239</sup> sino también en hepatocitos aislados de pacientes con cirrosis<sup>238,239</sup>. De acuerdo con todas estas evidencias, nuestros datos muestran que prevenir la desregulación de la expresión de SLU7 en el hígado durante el daño hepático crónico mediante la administración de los AAV que expresan SLU7, recupera la expresión de USP10 y de HNF4 $\alpha$ 1, protegiendo al hígado frente al estrés oxidativo y favoreciendo el mantenimiento de la diferenciación y función hepatocelular, y representando así una nueva estrategia terapéutica.

En resumen, SLU7 tiene un papel fundamental en la diferenciación hepática, al controlar jerárquicamente factores implicados en el mantenimiento de la identidad hepática, protegiendo al hígado del estrés oxidativo y de la pérdida de función ante el daño. Además, en este trabajo demostramos que la pérdida de función hepática no solo se produce como

consecuencia del daño, sino que constituye un factor clave y determinante en la instauración y en el desarrollo del mismo. Así, nuestros resultados demuestran que pequeños cambios en la expresión de genes centrales de la homeostasis hepática como es por ejemplo SLU7, pueden influenciar drásticamente tanto la función del hígado como la progresión de la enfermedad hepática (Figura 63).



**Figura 63. Representación esquemática de los mecanismos que implican a SLU7 en preservar la diferenciación y función hepáticas.** SLU7 controla la estabilidad de la proteína HNF4α1, necesaria para la correcta diferenciación y función hepatocelular, a través de la protección frente al estrés oxidativo mediante el control de la función antioxidante de USP10. Adaptación de Gárate-Rascón M y cols. *Hepatology* (2021) <sup>343</sup>.

## **CONCLUSIONES**

---





1. La expresión de SLU7 se reduce en el hígado de pacientes con cirrosis y en modelos de ratón de daño hepático crónico y agudo, en paralelo a una alteración en el uso del promotor de *HNF4α*.
2. La reducción en la expresión de SLU7 sensibiliza al hígado frente al desarrollo de daño hepático crónico y agudo, aumentando la muerte de los hepatocitos y favoreciendo el desarrollo de fibrosis.
3. La reducción en la expresión de SLU7 durante el daño hepático crónico y agudo favorece la desdiferenciación de los hepatocitos, incluida la alteración en la regulación de la expresión de *HNF4α*. Esto promueve la reducción de la expresión de genes hepato-específicos y la consecuente pérdida de funciones hepáticas como, por ejemplo, el almacenamiento de glucógeno, la sensibilidad a la insulina, la protección frente al estrés oxidativo, el catabolismo de inmunoglobulinas o la correcta eliminación de xenobióticos.
4. SLU7 es necesario para mantener la estabilidad de la proteína *HNF4α1* a través de un mecanismo que implica la prevención del estrés oxidativo, probablemente mediante el control de la función antioxidante del componente de los gránulos de estrés USP10.
5. SLU7 es necesario para el correcto funcionamiento de mecanismos antioxidantes celulares que implican la correcta formación de los gránulos de estrés en respuesta al estrés oxidativo, a través de la regulación de la expresión de componentes de los gránulos con función antioxidante como G3BP1 y USP10.
6. Mantener los niveles de expresión de SLU7 protege al hígado frente al daño y la pérdida de función.
7. SLU7 es un factor central y esencial en la protección del hígado frente al daño, preservando la diferenciación y función hepatocelular, y representa una nueva diana terapéutica.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Zong, Y. & Stanger, B. Z. Molecular mechanisms of liver and bile duct development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 643–655 (2012).
2. Gordillo, M., Evans, T. & Gouon-Evans, V. Orchestrating liver development. *Dev.* **142**, 2094–2108 (2015).
3. Trefts, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. The liver. *Curr. Biol.* **27**, R1147–R1151 (2017).
4. Berasain, C. & Avila, M. A. Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3831–3851 (2015).
5. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. & Duncan, S. A. Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189 (2010).
6. Lawrence Jr, J. C. & Roach, P. J. New Insights Into the Role and Mechanism of Glycogen Synthase Activation by Insulin. *Diabetes* **46**, 541–547 (1997).
7. Prats, C., Graham, T. E. & Shearer, J. The dynamic life of the glycogen granule. *J. Biol. Chem.* **293**, 7089–7098 (2018).
8. Hwang-Verslues, W. W. & Sladek, F. M. HNF4 $\alpha$ -role in drug metabolism and potential drug target? *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 698–705 (2010).
9. Grant, D. M. Detoxification pathways in the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* **14**, 421–430 (1991).
10. Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M. & Pysopoulos, N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: A comprehensive update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* **4**, 131–142 (2016).
11. Ortiz de Montellano, P. R. Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Med. Chem.* **5**, 213–228 (2013).
12. Walther, R., Rautio, J. & Zelikin, A. N. Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **118**, 65–77 (2017).
13. Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J. & Kamath, P. S. Burden of liver diseases in the world. *J. Hepatol.* **70**, 151–171 (2019).
14. Malhi, H., Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol. Rev.* **90**, 1165–1194 (2010).
15. Karlsen, T. H. *et al.* The EASL–Lancet Liver Commission: protecting the next generation of Europeans against liver disease complications and premature mortality. *Lancet* **399**, 61–116 (2022).
16. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
17. Desai, A., Sandhu, S., Lai, J. P. & Sandhu, D. S. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World Journal of Hepatology* **11**, 1–18 (2019).
18. Hammer, J. H., Parent, M. C., Spiker, D. A. & World Health Organization. *Global status*

- report on alcohol and health 2018. Global status report on alcohol* **65**, (2018).
19. Sheron, N. Alcohol and liver disease in Europe – Simple measures have the potential to prevent tens of thousands of premature deaths. *J. Hepatol.* **64**, 957–967 (2016).
  20. Ivancovsky-Wajcman, D. *et al.* Ultra-processed food is associated with features of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* **41**, 2635–2645 (2021).
  21. Srour, B. *et al.* Ultraprocessed Food Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Among Participants of the NutriNet-Santé Prospective Cohort. *JAMA Intern. Med.* **180**, 283–291 (2020).
  22. Lane, M. M. *et al.* Ultraprocessed food and chronic noncommunicable diseases: A systematic review and meta-analysis of 43 observational studies. *Obes. Rev.* **22**, e13146 (2021).
  23. Flegal, K. M., Carroll, M. D., Kit, B. K. & Ogden, C. L. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999–2010. *JAMA* **307**, 491–497 (2012).
  24. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84 (2016).
  25. Torres, D. M., Williams, C. D. & Harrison, S. A. Features, Diagnosis, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 837–858 (2012).
  26. Abarca-Gómez, L. *et al.* Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* **390**, 2627–2642 (2017).
  27. Dong, V., Nanchal, R. & Karvellas, C. J. Pathophysiology of Acute Liver Failure. *Nutr. Clin. Pract.* **35**, 24–29 (2020).
  28. Andrade, R. J. *et al.* Drug-induced liver injury. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 58 (2019).
  29. Andrade, R. J. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: Drug-induced liver injury. *J. Hepatol.* **70**, 1222–1261 (2019).
  30. Haj, M. & Rockey, D. C. Predictors of clinical outcomes in cirrhosis patients. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **34**, 266–271 (2018).
  31. Lemmer, P., Pospiech, J. C. & Canbay, A. Liver failure—future challenges and remaining questions. *Ann. Transl. Med.* **9**, 734 (2021).
  32. Durand, F. & Valla, D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *Journal of Hepatology* **42**, S100–S107 (2005).
  33. Lemaigre, F. P. Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies. *Gastroenterology* **137**, 62–79 (2009).
  34. Gualdi, R. *et al.* Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: Cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* **10**, 1670–1682 (1996).

35. Tachmatzidi, E. C., Galanopoulou, O. & Talianidis, I. Transcription control of liver development. *Cells* **10**, 1–20 (2021).
36. Huppert, S. S. & Iwafuchi-Doi, M. Molecular regulation of mammalian hepatic architecture. *Curr. Top. Dev. Biol.* **132**, 91–136 (2019).
37. Campbell, S. A. *et al.* Signalling pathways and transcriptional regulators orchestrating liver development and cancer. *Development (Cambridge)* **148**, dev199814 (2021).
38. Kyrmizi, I. *et al.* Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev.* **20**, 2293–2305 (2006).
39. Cereghini, S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* **10**, 267–282 (1996).
40. 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).
41. Suzuki, A., Sekiya, S., Büscher, D., Belmonte, J. C. I. & Taniguchi, H. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. *Development* **135**, 1589–1595 (2008).
42. Stanger, B. Z. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 179–200 (2015).
43. Nagaoka, M. & Duncan, S. A. Transcriptional control of hepatocyte differentiation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **97**, 79–101 (2010).
44. Reizel, Y. *et al.* Collapse of the hepatic gene regulatory network in the absence of FoxA factors. *Genes Dev.* **34**, 1039–1050 (2020).
45. Bochkis, I. M. *et al.* Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* **14**, 828–836 (2008).
46. Locker, J., Ghosh, D., Luc, P. Van & Zheng, J. Definition and prediction of the full range of transcription factor binding sites - The hepatocyte nuclear factor 1 dimeric site. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3809–3817 (2002).
47. Odom, D. T. *et al.* Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science (80-. )*. **303**, 1378–1381 (2004).
48. Barbacci, E. *et al.* Variant Hepatocyte Nuclear Factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* **126**, 4795–4805 (1999).
49. Li, J., Ning, G. & Duncan, S. A. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 $\alpha$ . *Genes Dev.* **14**, 464–474 (2000).
50. Webster, N. J. G. Alternative RNA Splicing in the Pathogenesis of Liver Disease. *Frontiers in Endocrinology* **8**, 133 (2017).
51. Berasain, C. *et al.* Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: Mechanisms and consequences. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 3091–3102 (2010).
52. Bhate, A. *et al.* ESRP2 controls an adult splicing programme in hepatocytes to support

- postnatal liver maturation. *Nat. Commun.* **6**, 8768 (2015).
53. Cheng, Y. *et al.* Liver-Specific Deletion of SRSF2 Caused Acute Liver Failure and Early Death in Mice. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 1628–1638 (2016).
  54. Sen, S., Jumaa, H. & Webster, N. J. G. Splicing factor SRSF3 is crucial for hepatocyte differentiation and metabolic function. *Nat. Commun.* **4**, 1336 (2013).
  55. Elizalde, M. *et al.* Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 2909–2920 (2014).
  56. 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).
  57. Locker, J. Transcriptional Control of Hepatocyte Differentiation BT - Molecular Pathology of Liver Diseases. in (ed. Monga, S. P. S.) 193–211 (Springer US, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-7107-4\_14
  58. Michalopoulos, G. K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.* **3**, 485–513 (2013).
  59. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology* **213**, 286–300 (2007).
  60. Macdonald, R. A. “Lifespan” of Liver Cells: Autoradiographic Study Using Tritiated Thymidine in Normal, Cirrhotic, and Partially Hepatectomized Rats. *Arch. Intern. Med.* **107**, 335–343 (1961).
  61. Lefkowitz, J. H. The pathology of acute liver failure. *Advances in Anatomic Pathology* **23**, 144–158 (2016).
  62. Böhm, F., Köhler, U. A., Speicher, T. & Werner, S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine* **2**, 294–305 (2010).
  63. Preziosi, M. E. & Monga, S. P. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration. *Semin. Liver Dis.* **37**, 141–151 (2017).
  64. Van Haele, M., Snoeck, J. & Roskams, T. Human liver regeneration: An etiology dependent process. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2332 (2019).
  65. Michalopoulos, G. K. & Bhushan, B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **18**, 40–55 (2021).
  66. Fausto, N., Campbell, J. S. & Riehle, K. J. Liver regeneration. *Hepatology* **43**, S45–S53 (2006).
  67. Dubois, V., Staels, B., Lefebvre, P., Verzi, M. P. & Eeckhoutte, J. Control of Cell Identity by the Nuclear Receptor HNF4 in Organ Pathophysiology. *Cells* **9**, 1–22 (2020).
  68. Bolotin, E. *et al.* Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  target genes using protein binding microarrays. *Hepatology* **51**, 642–653 (2010).
  69. Wang, A. W. *et al.* The Dynamic Chromatin Architecture of the Regenerating Liver.



- CMGH* **9**, 121–143 (2020).
70. Arechederra, M., Berasain, C., Avila, M. A. & Fernández-Barrena, M. G. Chromatin dynamics during liver regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **97**, 38–46 (2020).
  71. Porukala, M. & Vinod, P. K. Systems-level analysis of transcriptome reorganization during liver regeneration. *Mol. Omi.* **18**, 315–327 (2022).
  72. Kitada, T. *et al.* In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J. Hepatol.* **35**, 613–618 (2001).
  73. Choi, J. & Ou, J. H. J. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G847–851 (2006).
  74. Grattagliano, I. *et al.* Mitochondria in Chronic Liver Disease. *Curr. Drug Targets* **12**, 879–893 (2011).
  75. Serviddio, G., Bellanti, F., Sastre, J., Vendemiale, G. & Altomare, E. Targeting Mitochondria: A New Promising Approach for the Treatment of Liver Diseases. *Curr. Med. Chem.* **17**, 2325–2337 (2010).
  76. Kobayashi, N. *et al.* Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* **31**, 851–857 (2000).
  77. Liu, L. *et al.* The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* **55**, 1529–1539 (2012).
  78. Van Haele, M. & Roskams, T. Hepatic Progenitor Cells: An Update. *Gastroenterology Clinics of North America* **46**, 409–420 (2017).
  79. Diehl, A. M. & Chute, J. Underlying potential: Cellular and molecular determinants of adult liver repair. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 1858–1860 (2013).
  80. Williams, M. J., Clouston, A. D. & Forbes, S. J. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology* **146**, 349–356 (2014).
  81. Lu, W. Y. *et al.* Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat. Cell Biol.* **17**, 973–983 (2015).
  82. Tsuchida, T. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **14**, 397–411 (2017).
  83. Lee, Y. A., Wallace, M. C. & Friedman, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story. *Gut* **64**, 830–841 (2015).
  84. Jalan, R. *et al.* New clinical and pathophysiological perspectives defining the trajectory of cirrhosis. *Journal of Hepatology* **75**, S14–S26 (2021).
  85. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 425–456 (2011).
  86. Zhang, D. Y. & Friedman, S. L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **56**, 769–775 (2012).

87. Engelmann, C., Clària, J., Szabo, G., Bosch, J. & Bernardi, M. Pathophysiology of decompensated cirrhosis: Portal hypertension, circulatory dysfunction, inflammation, metabolism and mitochondrial dysfunction. *Journal of Hepatology* **75**, S49–S66 (2021).
88. Lin, T., Feng, R., Liebe, R. & Weng, H. L. Liver Progenitor Cells in Massive Hepatic Necrosis-How Can a Patient Survive Acute Liver Failure? *Biomolecules* **12**, (2022).
89. Rutkowski, D. T. Liver function and dysfunction – a unique window into the physiological reach of ER stress and the unfolded protein response. *FEBS Journal* **286**, 356–378 (2019).
90. Han, H. *et al.* Danger signals in liver injury and restoration of homeostasis. *Journal of Hepatology* **73**, 933–951 (2020).
91. 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).
92. Torres, L. *et al.* Liver-specific methionine adenosyltransferase MAT1A gene expression is associated with a specific pattern of promoter methylation and histone acetylation: implications for MAT1A silencing during transformation. *FASEB J.* **14**, 95–102 (2000).
93. 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).
94. Dubois, V. *et al.* Endoplasmic reticulum stress actively suppresses hepatic molecular identity in damaged liver. *Mol. Syst. Biol.* **16**, 1–27 (2020).
95. Mirpuri, E. *et al.* Altered liver gene expression in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 242–252 (2002).
96. Nishikawa, T. *et al.* Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J. Clin. Invest.* **125**, 1533–1544 (2015).
97. Guzman-Lepe, J. *et al.* Liver-enriched transcription factor expression relates to chronic hepatic failure in humans. *Hepatol. Commun.* **2**, 582–594 (2018).
98. Argemi, J. *et al.* Defective HNF4 $\alpha$ -dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat. Commun.* **10**, 3126 (2019).
99. Loft, A. *et al.* Liver-fibrosis-activated transcriptional networks govern hepatocyte reprogramming and intra-hepatic communication. *Cell Metab.* **33**, 1685-1700.e9 (2021).
100. Guldiken, N. *et al.* Serum transferrin as a biomarker of hepatocyte nuclear factor 4 alpha activity and hepatocyte function in liver diseases. *BMC Med.* **19**, 39 (2021).
101. Bou Saleh, M. *et al.* Loss of hepatocyte identity following aberrant YAP activation: A key mechanism in alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* **75**, 912–923 (2021).
102. Sun, W. *et al.* Gankyrin-mediated dedifferentiation facilitates the tumorigenicity of rat hepatocytes and hepatoma cells. *Hepatology* **54**, 1259–1272 (2011).
103. Kurumiya, Y. *et al.* Differential suppression of liver-specific genes in regenerating rat liver induced by extended hepatectomy. *J. Hepatol.* **32**, 636–644 (2000).

104. Joo, M. S., Koo, J. H., Kim, T. H., Kim, Y. S. & Kim, S. G. LRH1-driven transcription factor circuitry for hepatocyte identity: Super-enhancer cistromic analysis. *EBioMedicine* **40**, 488–503 (2019).
105. Lazarevich, N. L. *et al.* Progression of HCC in Mice Is Associated with a Downregulation in the Expression of Hepatocyte Nuclear Factors. *Hepatology* **39**, 1038–1047 (2004).
106. Kalkuhl, A., Kaestner, K., Buchmann, A. & Schwarz, M. Expression of hepatocyte-enriched nuclear transcription factors in mouse liver tumours. *Carcinogenesis* **17**, 609–612 (1996).
107. Zeng, X. *et al.* Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice. *Hepatology* **54**, 2036–2047 (2011).
108. Rodríguez-Iñigo, E. *et al.* Expression of factor VII in the liver of patients with liver disease: Correlations with the disease severity and impairment in the hemostasis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **12**, 193–199 (2001).
109. Ginès, P., Cárdenas, A., Arroyo, V. & Rodés, J. Management of Cirrhosis and Ascites. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1646–1654 (2004).
110. Caldwell, S. H. *et al.* Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: Pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology* **44**, 1039–1046 (2006).
111. 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).
112. Hyun, J. *et al.* Dysregulated activation of fetal liver programme in acute liver failure. *Gut* **68**, 1076–1087 (2019).
113. 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).
114. Chen, X. *et al.* Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and non-cirrhotic conditions. *Cancer Sci.* **106**, 972–981 (2015).
115. Becker, D. *et al.* Genetic signatures shared in embryonic liver development and liver cancer define prognostically relevant subgroups in HCC. *Mol. Cancer* **11**, 55 (2012).
116. Liu, X. *et al.* Expression of glypican 3 enriches hepatocellular carcinoma development-related genes and associates with carcinogenesis in cirrhotic livers. *Carcinogenesis* **36**, 232–242 (2014).
117. Jing, H. *et al.* Gradually elevated expression of Gankyrin during human hepatocarcinogenesis and its clinicopathological significance. *Sci. Rep.* **4**, 5503 (2014).
118. Martínez-Chantar, M. L. *et al.* Methionine adenosyltransferase II  $\beta$  subunit gene expression provides a proliferative advantage in human hepatoma. *Gastroenterology* **124**, 940–948 (2003).

119. Filmus, J. & Capurro, M. Glypican-3: A marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS Journal* **280**, 2471–2476 (2013).
120. Tremosini, S. *et al.* Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut* **61**, 1481–1487 (2012).
121. Hughes, D. M. *et al.* Serum Levels of  $\alpha$ -Fetoprotein Increased More Than 10 Years Before Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 162–170.e4 (2021).
122. Marin, J. J. G. *et al.* Impact of alternative splicing variants on liver cancer biology. *Cancers* **14**, 18 (2022).
123. Zhang, L., Liu, X., Zhang, X. & Chen, R. Identification of important long non-coding RNAs and highly recurrent aberrant alternative splicing events in hepatocellular carcinoma through integrative analysis of multiple RNA-Seq datasets. *Mol. Genet. Genomics* **291**, 1035–1051 (2016).
124. Castillo, J. *et al.* Amphiregulin Induces the Alternative Splicing of p73 Into Its Oncogenic Isoform  $\Delta$ Ex2p73 in Human Hepatocellular Tumors. *Gastroenterology* **137**, 1805–1815.e4 (2009).
125. Sen, S., Langiewicz, M., Jumaa, H. & Webster, N. J. G. Deletion of serine/arginine-rich splicing factor 3 in hepatocytes predisposes to hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* **61**, 171–183 (2015).
126. D’Amico, G., Garcia-Tsao, G. & Pagliaro, L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology* **44**, 217–231 (2006).
127. Huck, I., Gunewardena, S., Espanol-Suner, R., Willenbring, H. & Apte, U. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Activation Is Essential for Termination of Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* **70**, 666–681 (2019).
128. Gonzalez, F. J. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ -mediated transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **23**, 2–7 (2008).
129. Hayhurst, G. P., Lee, Y.-H., Lambert, G., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  (Nuclear Receptor 2A1) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1393–1403 (2001).
130. Martinez-Jimenez, C. P., Kymizi, I., Cardot, P., Gonzalez, F. J. & Talianidis, I. Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  Coordinates a Transcription Factor Network Regulating Hepatic Fatty Acid Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 565–577 (2010).
131. Santangelo, L. *et al.* The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: A novel role for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Hepatology* **53**, 2063–2074 (2011).
132. Lambert, É. *et al.* Human hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$  encodes isoforms with distinct transcriptional functions. *Mol. Cell. Proteomics* **19**, 808–827 (2020).
133. Lau, H. H., Ng, N. H. J., Loo, L. S. W., Jasmen, J. B. & Teo, A. K. K. The molecular functions

- of hepatocyte nuclear factors – In and beyond the liver. *Journal of Hepatology* **68**, 1033–1048 (2018).
134. Babeu, J. P. & Boudreau, F. Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J. Gastroenterol.* **20**, 22–30 (2014).
  135. Torres-Padilla, M. E., Fougère-Deschatrette, C. & Weiss, M. C. Expression of HNF4 $\alpha$  isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech. Dev.* **109**, 183–193 (2001).
  136. Fatscher, T., Boehm, V. & Gehring, N. H. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4523–4544 (2015).
  137. Berasain, C., Fernández-Barrena, M. G. & Avila, M. A. New molecular interactions of c-Myc in cholangiocarcinoma may open new therapeutic opportunities. *Hepatology* **64**, 336–9 (2016).
  138. Briançon, N. & Weiss, M. C. In vivo role of the HNF4 $\alpha$  AF-1 activation domain revealed by exon swapping. *EMBO J.* **25**, 1253–1262 (2006).
  139. Lu, H. Crosstalk of HNF4 $\alpha$  with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **6**, 393–408 (2016).
  140. Yoon, J. C. *et al.* Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131–138 (2001).
  141. Wang, J. C., Stafford, J. M. & Granner, D. K. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **273**, 30847–30850 (1998).
  142. Torres-Padilla, M. E., Sladek, F. M. & Weiss, M. C. Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J. Biol. Chem.* **277**, 44677–44687 (2002).
  143. Tanaka, T. *et al.* Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  in the pathogenesis of human cancer. *J. Pathol.* **208**, 662–672 (2006).
  144. Sladek, F. M., Ruse, M. D., Nepomuceno, L., Huang, S.-M. & Stallcup, M. R. Modulation of Transcriptional Activation and Coactivator Interaction by a Splicing Variation in the F Domain of Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ 1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6509–6522 (1999).
  145. Thomas, A. M. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 alpha and farnesoid X receptor co-regulates gene transcription in mouse livers on a genome-wide scale. *Pharm. Res.* **30**, 2188–2198 (2013).
  146. Hatzis, P. & Talianidis, I. Regulatory Mechanisms Controlling Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7320–7330 (2001).
  147. Briançon, N. *et al.* Expression of the  $\alpha$ 7 isoform of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 is activated by HNF6/OC-2 and HNF1 and repressed by HNF4 $\alpha$ 1 in the liver. *J. Biol. Chem.* **279**, 33398–33408 (2004).

148. Yokoyama, A. *et al.* Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 749–753 (2011).
149. Barrero, M. J. & Malik, S. Two Functional Modes of a Nuclear Receptor-Recruited Arginine Methyltransferase in Transcriptional Activation. *Mol. Cell* **24**, 233–243 (2006).
150. Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D512–D520 (2015).
151. Soutoglou, E., Katrakili, N. & Talianidis, I. Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell* **5**, 745–751 (2000).
152. Zhou, W. *et al.* SUMOylation of HNF4 $\alpha$  regulates protein stability and hepatocyte function. *J. Cell Sci.* **125**, 3630–3635 (2012).
153. Sun, K. *et al.* Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1297–1311 (2007).
154. Viollet, B., Kahn, A. & Raymondjean, M. Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4208–4219 (1997).
155. Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. & Leff, T. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 $\alpha$  transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J. Biol. Chem.* **278**, 27495–27501 (2003).
156. Vetö, B. *et al.* The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2. *PLoS One* **12**, e0172020 (2017).
157. Chellappa, K. *et al.* Src tyrosine kinase phosphorylation of nuclear receptor HNF4 $\alpha$  correlates with isoform-specific loss of HNF4 $\alpha$  in human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2302–2307 (2012).
158. Guo, H., Gao, C., Mi, Z., Zhang, J. & Kuo, P. C. Characterization of the PC4 binding domain and its interactions with HNF4 $\alpha$ . *J. Biochem.* **141**, 635–640 (2007).
159. Xu, Z. *et al.* Activation of bile acid biosynthesis by the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK): Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  phosphorylation by the p38 MAPK is required for cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression. *J. Biol. Chem.* **282**, 24607–24614 (2007).
160. Mogilenko, D. A. *et al.* Role of the nuclear receptors HNF4 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and LXRs in the TNF $\alpha$ -mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry* **48**, 11950–11960 (2009).
161. Nishikawa, T. *et al.* A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease. *J. Hepatol.* **60**, 1203–1211 (2014).
162. Shih, D. Q. *et al.* Genotype/phenotype relationships in HNF-4 $\alpha$ /MODY1: Haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein(AII), apolipoprotein(CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes* **49**, 832–837 (2000).

163. Battle, M. A. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8419–8424 (2006).
164. Parviz, F. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* **34**, 292–296 (2003).
165. Desai, S. S. *et al.* Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology* **64**, 261–275 (2016).
166. Bonzo, J. A., Ferry, C. H., Matsubara, T., Kim, J. H. & Gonzalez, F. J. Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in adult mice. *J. Biol. Chem.* **287**, 7345–7356 (2012).
167. Späth, G. F. & Weiss, M. C. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J. Cell Biol.* **140**, 935–946 (1998).
168. Tian, J. M. & Schibler, U. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev.* **5**, 2225–2234 (1991).
169. Schrem, H., Klempnauer, J. & Borlak, J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: The hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacological Reviews* **54**, 129–158 (2002).
170. Kuo, C. J. *et al.* A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* **355**, 457–461 (1992).
171. Eeckhoutte, J., Formstecher, P. & Laine, B. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  enhances the hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ -mediated activation of transcription. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2586–2593 (2004).
172. Bolotin, E., Schnabl, J. M. & Sladek, F. M. HNF4A (Homo sapiens). Transcription Factor Encyclopedia. 2010. (2009). Available at: <http://www.cisreg.ca/tfe>.
173. Watt, A. J., Garrison, W. D. & Duncan, S. A. HNF4: A central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* **37**, 1249–1253 (2003).
174. Chiang, J. Y. L. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  regulation of bile acid and drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **5**, 137–147 (2009).
175. Mandard, S. *et al.* Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1145–1157 (2007).
176. Chen, W. S. *et al.* Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* **8**, 2466–2477 (1994).
177. Lu, H., Gonzalez, F. J. & Klaassen, C. Alterations in hepatic mRNA expression of phase II enzymes and xenobiotic transporters after targeted disruption of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Toxicol. Sci.* **118**, 380–390 (2010).

178. Wang, Z. & Burke, P. A. Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  interacts with other hepatocyte nuclear factors in regulating transthyretin gene expression. *FEBS J.* **277**, 4066–4075 (2010).
179. Maire, P., Wuarin, J. & Schibler, U. The role of cis-acting promoter elements in tissue-specific albumin gene expression. *Science (80-. ).* **244**, 343–346 (1989).
180. Marcil, V. *et al.* Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  knockdown in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 40448–40460 (2010).
181. Walesky, C. & Apte, U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) in cell proliferation and cancer. *Gene Expression* **16**, 101–108 (2015).
182. Wu, H. *et al.* A negative reciprocal regulatory axis between cyclin D1 and HNF4 $\alpha$  modulates cell cycle progression and metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 17177–17186 (2020).
183. Walesky, C. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 alpha deletion promotes diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rodents. *Hepatology* **57**, 2480–2490 (2013).
184. Yin, C. *et al.* Differentiation therapy of Hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene. *Hepatology* **48**, 1528–1539 (2008).
185. Gérard, C., Tys, J. & Lemaigre, F. P. Gene regulatory networks in differentiation and direct reprogramming of hepatic cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **66**, 43–50 (2017).
186. Huang, P. *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* **14**, 370–384 (2014).
187. Saif-Ali, R., Harun, R., Al-Jassabi, S. & Ngah, W. Z. W. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha P2 promoter variants associate with insulin resistance. *Acta Biochim. Pol.* **58**, 179–186 (2011).
188. Da Li *et al.* Hepatic TET3 contributes to type-2 diabetes by inducing the HNF4 $\alpha$  fetal isoform. *Nat. Commun.* **11**, 342 (2020).
189. Xu, J. *et al.* Carboxylesterase 1 Is Regulated by Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  and Protects Against Alcohol- and MCD diet-induced Liver Injury. *Sci. Rep.* **6**, 24277 (2016).
190. Xu, Y. *et al.* A metabolic stress-inducible miR-34a-HNF4 $\alpha$  pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. *Nat. Commun.* **6**, 7466 (2015).
191. Ning, B. F. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **70**, 7640–7651 (2010).
192. Feng, R. *et al.* A hierarchical regulatory network ensures stable albumin transcription under various pathophysiological conditions. *Hepatology* (2022). doi:10.1002/hep.32414
193. Cai, W. Y. *et al.* Yes-associated protein/TEA domain family member and hepatocyte



- nuclear factor 4-alpha (HNF4 $\alpha$ ) repress reciprocally to regulate hepatocarcinogenesis in rats and mice. *Hepatology* **65**, 1206–1221 (2017).
194. Lin, T. *et al.* Follistatin-controlled activin-HNF4 $\alpha$ -coagulation factor axis in liver progenitor cells determines outcome of acute liver failure. *Hepatology* **75**, 322–337 (2022).
  195. Lazarevich, N. L. *et al.* Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression. *Experimental Oncology* **32**, 167–171 (2010).
  196. Ishiyama, T. *et al.* Expression of HNFs and C/EBP $\alpha$  is correlated with immunocytochemical differentiation of cell lines derived from human hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas and immortalized hepatocytes. *Cancer Sci.* **94**, 757–763 (2003).
  197. Fekry, B. *et al.* HNF4a-deficient fatty liver provides a permissive environment for sex-independent hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **79**, 5860–5873 (2019).
  198. Niehof, M. & Borlak, J. EPS15R, TASP1, and PRPF3 Are Novel Disease Candidate Genes Targeted by HNF4 $\alpha$  Splice Variants in Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology* **134**, 1191–1202 (2008).
  199. Cai, S. H., Lu, S. X., Liu, L. L., Zhang, C. Z. & Yun, J. P. Increased expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha transcribed by promoter 2 indicates a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **10**, 761–771 (2017).
  200. Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I. & Ryffel, G. U. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 $\alpha$  predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res.* **26**, 497–504 (1998).
  201. Hatzis, P., Kymizi, I. & Talianidis, I. Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Disruption of Enhancer-Promoter Communication Inhibits Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  Expression. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7017–7029 (2006).
  202. Avila, M. A., Berasain, C., Sangro, B. & Prieto, J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **25**, 3866–3884 (2006).
  203. Maeda, Y. *et al.* Tumour suppressor p53 down-regulates the expression of the human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) gene. *Biochem. J.* **400**, 303–313 (2006).
  204. Florentino, R. M. *et al.* Cellular Location of HNF4 $\alpha$  is Linked With Terminal Liver Failure in Humans. *Hepatol. Commun.* **4**, 859–875 (2020).
  205. Yu, D. *et al.* High fat diet-induced oxidative stress blocks hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  and leads to hepatic steatosis in mice. *J. Cell. Physiol.* **233**, 4770–4782 (2018).
  206. Frank, D., Patterson, B. & Guthrie, C. 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).
  207. Frank, D. & Guthrie, C. An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* **6**, 2112–2124 (1992).
  208. Chua, K. & Reed, R. Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the

- spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Genes Dev.* **13**, 841–850 (1999).
209. Zhang, X. *et al.* Structures of the human spliceosomes before and after release of the ligated exon. *Cell Res.* **29**, 274–285 (2019).
210. Wilkinson, M. E., Fica, S. M., Galej, W. P. & Nagai, K. Structural basis for conformational equilibrium of the catalytic spliceosome. *Mol. Cell* **81**, 1439–1452.e9 (2021).
211. 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).
212. Recalde, M. *et al.* The splicing regulator SLU7 is required to preserve DNMT1 protein stability and DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **49**, 8592–8609 (2021).
213. Gárate-Rascón, M. *et al.* *SLU7 a new hub of gene expression regulation: from epigenetics to protein stability in health and disease.* *International Journal of Molecular Sciences* (2022).
214. Shomron, N., Reznik, M. & Ast, G. Splicing factor hSlu7 contains a unique functional domain required to retain the protein within the nucleus. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3782–3795 (2004).
215. Zhang, X. *et al.* An Atomic Structure of the Human Spliceosome. *Cell* **169**, 918–929.e14 (2017).
216. 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).
217. Janowicz, A., Michalak, M. & Krebs, J. Stress induced subcellular distribution of ALG-2, RBM22 and hSlu7. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1045–1049 (2011).
218. 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).
219. Kano, S. *et al.* Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **306**, C250–262 (2014).
220. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
221. Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297–308 (2012).
222. Berasain, C., Castillo, J., Perugorría, M. J., Prieto, J. & Avila, M. A. Amphiregulin: A new growth factor in hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* **254**, 30–41 (2007).
223. Häsler, R. *et al.* Alterations of pre-mRNA splicing in human inflammatory bowel disease. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 603–611 (2011).
224. Wang, J. *et al.* Hepatic Knockdown of Splicing Regulator Slu7 Ameliorates Inflammation and Attenuates Liver Injury in Ethanol-Fed Mice. *Am. J. Pathol.* **188**, 1807–1819 (2018).

225. Wong, C. C. L. *et al.* Switching of pyruvate kinase isoform L to M2 promotes metabolic reprogramming in hepatocarcinogenesis. *PLoS One* **9**, e115036 (2014).
226. Panasyuk, G. *et al.* PPAR $\gamma$  contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat. Commun.* **3**, 672 (2012).
227. Li, T. E. *et al.* PKM2 Drives Hepatocellular Carcinoma Progression by Inducing Immunosuppressive Microenvironment. *Front. Immunol.* **11**, 589997 (2020).
228. Hou, P. *et al.* Ectosomal PKM2 Promotes HCC by Inducing Macrophage Differentiation and Remodeling the Tumor Microenvironment. *Mol. Cell* **78**, 1192-1206.e10 (2020).
229. Zahra, K., Dey, T., Ashish, Mishra, S. P. & Pandey, U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology* **10**, 159 (2020).
230. Müller, M. *et al.* TAp73/ $\Delta$ Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* **12**, 1564–1577 (2005).
231. Xiong, L. *et al.* Aberrant enhancer hypomethylation contributes to hepatic carcinogenesis through global transcriptional reprogramming. *Nat. Commun.* **10**, 335 (2019).
232. Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. & Jaenisch, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **395**, 89–93 (1998).
233. Hernandez-Meza, G. *et al.* DNA Methylation Profiling of Human Hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **74**, 183–199 (2021).
234. Cheng, Z. *et al.* Conversion of hepatoma cells to hepatocyte-like cells by defined hepatocyte nuclear factors. *Cell Res.* **29**, 124–135 (2019).
235. Yue, H. Y. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  attenuates hepatic fibrosis in rats. *Gut* **59**, 236–246 (2010).
236. Huang, P. *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* **475**, 386–391 (2011).
237. Huang, K. W. *et al.* Liver Activation of Hepatocellular Nuclear Factor-4 $\alpha$  by Small Activating RNA Rescues Dyslipidemia and Improves Metabolic Profile. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **19**, 361–370 (2020).
238. Tafaleng, E. N. *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha 2 Messenger RNA Reprograms Liver-Enriched Transcription Factors and Functional Proteins in End-Stage Cirrhotic Human Hepatocytes. *Hepatol. Commun.* **5**, 1911–1926 (2021).
239. Yang, T. *et al.* Therapeutic HNF4A mRNA attenuates liver fibrosis in a preclinical model. *J. Hepatol.* **75**, 1420–1433 (2021).
240. Fan, T. T. *et al.* Regression effect of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  on liver cirrhosis in rats. *J. Dig. Dis.* **14**, 318–327 (2013).
241. Gardin, A., Remih, K., Gonzales, E., Andersson, E. R. & Strnad, P. Modern therapeutic approaches to liver-related disorders. *Journal of Hepatology* **76**, 1392–1409 (2022).

242. Hareendran, S. *et al.* Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: Immune challenges and strategies to circumvent them. *Reviews in Medical Virology* **23**, 399–413 (2013).
243. Sekiya, S. & Suzuki, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* **475**, 390–395 (2011).
244. Zhu, S. *et al.* Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* **508**, 93–97 (2014).
245. Yu, B. *et al.* Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* **13**, 328–340 (2013).
246. Reebye, V. *et al.* Novel RNA oligonucleotide improves liver function and inhibits liver carcinogenesis in vivo. *Hepatology* **59**, 216–227 (2014).
247. Hatziapostolou, M. *et al.* An HNF4 $\alpha$ -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell* **147**, 1233–1247 (2011).
248. Berraondo, P., Martini, P. G. V., Avila, M. A. & Fontanellas, A. Messenger RNA therapy for rare genetic metabolic diseases. *Gut* **68**, 1323–1330 (2019).
249. Jiang, L. *et al.* Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria. *Nat. Med.* **24**, 1899–1909 (2018).
250. 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).
251. Alvarez-Sola, G. *et al.* Engineered fibroblast growth factor 19 protects from acetaminophen-induced liver injury and stimulates aged liver regeneration in mice. *Cell Death Dis.* **8**, e3083 (2017).
252. Uzi, D. *et al.* CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Hepatol.* **59**, 495–503 (2013).
253. 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**, e67748 (2013).
254. Young, C. K. J. & Young, M. J. Comparison of HepaRG cells following growth in proliferative and differentiated culture conditions reveals distinct bioenergetic profiles. *Cell Cycle* **18**, 476–499 (2019).
255. Ciordia, S. *et al.* Digging deeper into bile proteome. *J. Proteomics* **230**, 103984 (2021).
256. Nunes, C. *et al.* MSGP: The first database of the protein components of the mammalian stress granules. *Database* **2019**, baz031 (2019).
257. Youn, J. Y. *et al.* Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes. *Molecular Cell* **76**, 286–294 (2019).
258. Wilson, I. D. *et al.* [APPLICATION NOTE] A quantitative UPLC-MS / MS Research Method for the Measurement of Acetaminophen and 5 Metabolites in Plasma [ APPLICATION NOTE Waters ]. (2017).

259. Torres, S. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Upregulation of STARD1 Promotes Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *Gastroenterology* **157**, 552–568 (2019).
260. Tsoiris, A. & Marlar, C. A. *Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. StatPearls* (2022).
261. Dean, S., Tang, J. I., Seckl, J. R. & Nyirenda, M. J. Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$  (HNF4- $\alpha$ ) isoforms in rodents. *Gene Expr.* **14**, 337–344 (2010).
262. Postic, C., Dentin, R. & Girard, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes and Metabolism* **30**, 398–408 (2004).
263. Irimia, J. M. *et al.* Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and steatosis in mice. *J. Biol. Chem.* **292**, 10455–10464 (2017).
264. Gusarov, I. *et al.* Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nat. Commun.* **8**, 15868–15912 (2017).
265. Williams, M. D. *et al.* Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J. Biol. Chem.* **273**, 28510–28515 (1998).
266. Ebi, H. *et al.* Counterbalance between RB inactivation and miR-17-92 overexpression in reactive oxygen species and DNA damage induction in lung cancers. *Oncogene* **28**, 3371–3379 (2009).
267. Ramachandran, A., Lebofsky, M., Weinman, S. A. & Jaeschke, H. The impact of partial manganese superoxide dismutase (SOD2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **251**, 226–233 (2011).
268. McGill, M. R., Williams, C. D., Xie, Y., Ramachandran, A. & Jaeschke, H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 387–394 (2012).
269. Bandoowala, M. & Sengupta, P. 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience* **130**, 1047–1062 (2020).
270. Mantena, S. K. *et al.* High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem. J.* **417**, 183–193 (2009).
271. Abdelmegeed, M. A. & Song, B.-J. Functional Roles of Protein Nitration in Acute and Chronic Liver Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 149627 (2014).
272. Wright, A. *et al.* In vivo trafficking and catabolism of IgG1 antibodies with Fc associated carbohydrates of differing structure. *Glycobiology* **10**, 1347–1355 (2000).
273. Fukumoto, T. & Brandon, M. R. Importance of the liver in immunoglobulin catabolism. *Res. Vet. Sci.* **32**, 62–69 (1982).
274. Mestecky, J. *et al.* The role of the liver in catabolism of mouse and human iga. *Immunol.*

- Invest.* **18**, 313–324 (1989).
275. Pomier-Layrargues, G., Huet, P. M., Richer, G., Marleau, D. & Viallet, A. Hyperglobulinemia in alcoholic cirrhosis. Relationship with portal hypertension and intrahepatic portal-systemic shunting as assessed by Kupffer cell uptake. *Dig. Dis. Sci.* **25**, 489–493 (1980).
276. Liu, W. T. *et al.* The injured liver induces hyperimmunoglobulinemia by failing to dispose of antigens and endotoxins in the portal system. *PLoS One* **10**, e0122739 (2015).
277. Feizi, T. Immunoglobulins in chronic liver disease. *Gut* **9**, 193–198 (1968).
278. Martínez-Esparza, M., Tristán-Manzano, M., Ruiz-Alcaraz, A. J. & García-Peñarrubia, P. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11522–11541 (2015).
279. Tanaka, S. *et al.* Significance of hyperglobulinemia in severe chronic liver diseases - with special reference to the correlation between serum globulin/IgG level and ICG clearance. *Hepatology* **54**, 2301–2305 (2007).
280. Weber, L. W. D., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology* **33**, 105–136 (2003).
281. Wong, F. W. Y., Chan, W. Y. & Lee, S. S. T. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**, 109–118 (1998).
282. Cederbaum, A. I., Yang, L., Wang, X. & Wu, D. CYP2E1 Sensitizes the Liver to LPS- and TNF  $\alpha$  -Induced Toxicity via Elevated Oxidative and Nitrosative Stress and Activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated Kinases. *Int. J. Hepatol.* **2012**, 582790 (2012).
283. Xu, J. *et al.* The role of human cytochrome P450 2E1 in liver inflammation and fibrosis. *Hepatol. Commun.* **1**, 1043–1057 (2017).
284. Knockaert, L. *et al.* Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Lab. Investig.* **92**, 396–410 (2012).
285. Leung, T. M. & Nieto, N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* **58**, 395–398 (2013).
286. Abdelmegeed, M. A., Ha, S.-K., Choi, Y., Akbar, M. & Song, B.-J. Role of CYP2E1 in Mitochondrial Dysfunction and Hepatic Injury by Alcohol and Non-Alcoholic Substances. *Curr. Mol. Pharmacol.* **10**, 207–225 (2017).
287. Jeong, T. Bin *et al.* Weaning mice and adult mice exhibit differential carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity. *Antioxidants* **9**, 201 (2020).
288. Tanaka, K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* **85**, 12–36 (2009).
289. Kedersha, N., Ivanov, P. & Anderson, P. Stress granules and cell signaling: More than just a passing phase? *Trends in Biochemical Sciences* **38**, 494–506 (2013).

290. Protter, D. S. W. & Parker, R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in Cell Biology* **26**, 668–679 (2016).
291. Takahashi, M. *et al.* Stress Granules Inhibit Apoptosis by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 815–829 (2013).
292. Markmiller, S. *et al.* Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* **172**, 590-604.e13 (2018).
293. Youn, J. Y. *et al.* High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Mol. Cell* **69**, 517-532.e11 (2018).
294. Frydryšková, K., Mašek, T. & Pospíšek, M. Changing faces of stress: Impact of heat and arsenite treatment on the composition of stress granules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **11**, e1596 (2020).
295. Yang, P. *et al.* G3BP1 Is a Tunable Switch that Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules. *Cell* **181**, 325-345.e28 (2020).
296. Cho, E. *et al.* G3BP1 depletion increases radiosensitisation by inducing oxidative stress in response to DNA damage. *Anticancer Res.* **39**, 6087–6095 (2019).
297. Daigo, K. *et al.* Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. *J. Biol. Chem.* **286**, 674–686 (2011).
298. Gerriets, V., Anderson, J. & Nappe, T. M. Acetaminophen. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
299. Lee, W. M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity—Isn't it time for APAP to go away? *Journal of Hepatology* **67**, 1324–1331 (2017).
300. McGill, M. R. & Jaeschke, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research* **30**, 2174–2187 (2013).
301. Du, K., Ramachandran, A. & Jaeschke, H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology* **10**, 148–156 (2016).
302. Cubero, F. J. *et al.* Combined Activities of JNK1 and JNK2 in Hepatocytes Protect Against Toxic Liver Injury. *Gastroenterology* **150**, 968–981 (2016).
303. Hinson, J. A., Mays, J. B. & Cameron, A. M. Acetaminophen-induced hepatic glycogen depletion and hyperglycemia in mice. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1979–1988 (1983).
304. Bánhegyi, G., Garzó, T., Antoni, F. & Mandl, J. Glycogenolysis - and not gluconeogenesis - is the source of UDP-glucuronic acid for glucuronidation. *BBA - Gen. Subj.* **967**, 429–435 (1988).
305. Price, V. F. & Jollow, D. J. Mechanism of decreased acetaminophen glucuronidation in the fasted rat. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 1067–1075 (1988).
306. Kamiyama, Y. *et al.* Role of human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use

- of small interfering RNA. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **22**, 287–298 (2007).
307. Lee, S. S. T., Buters, J. T. M., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P. & Gonzalez, F. J. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J. Biol. Chem.* **271**, 12063–12067 (1996).
308. Wolf, K. K. *et al.* Role of CYP3A and CYP2E1 in alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: Comparison of wild-type and *Cyp2e1(-/-)* mice. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1223–1231 (2007).
309. Cheung, C. *et al.* The CYP2E1-humanized transgenic mouse: Role of CYP2E1 in acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 449–457 (2005).
310. Bromer, M. Q. & Black, M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease* **7**, 351–367 (2003).
311. Lieber, C. S. Cytochrome P-450E1: Its physiological and pathological role. *Physiol. Rev.* **77**, 517–544 (1997).
312. Bao, Y. *et al.* Acetaminophen-induced liver injury alters expression and activities of cytochrome P450 enzymes in an age-dependent manner in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* **48**, 326–336 (2020).
313. Ishibe, T. *et al.* Reduced acetaminophen-induced liver injury in mice by genetic disruption of IL-1 receptor antagonist. *Lab. Investig.* **89**, 68–79 (2009).
314. Gill, P. *et al.* MicroRNA regulation of CYP 1A2, CYP3A4 and CYP2E1 expression in acetaminophen toxicity. *Sci. Rep.* **7**, 12331 (2017).
315. Feng, D. *et al.* Acute and Chronic Effects of IL-22 on Acetaminophen-Induced Liver Injury. *J. Immunol.* **193**, 2512–2518 (2014).
316. Lu, Y. *et al.* Immature mice are more susceptible than adult mice to acetaminophen-induced acute liver injury. *Sci. Rep.* **7**, 42736 (2017).
317. Chen, C., Krausz, K. W., Idle, J. R. & Gonzalez, F. J. Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and *Cyp2e1*-null mice. *J. Biol. Chem.* **283**, 4543–4559 (2008).
318. Abdelmegeed, M. A., Moon, K. H., Chen, C., Gonzalez, F. J. & Song, B. J. Role of cytochrome P450 2E1 in protein nitration and ubiquitin-mediated degradation during acetaminophen toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 57–66 (2010).
319. Yanaga, K. *et al.* Significance of liver size in hepatic surgery. *HPB Surg.* **10**, 195–200 (1997).
320. Moon, A. M., Singal, A. G. & Tapper, E. B. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **18**, 2650–2666 (2020).
321. Pimpin, L. *et al.* Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *Journal of Hepatology* **69**, 718–735 (2018).
322. Jepsen, P. & Younossi, Z. M. The global burden of cirrhosis: A review of disability-adjusted life-years lost and unmet needs. *Journal of Hepatology* **75**, S3–S13 (2021).



323. McGlynn, K. A., Petrick, J. L. & El-Serag, H. B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **73**, 4–13 (2021).
324. Hyun, J. *et al.* Epithelial splicing regulatory protein 2-mediated alternative splicing reprograms hepatocytes in severe alcoholic hepatitis. *J. Clin. Invest.* **130**, 2129–2145 (2020).
325. Woolbright, B. L. & Jaeschke, H. Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Journal of Hepatology* **66**, 836–848 (2017).
326. Koyama, Y. & Brenner, D. A. Liver inflammation and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 55–64 (2017).
327. Luo, P. *et al.* Ubiquitin-Specific Peptidase 10 (USP10) Inhibits Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Inflammation Through Sirt6. *Hepatology* **68**, 1786–1803 (2018).
328. Lu, C. *et al.* USP10 suppresses tumor progression by inhibiting mTOR activation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **436**, 139–148 (2018).
329. Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. & Samali, A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology* **2010**, 214074 (2010).
330. Abdelmegeed, M. A., Jang, S., Banerjee, A., Hardwick, J. P. & Song, B. J. Robust protein nitration contributes to acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury. *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 211–222 (2013).
331. Fujimoto, K. *et al.* Sensitivity of liver injury in heterozygous sod2 knockout mice treated with troglitazone or acetaminophen. *Toxicol. Pathol.* **37**, 193–200 (2009).
332. Chan, K. W. K. & Ho, W. S. Anti-oxidative and hepatoprotective effects of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **34**, 673–680 (2015).
333. Ye, H., Nelson, L. J., Gómez Del Moral, M., Martínez-Naves, E. & Cubero, F. J. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* **24**, 1373–1385 (2018).
334. Butura, A. *et al.* The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model. *J. Hepatol.* **50**, 572–583 (2009).
335. Kathirvel, E., Morgan, K., French, S. W. & Morgan, T. R. Overexpression of liver-specific cytochrome P4502E1 impairs hepatic insulin signaling in a transgenic mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 973–983 (2009).
336. Cederbaum, A. I. Role of CYP2E1 in ethanol-induced oxidant stress, fatty liver and hepatotoxicity. *Dig. Dis.* **28**, 802–811 (2010).
337. Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M. A. & Fromenty, B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and pathophysiological role. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **35**, 630–637 (2011).
338. Jin, M., Ande, A., Kumar, A. & Kumar, S. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: Role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell Death Dis.* **4**,

- e554 (2013).
339. Woodcroft, K. J. & Novak, R. F. Insulin effects on CYP2E1, 2B, 3A, and 4A expression in primary cultured rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **107**, 75–91 (1997).
340. Gonzalez, F. J. The 2006 Bernard B. Brodie award lecture CYP2E1. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 1–8 (2007).
341. Nakajima, M. & Yokoi, T. MicroRNA: Regulation of P450 and Pharmacogenetics. in *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* 385–401 (Academic Press, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386882-4.00019-0
342. Huck, I., Gunewardena, S., Espanol-Suner, R., Willenbring, H. & Apte, U. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Activation Is Essential for Termination of Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* **70**, 666–681 (2019).
343. Gárate-Rascón, M. *et al.* Splicing Factor SLU7 Prevents Oxidative Stress-Mediated Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  Degradation, Preserving Hepatic Differentiation and Protecting From Liver Damage. *Hepatology* **74**, 2791–2807 (2021).

## **ANEXOS 1-3**

---



**Anexo 1. Anticuerpos**

Anticuerpo	Referencia	Casa Comercial	Método	Dilución/ Cantidad
ACTINA	A2066	Sigma-Aldrich	WB (1º)	1:5000
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	A21207	Invitrogen	IF (2º)	1:1000
CYP2E1	Ab28146	Abcam	WB (1º)	1:1000
EnVision anti-mouse HRP	K4001	Dako	IHQ (2º)	100 µL
EnVision anti-rabbit HRP	K4002	Dako	IHQ (2º)	100 µL
GAPDH	2118	Cell Signaling	WB (1º)	1:5000
p-GSK3β	9336	Cell Signaling	WB (1º)	1:1000
G3BP1	Ab181150	Abcam	WB (1º)	1:1000
G3BP1	Ab181150	Abcam	IF (1º)	1:700
G3BP1	Ab181150	Abcam	Co-IP	5 µg
γH2AX	2577	Cell Signaling	WB (1º)	1:1000
HISTONA 3	Ab1012	Abcam	WB (1º)	1:1000
HK2	Sc-28889	Santa Cruz	WB (1º)	1:500
HNF4α	Sc-374229	Santa Cruz	Co-IP	5 µg
HNF4α Isoformas de P1	K9218-00	R&D Systems	WB (1º)	1:1000
HNF4α Isoformas de P2	H6939-00	R&D Systems	IHQ (1º)	1:400
IgG (H+L) Biotina, Rabbit anti-goat	31732	Thermo Fisher	IHQ (2º)	1:200
IgG HRP-linked goat anti-mouse	A0168	Sigma-Aldrich	WB (2º)	1:6000
IgG HRP-linked goat anti-rabbit	A0545	Sigma-Aldrich	WB (2º)	1:6000
m-IgGk BP-HRP	Sc-516102	Santa Cruz	WB (2º)	1:6000
IgG mouse	Sc-2025	Santa Cruz	Co-IP	5 µg
IgG rabbit	Sc-2027	Santa Cruz	Co-IP	5 µg
3'NITROTYROSINE	Sc-32757	Santa Cruz	WB (1º)	1:500
PKCα	Sc-8393	Santa Cruz	WB (1º)	1:500
PKCδ	Sc-937	Santa Cruz	WB (1º)	1:1000
PKM2	3198	Cell Signaling	WB (1º)	1:1000
p-SAPK/JNK (T183/Y185)	9251	Cell Signaling	WB (1º)	1:1000
α-SMA	A2547	Sigma-Aldrich	IHQ (1º)	1:1000
SLU7	NBP2-20403	Novus Biologicals	WB (1º)	1:1000
SLU7	612604	BD Bioscience	Co-IP	5 µg
SLU7	Sc-10829	Santa Cruz	IHQ (1º)	1:500
TP53	9282	Cell Signaling	WB (1º)	1:1000
USP10	Ab72486	Abcam	WB (1º)	1:1000

**Anexo 2. Secuencias de los cebadores utilizados**

Gen	Especie	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	Ta (°C)	Tl (°C)
<i>Albúmina</i>	Ratón	GAAGTGGGTAACCTTTCTCC	ACAGCAGTCAGCCAGTTCACC	60	80
<i>Colágeno<math>\alpha</math>1</i>	Ratón	CAGATTGAGAACATCCGCAG	TCGCTTCATACTCGAACTG	62	82
<i>CYP2E1</i>	Humano	AATGGACCTACCTGGAAGGAC	GACGTTGCAGGGCGCGCAGC	62	82
<i>Cyp2E1</i>	Ratón	CAGGAGTACAAGAACAAGGGG	CAGAAAGGTAGGGTCAAAGG	60	76
<i>Gys2</i>	Ratón	CAGGTGCATTTTGAAGATGGC	CTGCCATTCATGGAATTGGGC	64	80
<i>Hmox1</i>	Ratón	GAAGGAGGCCACCAAGGAGG	GCGTGGGCCACCAGCAGCTC	64	80
<i>Hnf1<math>\alpha</math></i>	Ratón	CTGATTGAAGAGCCCACAGG	GTTGTAGACACGCACCTCCGTGAC	60	82
<i>HNF4<math>\alpha</math>-P1</i>	Humano	GCGTGGAGGCAGGGAGAAT	GCCCTTGCAGCCGTCACAGC	66	84
<i>Hnf4<math>\alpha</math>-P1</i>	Ratón	GCGTGGGTAGGGGAGAATGC	CCGGTCGCCACAGATGGCGC	66	82
<i>HNF4<math>\alpha</math>-P2</i>	Humano	GGCCATGGTCAGCGTGAACG	GCCCTTGCAGCCGTCACAGC	66	84
<i>Hnf4<math>\alpha</math>-P2</i>	Ratón	ATGGTCAGTGTGAACGCGCCC	CCGGTCGCCACAGATGGCGC	66	82
<i>RPLP0</i>	Humano/ Ratón	AACATCTCCCCCTTCTCCTT	GAAGGCCTTGACCTTTTCAG	60	80
<i>SLU7</i>	Humano/ Ratón	GAAGAAGGAGCTAGAAGAACAG	CTTCCCATCATAGTCAAACATCAG	60	78
<i>Sod2</i>	Ratón	TTGAGAAGTTTAAGGAGAAGCTGAC	CTCCAGTTGATTACATTCC	60	82
<i><math>\alpha</math>-Sma</i>	Ratón	CCAGGGCTGTTTTCCCATCC	GTCATTTTCTCCGGTTGGCC	62	80
<i>Ttr</i>	Ratón	GCTGGACTGGTATTTGTGTCTG	CCACATCCGGAATTCATGG	62	80
<i>Ugt1<math>\alpha</math></i>	Ratón	TCTGAGCCCTGCATCTATCTG	CCCCAGAGGCGTTGACATA	55	78
<i>USP10</i>	Humano/ Ratón	AGCCCTGATGAATTCAATCA	GTGCTTGAAATACTGTAGCT	62	76

\* **Ta**: Temperatura de hibridación\* **Tl**: Temperatura de lectura

## Anexo 3. Interactoma de SLU7

Protein AC	Description / Name
1 sp O75165	DnaI homolog subfamily C member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJC13 PE=1 SV=5
2 sp Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UPF1 PE=1 SV=2
3 sp P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=1 SV=3
4 sp Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G1 PE=1 SV=4
5 sp Q9UDY2	Tight junction protein ZO-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP2 PE=1 SV=2
6 sp Q10570	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF1 PE=1 SV=2
7 sp Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4
8 sp Q7L2E3	ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX30 PE=1 SV=1
9 sp Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2
10 sp P26599	Polypprimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP1 PE=1 SV=1
11 sp P11940	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=2
12 sp Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX1 PE=1 SV=2
13 sp Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC4 PE=1 SV=1
14 sp P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPL PE=1 SV=2
15 sp Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3A PE=1 SV=1
16 sp Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP2 PE=1 SV=2
17 sp O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP3 PE=1 SV=2
18 sp Q9HCE1	Putative helicase MOV-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MOV10 PE=1 SV=2
19 sp P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1
20 sp Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3
21 sp P43243	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=2
22 sp Q96PUB	Protein quaking OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QKI PE=1 SV=1
23 sp Q07157	Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP1 PE=1 SV=3
24 sp Q8WWM7	Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATXN2L PE=1 SV=2
25 sp P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1
26 sp P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFQ PE=1 SV=2
27 sp Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2
28 sp Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G3BP1 PE=1 SV=1
29 sp O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNCRIP PE=1 SV=2
30 sp O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRNP200 PE=1 SV=2
31 sp P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FXR1 PE=1 SV=3
32 sp O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=3
33 sp Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC3 PE=1 SV=2
34 sp Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPUL1 PE=1 SV=2
35 sp P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YBX1 PE=1 SV=3
36 sp Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4
37 sp P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
38 sp Q96PK6	RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM14 PE=1 SV=2
39 sp Q8IX12	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2
40 sp Q14444	Caprin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPRIN1 PE=1 SV=2
41 sp Q58FF7	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB3P PE=5 SV=1
42 sp Q9P2I0	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF2 PE=1 SV=2
43 sp P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=3
44 sp Q96HS1	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM5 PE=1 SV=2
45 sp Q15637	Splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF1 PE=1 SV=4
46 sp Q07666	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1
47 sp P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2
48 sp Q6PKG0	La-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LARP1 PE=1 SV=2
49 sp Q7Z417	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUFIP2 PE=1 SV=1
50 sp Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G3BP2 PE=1 SV=2
51 sp P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CB PE=1 SV=3
52 sp O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPR PE=1 SV=1
53 sp Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=5
54 sp Q9Y262	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3L PE=1 SV=1
55 sp P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3E PE=1 SV=1
56 sp Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTCB PE=1 SV=1
57 sp Q9H0D6	5'-3' exoribonuclease 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRN2 PE=1 SV=1
58 sp P49750	YLP motif-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YLPM1 PE=1 SV=4
59 sp P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5
60 sp Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=5
61 sp P63244	Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=3
62 sp Q13137	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALCOCO2 PE=1 SV=1
63 sp Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM120A PE=1 SV=2
64 sp Q14694	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP10 PE=1 SV=2
65 sp Q8IY67	Ribonucleoprotein PTB-binding 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAVER1 PE=1 SV=1
66 sp P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMPO PE=1 SV=2
67 sp Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THRAP3 PE=1 SV=2
68 sp P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4
69 sp P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1

---

70	sp Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=2
71	sp O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3F PE=1 SV=1
72	sp P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CC PE=1SV=1
73	sp O75533	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3
74	sp Q9YU24	RNA transcription, translation and transport factor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTRAF PE=1 SV=1
75	sp Q9UKF6	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF3 PE=1 SV=1
76	sp Q14240	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A2 PE=1 SV=2
77	sp Q8WVV9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPLL PE=1 SV=1
78	sp Q9C0J8	pre-mRNA 3' end processing protein WDR33 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR33 PE=1 SV=2
79	sp P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=3
80	sp Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF2 PE=1 SV=2
81	sp A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POTEF PE=1 SV=2
82	sp B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3CL PE=3 SV=1
83	sp Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FNDC3B PE=1 SV=2
84	sp Q8N684	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF7 PE=1 SV=1
85	sp P32969	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL9 PE=1 SV=1
86	sp P51116	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FXR2 PE=1 SV=2
87	sp P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX6 PE=1 SV=2
88	sp Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF19 PE=1 SV=1
89	sp P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4
90	sp O75534	Cold shock domain-containing protein E1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSDE1 PE=1 SV=2
91	sp Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6
92	sp P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=2
93	sp Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP4 PE=1 SV=2
94	sp P62277	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS13 PE=1 SV=2
95	sp Q9NV17	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2
96	sp Q15393	Splicing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B3 PE=1 SV=4
97	sp P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF2 PE=1 SV=4
98	sp Q16630	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF6 PE=1 SV=2
99	sp Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF8 PE=1 SV=2
100	sp P0DN76	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF1L5 PE=1 SV=1
101	sp Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1
102	sp Q43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX15 PE=1 SV=2
103	sp P11169	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC2A3 PE=1 SV=1
104	sp Q7Z2W4	Zinc finger CCHC-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZC3HAV1 PE=1 SV=3
105	sp Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
106	sp Q96519	Spermatid perinuclear RNA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRBP PE=1 SV=1
107	sp P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1
108	sp Q01844	RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EWSR1 PE=1 SV=1
109	sp Q06787	Synaptic functional regulator FMR1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FMR1 PE=1 SV=1
110	sp Q9NQ94	APOBEC1 complementation factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A1CF PE=1 SV=1
111	sp Q15371	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3D PE=1 SV=1
112	sp Q43432	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G3 PE=1 SV=2
113	sp Q96124	Far upstream element-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUBP3 PE=1 SV=2
114	sp Q95782	AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2A1 PE=1 SV=3
115	sp Q75821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3G PE=1 SV=2
116	sp P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2
117	sp P51398	28S ribosomal protein S29, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DAP3 PE=1 SV=1
118	sp P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3B PE=1 SV=3
119	sp Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1
120	sp Q92945	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHSRP PE=1 SV=4
121	sp Q00341	Vigilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=2
122	sp P62081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1
123	sp P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4
124	sp P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1C PE=1 SV=1
125	sp Q43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUDT21 PE=1 SV=1
126	sp Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3M PE=1 SV=1
127	sp P62829	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1
128	sp Q15717	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAVL1 PE=1 SV=2
129	sp P35637	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUS PE=1 SV=1
130	sp P62491	Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB11A PE=1 SV=3
131	sp Q9Y6C9	Mitochondrial carrier homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTCH2 PE=1 SV=1
132	sp Q8NCA5	Protein FAM98A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM98A PE=1 SV=1
133	sp Q6UN15	Pre-mRNA 3' end-processing factor FIP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FIP1L1 PE=1 SV=1
134	sp Q14498	RNA-binding protein 39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM39 PE=1 SV=2
135	sp P10412	Histone H1.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H1E PE=1 SV=2
136	sp Q2Q1W2	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM71 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM71 PE=1 SV=1
137	sp P57721	Poly(rC)-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP3 PE=2 SV=2
138	sp P22090	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4Y1 PE=1 SV=2
139	sp P09012	U1 small nuclear ribonucleoprotein A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPA PE=1 SV=3
140	sp Q15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3H PE=1 SV=1
141	sp Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX50 PE=1 SV=1
142	sp Q12996	Cleavage stimulation factor subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSTF3 PE=1 SV=1
143	sp Q96E39	RNA binding motif protein, X-linked-like-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMXL1 PE=1 SV=1
144	sp Q14157	Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBAP2L PE=1 SV=2
145	sp Q9BWF3	RNA-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM4 PE=1 SV=1

---







## **ANEXO 4: Publicación en Hepatology**

---



# Splicing Factor SLU7 Prevents Oxidative Stress-Mediated Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ Degradation, Preserving Hepatic Differentiation and Protecting From Liver Damage

María Gárate-Rascón,<sup>1</sup> Miriam Recalde,<sup>1</sup> Maddalen Jimenez,<sup>1</sup> María Elizalde,<sup>1</sup> María Azkona,<sup>1</sup> Iker Uriarte,<sup>1,2</sup> M. Uxue Latasa,<sup>1</sup> Raquel Urtasun,<sup>1#</sup> Idoia Bilbao,<sup>3</sup> Bruno Sangro,<sup>2-4</sup> Carmen Garcia-Ruiz,<sup>2,5,6</sup> José C. Fernandez-Checa,<sup>2,5,6</sup> Fernando J Corrales,<sup>2,7</sup> Argitxu Esquivel,<sup>8</sup> Antonio Pineda-Lucena,<sup>8</sup> Maite G. Fernández-Barrena ,<sup>1,2,4</sup> Matías A. Ávila ,<sup>1,2,4\*</sup> María Arechederra ,<sup>1,4\*</sup> and Carmen Berasain ,<sup>1,2,4\*</sup>

**BACKGROUND AND AIMS:** Hepatocellular dedifferentiation is emerging as an important determinant in liver disease progression. Preservation of mature hepatocyte identity relies on a set of key genes, predominantly the transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) but also splicing factors like SLU7. How these factors interact and become dysregulated and the impact of their impairment in driving liver disease are not fully understood.

**APPROACH AND RESULTS:** Expression of *SLU7* and that of the adult and oncofetal isoforms of *HNF4 $\alpha$* , driven by its promoter 1 (P1) and P2, respectively, was studied in diseased human and mouse livers. Hepatic function and damage response were analyzed in wild-type and *Slu7*-haploinsufficient/heterozygous (*Slu7*<sup>+/−</sup>) mice undergoing chronic (CCl<sub>4</sub>) and acute (acetaminophen) injury. *SLU7* expression was restored in CCl<sub>4</sub>-injured mice using *SLU7*-expressing adeno-associated viruses (AAV-*SLU7*). The hepatocellular *SLU7* interactome was characterized by mass spectrometry. Reduced *SLU7* expression in human and mouse diseased livers correlated with a switch in *HNF4 $\alpha$*  P1 to P2 usage. This response was reproduced in *Slu7*<sup>+/−</sup> mice, which displayed increased sensitivity to chronic and acute liver injury, enhanced oxidative stress,

and marked impairment of hepatic functions. AAV-*SLU7* infection prevented liver injury and hepatocellular dedifferentiation. Mechanistically we demonstrate a unique role for *SLU7* in the preservation of HNF4 $\alpha$ 1 protein stability through its capacity to protect the liver against oxidative stress. *SLU7* is herein identified as a key component of the stress granule proteome, an essential part of the cell's antioxidant machinery.

**CONCLUSIONS:** Our results place *SLU7* at the highest level of hepatocellular identity control, identifying *SLU7* as a link between stress-protective mechanisms and liver differentiation. These findings emphasize the importance of the preservation of hepatic functions in the protection from liver injury. (HEPATOLOGY 2021;74:2791-2807).

The global burden of chronic liver diseases is rising worldwide mainly due to changing trends in alcohol abuse, excessive caloric intake, and the sedentary lifestyle.<sup>(1)</sup> Importantly, regardless of the etiology, chronic liver damage progression is associated with the loss of hepatic functions, a strong determinant in patients' prognosis.<sup>(2)</sup> Accumulating evidence

*Abbreviations:* AAV, adeno-associated virus; ALT, alanine aminotransferase; APAP, acetaminophen; CYP2E1, cytochrome P450 2E1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3BP1, Ras GTPase-activating protein-binding protein 1; Gys2, glycogen synthase 2; H&E, hematoxylin-eosin; HK2, hexokinase 2; HNF4 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; MS, mass spectrometry; MMSGP, Mammalian Stress Granules Proteome; NAC, N-acetylcysteine; P1/P2, promoters 1 and 2; P-JNK, phospho-c-Jun N-terminal kinase; PKC, protein kinase C; PKM2, pyruvate kinase M2; RT-PCR, real-time PCR; SG, stress granule; si-, small interfering; *SLU7*, splicing factor *SLU7*;  $\alpha$ -SMA, alpha-smooth muscle actin; Sod2, manganese-superoxide dismutase 2; TP53, tumor suppressor protein P53; UDP, uridine diphosphate; USP10, Ubiquitin-specific protease 10.

Received April 14, 2021; accepted June 9, 2021.

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.32029/supinfo](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.32029/supinfo).

\*These authors share senior authorship.

demonstrates that progressive hepatic dysfunction is due not only to the death and loss of hepatocytic parenchyma. Dedifferentiation of the remaining hepatocytes associated with transcriptional reprogramming including reduced expression of hepatospecific genes and reactivation of fetal isoforms is emerging as a central pathogenic component.<sup>(3-7)</sup> Nevertheless, most of the molecular mechanisms implicated in this process of dedifferentiation remain unknown.

Hepatocellular identity depends on the correct expression and activity of key genes belonging to different functional networks. These comprise transcription factors, such as the master regulator hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 $\alpha$ ), HNF1 $\alpha$ , HNF6, CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  and  $\beta$ , and forkhead box A,<sup>(8)</sup> as well as a growing complement of splicing factors including serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3),<sup>(9)</sup> the spliceosome component splicing factor SLU7,<sup>(10)</sup> and epithelial splicing regulatory protein-2.<sup>(11)</sup> Disruption of these transcription and splicing factor networks is increasingly recognized to occur in liver injury. Decreased or mislocalized

expression of HNF4 $\alpha$  is observed in the liver of patients with cirrhosis, a preneoplastic condition, and in animal models of liver damage.<sup>(4,5,7,12)</sup> Moreover, an *HNF4 $\alpha$*  promoter 1 (P1) to P2 promoter switch has been described in human HCC.<sup>(13)</sup> Importantly, P2-derived isoforms, expressed in the fetal liver, lack an N-terminal transactivation domain present in P1-derived isoforms characteristic of the adult well-differentiated liver and differentially regulate gene expression.<sup>(7)</sup> Although the precise mechanisms implicated in HNF4 $\alpha$  disruption remain unknown, reintroduction of the P1-derived HNF4 $\alpha$ 1 isoform limits adult-to-fetal reprogramming in models of cirrhosis and HCC, restoring liver differentiation and function.<sup>(5,14)</sup>

Regarding the splicing factors network, we demonstrated that down-regulation of hepatic SLU7 expression in mice results in rewiring of the mature hepatic transcriptional program to a fetal one, including the *HNF4 $\alpha$*  P1 to P2 switch.<sup>(10)</sup> Remarkably, reduced SLU7 expression leads to the loss of liver metabolic and synthetic functions, disruption of hepatocellular

*Supported by MINECO/AEI/FEDER (UE SAF2016-75972-R, PID2019-104265RB-I00/AEI/10.13039/501100011033, and PID2019-104878RB-I00/AEI/10.13039/501100011033), CIBERehd, Fundación La Caixa (HEPACARE), an AECC postdoctoral fellowship (POSTD18014AREC, to M.A.), a Ministerio de Educación FPU fellowship (FPU18/01461, to M.G.R.), a Ministerio de Educación FPI fellowship (BES-2017-079883, to M.R.); a Ramón y Cajal Program contract (RYC2018-024475-I, to M.G.F.B.), the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, the Fundación Mario Losantos, the Fundación M. Torres, and a generous donation from Mr. Eduardo Avila.*

*\*Biochemistry Area, Department of Health Science, Public University of Navarre, Pamplona, Spain.*

© 2021 The Authors. HEPATOLOGY published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Association for the Study of Liver Diseases. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.32029

Potential conflict of interest: Nothing to report.

## ARTICLE INFORMATION:

From the <sup>1</sup>Hepatology Program, CIMA, University of Navarre, Pamplona, Spain; <sup>2</sup>CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Hepatology Unit, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Sanitarias de Navarra IdiSNA, Pamplona, Spain; <sup>5</sup>Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS and CIBEREHD, Barcelona, Spain; <sup>7</sup>Functional Proteomics Laboratory, National Center for Biotechnology, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Molecular Therapeutics Program, CIMA, University of Navarre, Pamplona, Spain.

## ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Carmen Berasain, Ph.D.  
Program of Hepatology, CIMA-University of Navarre  
Avda. Pio XII, n55  
31008 Pamplona, Spain  
E-mail: [cberasain@unav.es](mailto:cberasain@unav.es)  
Tel.: +34-948-194700  
or

María Arechederra, Ph.D.  
Program of Hepatology, CIMA-University of Navarre  
Avda. Pio XII, n55.  
31008 Pamplona, Spain  
E-mail: [macalderon@unav.es](mailto:macalderon@unav.es)  
Tel.: +34-948-194700

quiescence, and induction of genome instability.<sup>(10,15)</sup> Moreover, we observed that *SLU7* mRNA levels are decreased in the liver of patients with cirrhosis and in HCC tissues.<sup>(16)</sup> Altogether, these findings suggest that *SLU7* down-regulation in human liver injury can participate in hepatocellular dedifferentiation and the loss of hepatic functions observed along the process of hepatocarcinogenesis.<sup>(4,8)</sup>

Here we confirm that *SLU7* protein is down-regulated in the human cirrhotic liver and in mouse models of acute and chronic liver damage. Moreover, we demonstrate that *SLU7* down-regulation during liver injury certainly mediates the loss of hepatic functions and contributes to damage progression. Mechanistically we uncover a hierarchical relationship between key determinants of hepatocellular identity, unraveling an unexpected mechanism of *HNF4α1* regulation by *SLU7*. We show that *HNF4α1* protein stability and consequently its functions directly depend on the capacity of *SLU7* to protect the liver against oxidative stress. Altogether our results place *SLU7* at the highest level of hepatocellular identity control, identifying *SLU7* as a link between stress-protective mechanisms and liver differentiation. Moreover, our findings emphasize the importance of the preservation of hepatic functions in the protection against acute and chronic injury, uncovering targets for intervention.

## Material and Methods

### ANIMAL EXPERIMENTS

Animal care and experimental protocols were approved (CEEA 062-16) and performed according to the guidelines of the Ethics Committee for Animal Testing of the University of Navarra. Animal models were developed as described in the Supporting Information.

### HUMAN SAMPLES

The use of human samples was approved by the Human Research Review Committee of the University of Navarra (CEI 47/2015). Patients' samples were provided by the Biobank of the University of Navarra and processed following standard operating procedures approved by the ethical and scientific committees. Liver tissue samples from patients with cirrhosis, patients with acute liver failure, and HCC

tissues were from individuals undergoing partial hepatectomy or liver transplantation. Healthy liver tissues were obtained from individuals with normal or minimal changes in the liver or healthy living liver donors. Informed consent was obtained from each patient, and the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

### STATISTICAL ANALYSIS

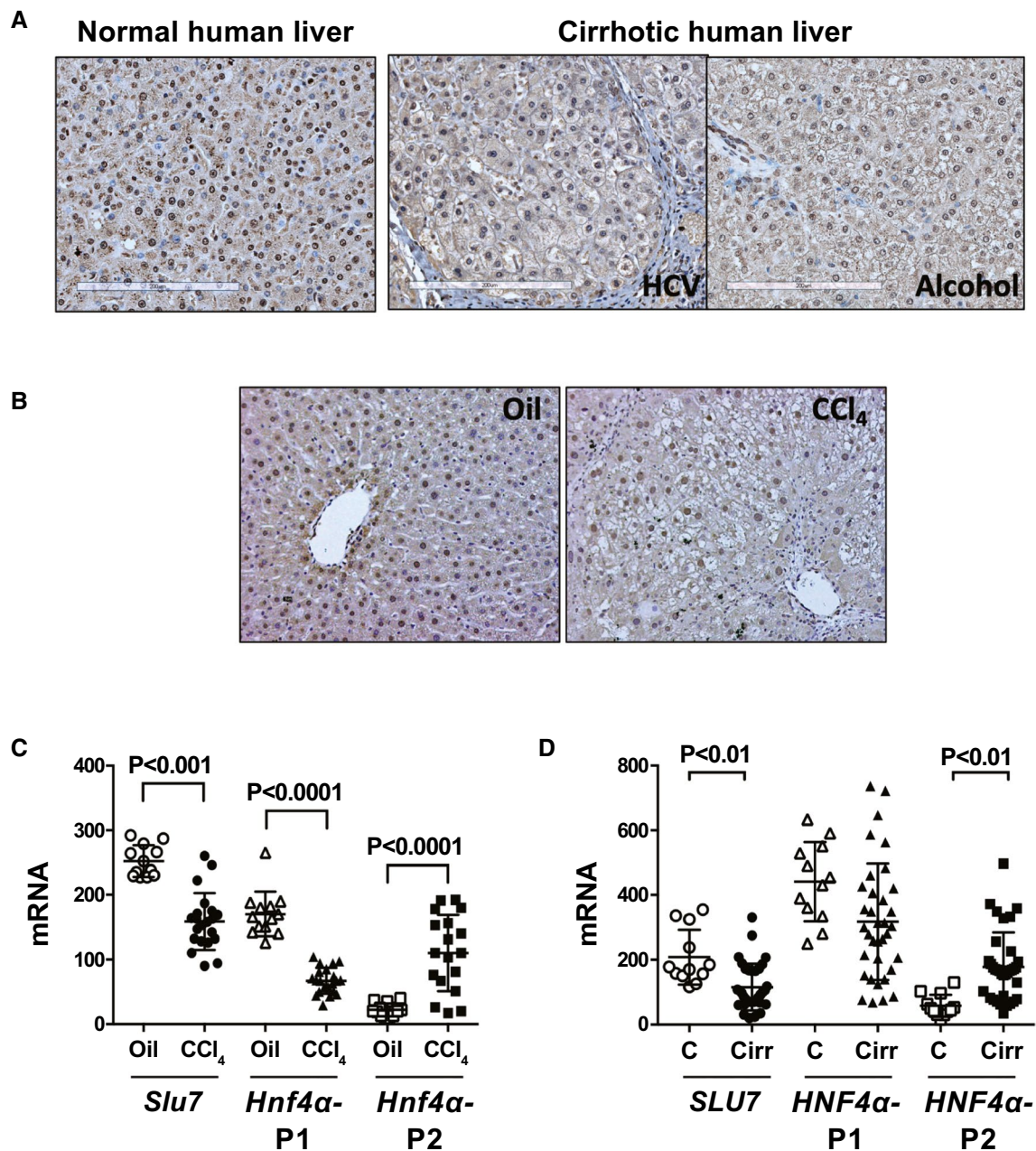
Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Data are presented as mean ± SEM. Normally distributed data were compared among groups using a two-tailed Student test. Nonnormally distributed data were analyzed using the Mann-Whitney test. Statistical significance was considered as follows: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Additional methods are provided as Supporting Information.

## Results

### EXPRESSION OF *SLU7* IS REDUCED IN THE CHRONICALLY DAMAGED LIVER IN PARALLEL WITH A SWITCH IN *HNF4α* P1/P2 USAGE

Immunohistochemical analysis of *SLU7* in liver tissue samples from controls and patients with cirrhosis confirmed its reduced hepatocellular levels in the diseased organs (Fig. 1A). Reduced *SLU7* immunostaining was also found in hepatocytes of mice with  $\text{CCl}_4$ -induced chronic liver injury (Fig. 1B). In these mice *SLU7* down-regulation was paralleled by a switch in *Hnf4α* promoter usage, with a significant down-regulation of *Hnf4α* P1 activity and a robust activation of *Hnf4α* P2, characteristic of fetal and transformed liver cells<sup>(17)</sup> (Fig. 1C). As we recently reported in alcohol-associated hepatitis,<sup>(18)</sup> we observed a significant activation of *HNF4α* P2 in the liver of patients with cirrhosis (Fig. 1D). A concomitant reduction in *HNF4α* P1-driven transcription was also observed, particularly in patients with more advanced disease (Child-Pugh B-C cirrhosis) (Fig. 1D; Supporting Fig. S1A). Importantly, *SLU7* down-regulation was significantly associated with the Child-Pugh index (Supporting Fig. S1B).

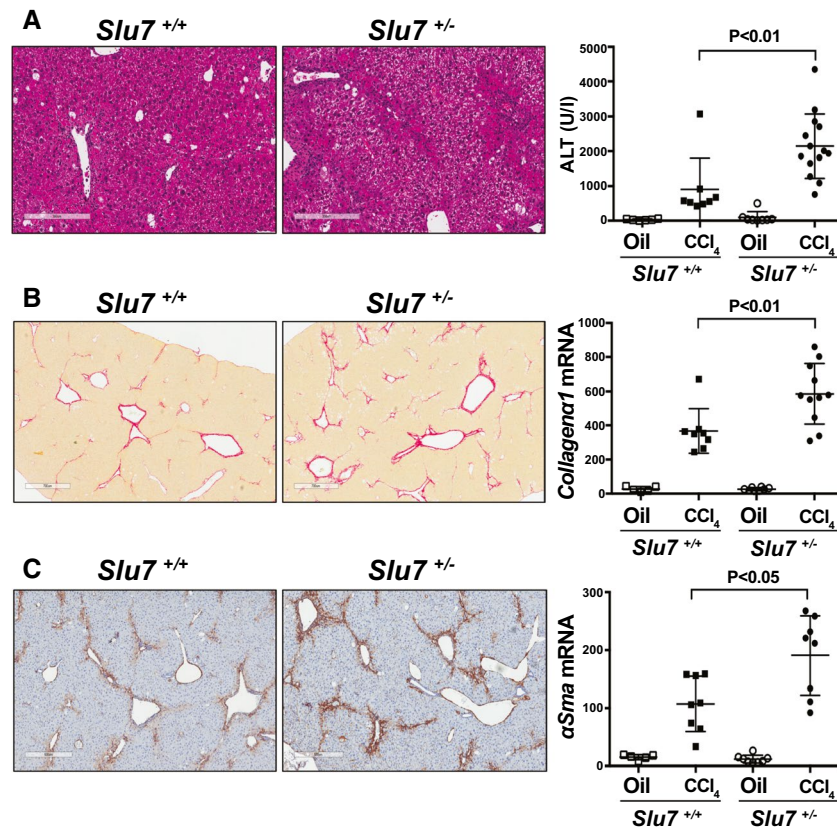


**FIG. 1.** Reduction of SLU7 expression in chronically injured liver in parallel to a switch in *HNF4α* promoter usage. (A) Representative SLU7 immunostainings in livers from healthy controls and patients with cirrhosis. (B) Representative SLU7 immunostainings in livers from chronically CCl<sub>4</sub>-treated mice and controls (oil). (C) Real-time PCR (RT-PCR) analysis of *Slu7* and *Hnf4α* P1 and P2 mRNAs in livers from mice treated as in (B). (D) RT-PCR analysis of *SLU7* and *HNF4α* P1 and P2 mRNAs in livers from controls and patients with cirrhosis. Data are means ± SEM. Abbreviations: C, control; Cirr, cirrhosis.

## SLU7 HAPLOINSUFFICIENCY EXACERBATES CCl<sub>4</sub>-INDUCED CHRONIC LIVER DAMAGE

Next, we tested if SLU7 down-regulation could participate in liver damage development. To this end we

employed *Slu7*-haploinsufficient/heterozygous mice (C57BL/6NTac-Slu7<sup>tm1a(KOMP)Wtsi/Wtsi</sup>, *Slu7*<sup>+/-</sup> mice) (Supporting Fig. S2A,B). To induce chronic liver damage, *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice received CCl<sub>4</sub> for 6 weeks. *Slu7* mRNA levels were significantly reduced in both genotypes upon CCl<sub>4</sub> treatment (Supporting



**FIG. 2.** SLU7-haploinsufficient mice are more sensitive to CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver damage. *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice were treated as in Fig. 1B. (A) Hematoxylin–eosin (H&E) stainings and significant induction of serum aminotransferases (alanine aminotransferase [ALT]) in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. (B) Sirius red staining showing bridging fibrosis in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice and RT-PCR analysis of *collagen  $\alpha$ 1* mRNA expression. (C)  $\alpha$ SMA immunohistochemistry and mRNA expression showing enhanced activation of HSCs in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. Data are means  $\pm$  SEM. Abbreviation: ALT, alanine aminotransferase.

Fig. S2C). Importantly, *Slu7*<sup>+/-</sup> mice showed exacerbated liver injury (Fig. 2A). Moreover, while *Slu7*<sup>+/+</sup> mice showed sparse fibrosis, bridging fibrosis was appreciated in *Slu7*<sup>+/-</sup> animals, consistent with increased collagen  $\alpha$ 1 expression and activated ( $\alpha$ -smooth muscle actin [ $\alpha$ SMA]-positive) HSCs (Fig. 2B,C). Altogether these results indicate that reduced SLU7 expression sensitizes the liver to chronic damage.

### SLU7 HAPLOINSUFFICIENCY EXACERBATES LIVER DAMAGE—ASSOCIATED SWITCH IN *HNF4 $\alpha$* PROMOTER USAGE, FOSTERING HEPATIC DEDIFFERENTIATION AND LIVER DYSFUNCTION

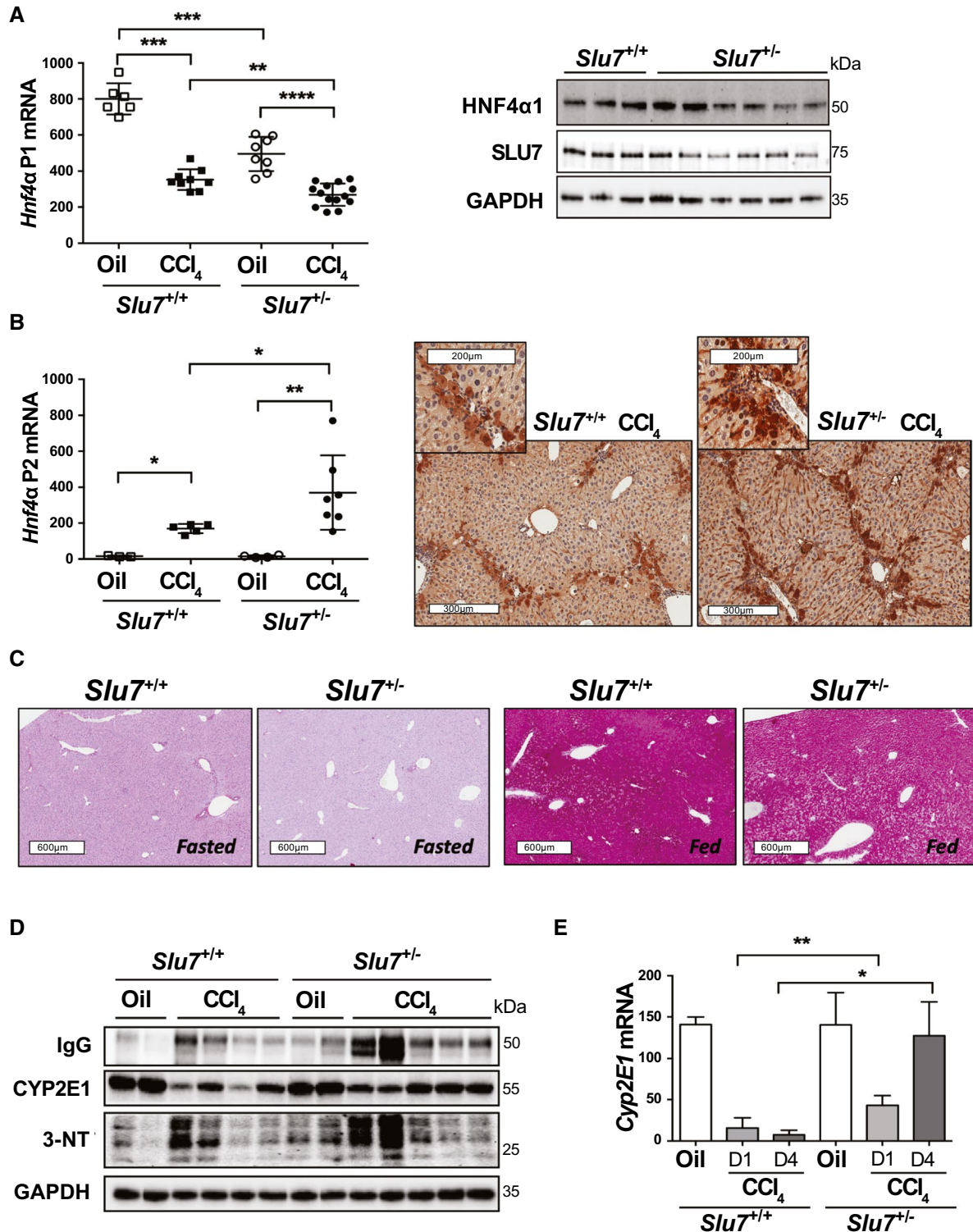
We hypothesized that the reduced SLU7 expression in chronic liver injury may be associated with the

loss of hepatic functions characteristic of this condition. Interestingly, we found that the *Hnf4 $\alpha$*  P1/P2 promoter switch occurring in CCl<sub>4</sub>-treated mice (Fig. 1C) was significantly exacerbated in *Slu7*<sup>+/-</sup> animals (Fig. 3A,B). In fact, *Hnf4 $\alpha$*  P1 mRNA expression and HNF4 $\alpha$ 1 protein isoform expression were reduced in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 3A), while *Hnf4 $\alpha$*  P2 mRNA and protein isoforms were induced (Fig. 3B).

The expression of HNF4 $\alpha$ 1 targets, including the transcription factor *Hnf1 $\alpha$* , the plasma proteins albumin (*Alb*) and transthyretin (*Ttr*), the enzyme glycogen-synthase 2 (*Gys2*), and the antioxidant enzyme manganese-superoxide dismutase 2 (*Sod2*), was markedly reduced upon CCl<sub>4</sub> treatment (Supporting Fig. S3A). Remarkably, these genes were already down-regulated in the normal liver of *Slu7*<sup>+/-</sup> mice, having functional consequences. For instance, hepatic glycogen storage was reduced in

*Slu7*<sup>-/-</sup> mice under both fasting and feeding conditions (Fig. 3C); and as reported for *Gys2*<sup>-/-</sup> mice,<sup>(19)</sup> *Slu7*<sup>-/-</sup> mice showed insulin resistance, evidenced

by impaired phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 (Supporting Fig. S3B). Moreover, consistent with *Sod2*<sup>(20)</sup> and glycogen<sup>(21)</sup> reduction, SLU7





**FIG. 3.** SLU7 haploinsufficiency exacerbates *Hnf4α* promoter switch and liver damage-associated dysfunction and dedifferentiation. (A) RT-PCR analysis of P1-derived *Hnf4α* isoforms in the liver of *Slu7<sup>+/-</sup>* and *Slu7<sup>+/+</sup>* mice after CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver damage. (Right panel) HNF4α1, SLU7, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins in *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>+/-</sup>* mice. (B) P2-derived *Hnf4α* isoforms analyzed as in (A). Immunohistochemical analysis of HNF4α P2 isoforms in the liver of chronically injured *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>+/-</sup>* mice. Higher magnification highlights HNF4α P2 staining of hepatic nuclei in *Slu7<sup>+/-</sup>* mice. (C) Glycogen staining in the liver of *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>+/-</sup>* mice in fasting and feeding conditions. (D) Western blot analysis of heavy-chain IgG, CYP2E1, nitrated proteins (3-nitrotyrosine), and GAPDH in chronically injured *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>+/-</sup>* mouse livers. (E) RT-PCR analysis of hepatic *Cyp2e1* mRNA in *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>+/-</sup>* mice treated as in (D) and sacrificed at day 1 or 4 after last CCl<sub>4</sub> administration. Data are means ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001. Abbreviations: D, day; 3-NT, 3-nitrotyrosine.

haploinsufficiency sufficed to induce hepatic oxidative stress (Supporting Fig. S3C), promoting DNA damage (Supporting Fig. S3D) and protein nitration, which was exacerbated by CCl<sub>4</sub> (Fig. 3D).

Albeit less well known, catabolism of Igs is one relevant hepatic function in systemic homeostasis. Accordingly, hyperglobulinemia is found in patients and models of severe and chronic liver dysfunction.<sup>(17,22)</sup> Importantly, we observed that the hepatic accumulation of IgGs was higher in CCl<sub>4</sub>-treated *Slu7<sup>+/-</sup>* mice (Fig. 3D).

Another major liver function is the metabolism of xenobiotics through P450 cytochromes. In fact, toxins like CCl<sub>4</sub> are metabolized by cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), and *Cyp2e1<sup>-/-</sup>* mice are resistant to CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity.<sup>(23)</sup> Consistent with previous findings,<sup>(24)</sup> CCl<sub>4</sub> administration induced CYP2E1 degradation and inhibited its transcription in *Slu7<sup>+/+</sup>* mice livers (Fig. 3D,E). Conversely, *Slu7<sup>+/-</sup>* mice displayed sustained CYP2E1 expression (Fig. 3D,E), which was reproduced in liver parenchymal cells upon SLU7 knockdown (Supporting Fig. S3E,F). These results demonstrate that SLU7 is central to preserving hepatic differentiation and to protecting the liver against damage.

## SLU7 CONTROLS HNF4α1 PROTEIN STABILITY THROUGH THE REGULATION OF OXIDATIVE STRESS

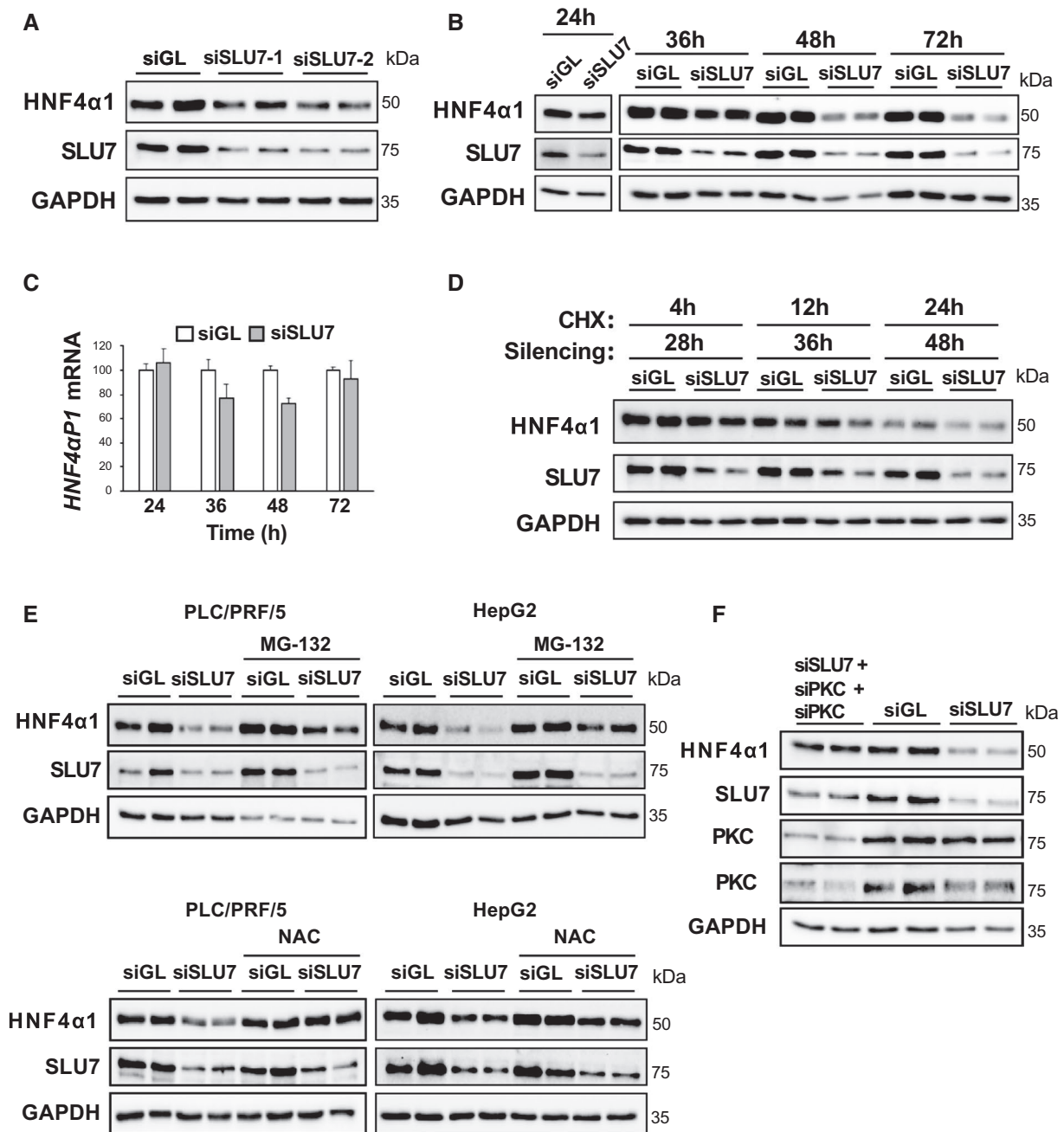
Given the fundamental role of *HNF4α* in liver differentiation and function, we decided to elucidate the mechanisms through which SLU7 mediates its regulation. First, we demonstrated that SLU7 is required to maintain expression of the HNF4α P1 isoform HNF4α1 in a cell-autonomous manner (Fig. 4A). A careful chronological analysis of the effect of SLU7 knockdown on HNF4α1 expression demonstrated

that HNF4α1 protein down-regulation occurs as soon as 24 hours after small interfering (si-) SLU7 transfection, a time point at which no effects are observed on *HNF4α* P1 transcription (Fig. 4B,C). Moreover, the relatively mild effect on *HNF4α* P1 mRNA observed after 36 and 48 hours of SLU7 silencing did not justify the level of protein reduction observed at these time points (Fig. 4B,C), suggesting a role for SLU7 in maintaining HNF4α1 protein stability. To rule out an effect of SLU7 on HNF4α1 translation, we analyzed the effect of SLU7 silencing on HNF4α1 when protein synthesis is inhibited with cycloheximide. We found that SLU7 knockdown reduced HNF4α1 independently of protein translation inhibition (Fig. 4D).

We next evaluated whether SLU7 regulates HNF4α1 stability through proteasome activity. Indeed, the proteasome inhibitor MG-132 significantly blunted SLU7 knockdown-mediated degradation of HNF4α1 in PLC/PRF/5 and HepG2 cells (Fig. 4E). Moreover, we found that HNF4α1 degradation depended on the development of oxidative stress, a consequence of SLU7 inhibition,<sup>(25)</sup> as it was prevented by the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) (Fig. 4E). It has been demonstrated that protein kinase C (PKC) activation induces HNF4α1 cytoplasmic retention<sup>(26)</sup> and degradation<sup>(27)</sup> also in response to oxidative stress.<sup>(26)</sup> Interestingly, we found that PKCα and PKCδ knockdown averted the effect of SLU7 inhibition on HNF4α1 degradation (Fig. 4F).

## SLU7 REGULATES THE EXPRESSION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE STRESS GRANULE COMPONENT UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 10

To identify the mechanisms underlying the antioxidant activity of SLU7, we undertook an unbiased approach based on the characterization of the



**FIG. 4.** SLU7 regulates HNF4α1 stability, preventing oxidative stress and PKC activation. (A) HNF4α1, SLU7, and GAPDH protein levels in HepG2 cells after SLU7 knockdown. (B) HNF4α1, SLU7, and GAPDH protein levels in PLC/PRF/5 cells at different time points after SLU7 knockdown. (C) RT-PCR analysis of *HNF4α* P1 isoforms in samples described in (B). (D) HNF4α1, SLU7, and GAPDH protein levels in PLC/PRF/5 cells upon SLU7 knockdown and cycloheximide treatment. (E) HNF4α1, SLU7, and GAPDH protein levels in PLC/PRF/5 and HepG2 cells upon SLU7 knockdown and treatment with the proteasome inhibitor MG-132 (upper) or the antioxidant NAC (lower). (F) PKCα and PKCδ knockdown prevents HNF4α1 down-regulation induced by SLU7 silencing in PLC/PRF/5 cells. SLU7, PKCα, PKCδ, and GAPDH proteins are analyzed as control. Abbreviations: CHX, cycloheximide; GL, control siRNA firefly luciferase.

SLU7 protein interactome. SLU7 interacting partners were identified by mass spectrometry (MS) after SLU7 immunoprecipitation. SLU7 is predominantly

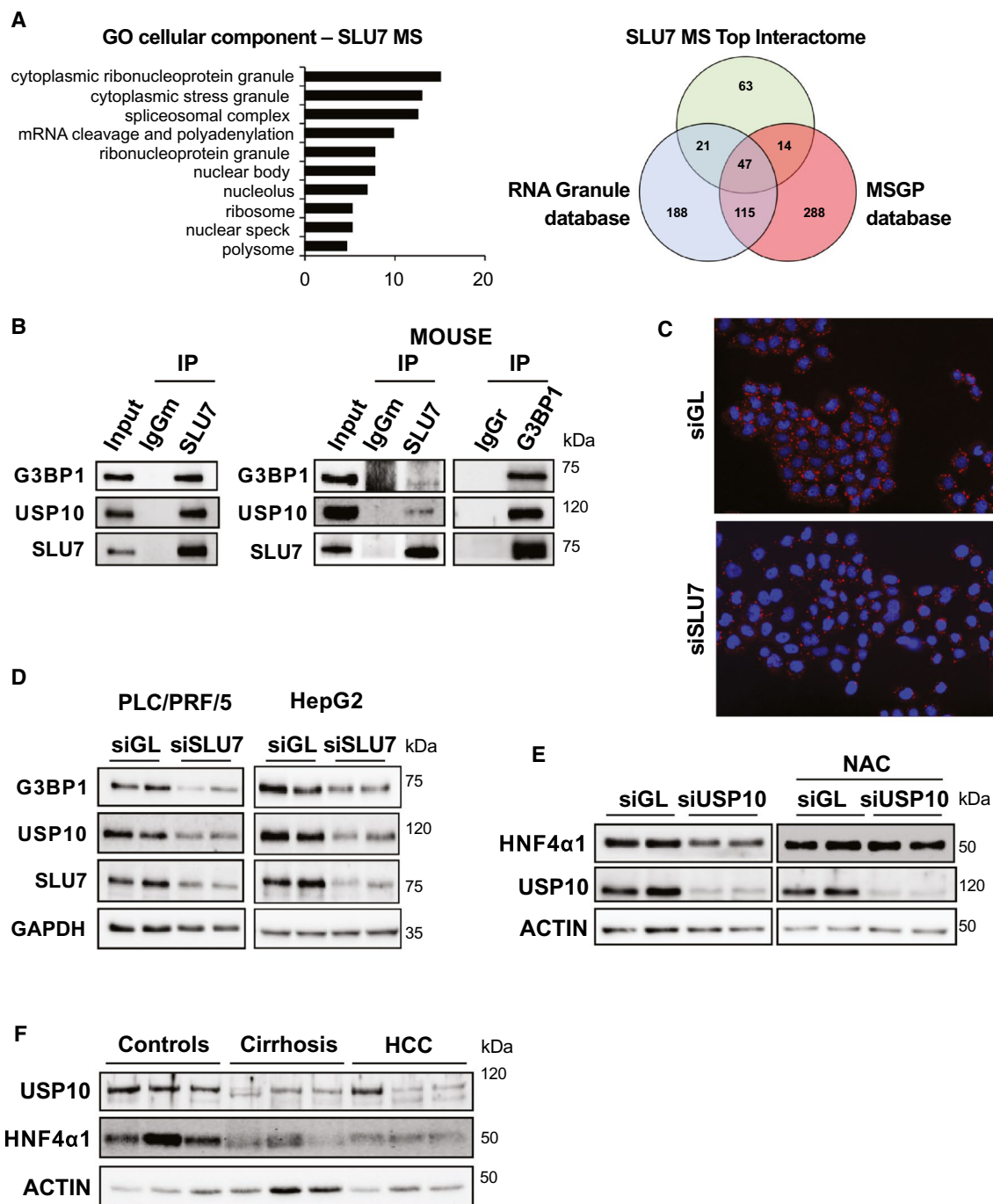
bound to chromatin (Supporting Fig. S4A); to enrich complexes outside this compartment, immunoprecipitations were performed on cytoplasmic and

soluble nuclear fractions. We selected 145 proteins (Supporting Table S2) identified by at least five different peptides in SLU7 immunoprecipitates but absent from control IgG immunoprecipitates, and we performed a gene ontology cellular component analysis. The expected category of spliceosome components ranked third, but surprisingly, the first and second categories identified were proteins associated with cytoplasmic stress granules (SG) (Fig. 5A). Moreover, we found that 82 out of the 145 (56%) SLU7-interacting proteins were present in the Mammalian Stress Granules Proteome (MSGP) and/or the RNA Granule Databases (Fig. 5A). Immunoprecipitation assays confirmed SLU7 interaction with the most common SG components, such as Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP1) and ubiquitin-specific protease 10 (USP10) in unstressed PLC/PRF/5 cells (Fig. 5B), consistent with the existence of pre-SG protein complexes that facilitate rapid coalescence into SGs during stress.<sup>(28,29)</sup> Likewise, although >20% of SG diversity is stress-dependent or cell type-dependent,<sup>(28)</sup> we confirmed these SLU7 interactions in normal mouse liver (Fig. 5B). Moreover, we found that SLU7 is required for stress-induced SG formation in NaAsO<sub>2</sub>-stressed PLC/PRF/5 cells<sup>(28)</sup> (Fig. 5C). Remarkably, this effect was accompanied by a significant reduction in G3BP1 and USP10 protein, but not mRNA, levels upon SLU7 silencing (Fig. 5D; Supporting Fig. S4B). G3BP1 is essential for SG assembly,<sup>(29)</sup> and both G3BP1<sup>(30)</sup> and, more specifically, USP10<sup>(31)</sup> depletions induce oxidative stress. Accordingly, USP10 knockdown triggered reactive oxygen species (ROS) accumulation to a similar extent than SLU7 knockdown (Supporting Fig. S4C). Moreover, HNF4α1 protein levels were down-regulated upon USP10 silencing (Fig. 5E; Supporting Fig. S4D), and this effect involved oxidative stress as it was prevented by NAC (Fig. 5E). Additionally, we detected the physical interaction of USP10 with HNF4α1 (Supporting Fig. S4E), suggesting its possible role as a ubiquitin-specific protease.<sup>(32)</sup> Therefore, we demonstrate that SLU7 is required to maintain USP10 protein levels, protecting cells against oxidative stress and preventing HNF4α1 down-regulation. Furthermore, these interactions may bear clinical significance as we found that USP10 expression is reduced in the liver of patients with cirrhosis and HCC tissues (Fig. 5F).

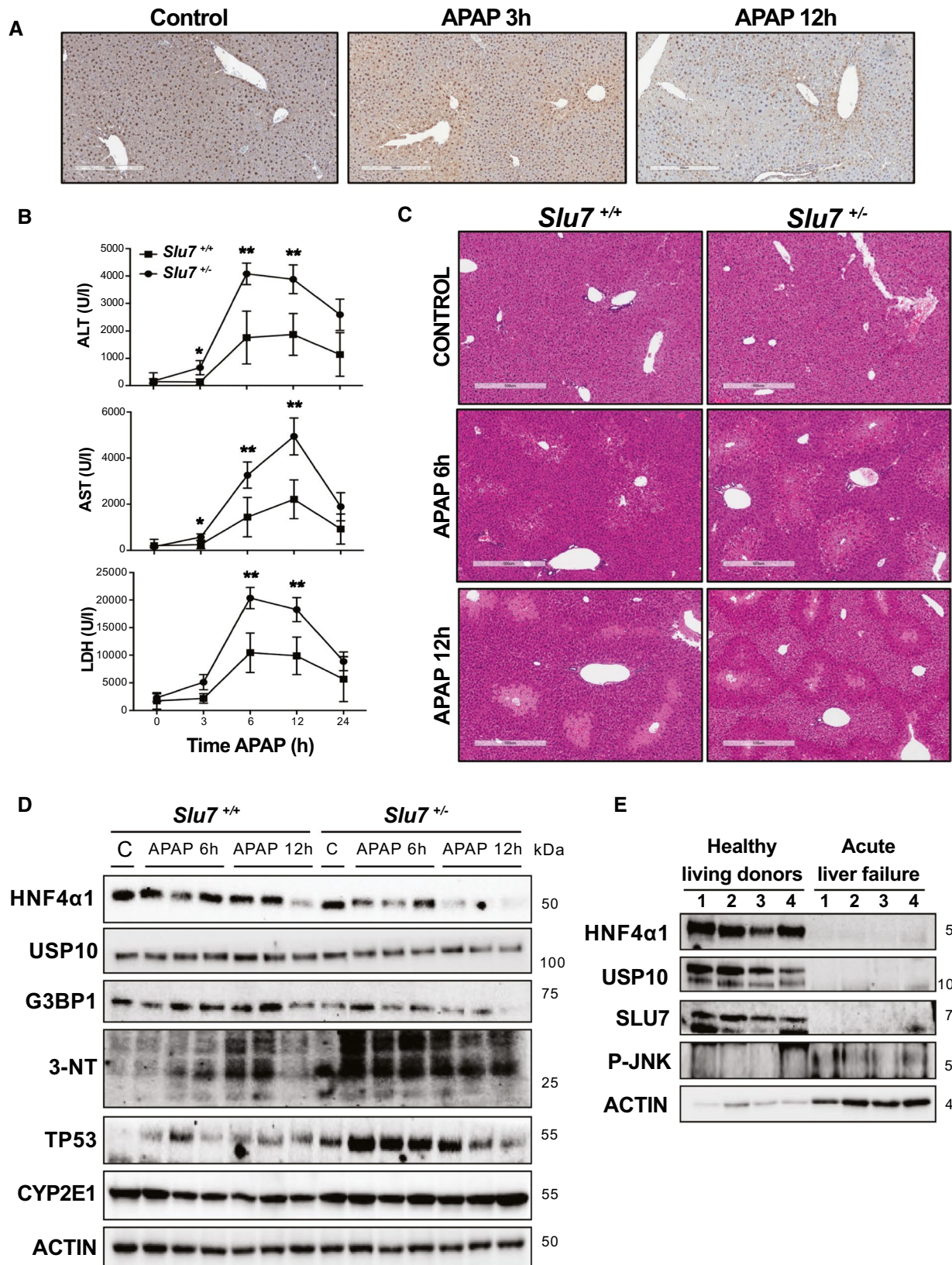
## SLU7 HAPLOINSUFFICIENCY EXACERBATES ACETAMINOPHEN-INDUCED ACUTE LIVER DAMAGE

Acetaminophen (APAP) overdose is a leading cause of acute DILI.<sup>(33)</sup> At therapeutic doses, most APAP is conjugated in the liver with glucuronic acid and sulfate to be excreted in urine and around 5% is oxidized mainly by CYP2E1 to the toxic intermediate *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), eventually detoxified by glutathione (GSH) conjugation.<sup>(34)</sup> Upon APAP overdose, glucuronidation and sulfation pathways are saturated, leading to increased NAPQI formation, hepatic GSH depletion, and extensive oxidative stress.<sup>(35)</sup> In view of our current findings, we evaluated the role of SLU7 in APAP-mediated DILI. We observed a progressive reduction in SLU7 protein in APAP-overdosed mice (Fig. 6A). Enhanced cytoplasmic SLU7 staining 3 hours post-APAP paralleled the activation of phospho-c-Jun N-terminal-kinase (P-JNK) (Supporting Fig. S5A), which is involved in stress-mediated cytoplasmic translocation of SLU7.<sup>(36)</sup> *Slu7* transcription remained unaltered (Supporting Fig. S5B). We then compared the sensitivity of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice to an APAP overdose. Serum levels of hepatic enzymes and parenchymal injury were significantly higher in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 6B,C). Consistent with our findings in the CCl<sub>4</sub> model, expression of *Hnf4α* P1 isoforms was significantly reduced in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice 6 hours after APAP administration (Supporting Fig. S5C), and HNF4α1 was depleted 12 hours after APAP intoxication (Fig. 6D). Importantly, we found that USP10 and G3BP1 proteins were significantly reduced in APAP-treated *Slu7*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 6D). Moreover, these responses were paralleled by enhanced protein nitration, ROS production, heme-oxygenase-1 expression, and tumor suppressor protein (TP53) stabilization (Fig. 6D; Supporting Fig. S5D,E) in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. Reduced expression of the HNF4α1 target *Sod2* (Supporting Fig. S5F) may also contribute to enhanced oxidative stress. Remarkably, HNF4α1, USP10, and SLU7 protein levels were dramatically down-regulated in the liver of patients with acute liver failure (Fig. 6E), in parallel with P-JNK activation.<sup>(37)</sup>

Importantly, the expression of other HNF4α1 targets such as *Gys2* and uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyl-transferase-1A1 (*Ugt1α*),<sup>(38,39)</sup>



**FIG. 5.** SLU7 regulates HNF4 $\alpha$ 1 stability through the antioxidant activity of the SG component USP10. (A) Gene Ontology cellular component analysis of SLU7-interacting proteins identified by MS in PLC/PRF/5 cells. (Right panel) Venn diagram comparing the 145 top proteins identified in the SLU7 MS interactome, with the proteins present in the RNA Granule and the MSGP databases. (B) G3BP1, USP10, and SLU7 proteins in SLU7 immunoprecipitates from PLC/PRF/5 cells and in SLU7 and G3BP1 immunoprecipitates from mouse liver extracts. Input and immunoprecipitates with control mouse or rabbit IgGs are shown as control. (C) Immunofluorescence detection of SGs with anti-G3BP1 antibodies in siGL or siSLU7 transfected PLC/PRF/5 cells treated with NaAsO<sub>2</sub> (1 hour). (D) G3BP1, USP10, SLU7, and GAPDH protein levels in PLC/PRF/5 and HepG2 cells upon SLU7 knockdown. (E) HNF4 $\alpha$ 1, USP10, and actin protein levels in PLC/PRF/5 cells upon USP10 knockdown and effect of NAC. (F) USP10, HNF4 $\alpha$ 1, and actin protein levels in the liver of controls, patients with cirrhosis, and HCC tissues. Data are means  $\pm$  SEM. Abbreviations: GL, control siRNA firefly luciferase; GO, Gene Ontology; IP, immunoprecipitated; m, mouse; r, rabbit.



**FIG. 6.** SLU7 haploinsufficiency exacerbates APAP-induced acute liver damage. (A) SLU7 immunohistochemistry in control and APAP-treated mice. (B) Serum aminotransferases (ALT and aspartate aminotransferase) and lactate dehydrogenase levels in APAP-treated *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>-/-</sup>* mice. (C) H&E stainings of liver sections from APAP-treated *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>-/-</sup>* mice. (D) Hepatic HNF4 $\alpha$ 1, USP10, G3BP1, TP53, CYP2E1, and actin protein expression and protein nitrosylation (3-nitrotyrosine) in APAP-treated *Slu7<sup>+/+</sup>* and *Slu7<sup>-/-</sup>* mice. (E) HNF4 $\alpha$ 1, USP10, SLU7, P-JNK, and actin protein levels in healthy liver tissues and in liver tissues from patients with acute liver failure. Data are means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; 3-NT, 3-nitrotyrosine.

the enzyme responsible for APAP glucuronidation,<sup>(34)</sup> also decreased in APAP-treated *Slu7<sup>-/-</sup>* mice (Supporting Fig. S5G). Glycogenolysis is the source of UDP-glucuronic acid for APAP glucuronidation and hepatoprotection.<sup>(40)</sup> Therefore, we measured serum APAP-glucuronide conjugate levels and found them significantly reduced in *Slu7<sup>-/-</sup>* animals, suggesting a lower capacity for nontoxic APAP metabolism (Supporting Fig. S5H).

As for CCl<sub>4</sub> intoxication, CYP2E1 activity is the major determinant in APAP-mediated hepatotoxicity.<sup>(34)</sup> Consistent with our observations in the CCl<sub>4</sub> model, the decrease in CYP2E1 expression observed in APAP-treated *Slu7<sup>+/+</sup>* mice was delayed or prevented in *Slu7<sup>-/-</sup>* animals (Fig. 6D; Supporting Fig. S5I). This sustained expression of CYP2E1 can contribute to the observed increase in oxidative stress<sup>(41)</sup> and, of course, to the higher APAP hepatotoxicity.<sup>(34)</sup> Altogether, we demonstrate that SLU7 is required to maintain the functional antioxidant and drug-metabolizing capacity of the liver.

## SLU7 IS A KEY GENE IN PROTECTION FROM CHRONIC LIVER INJURY

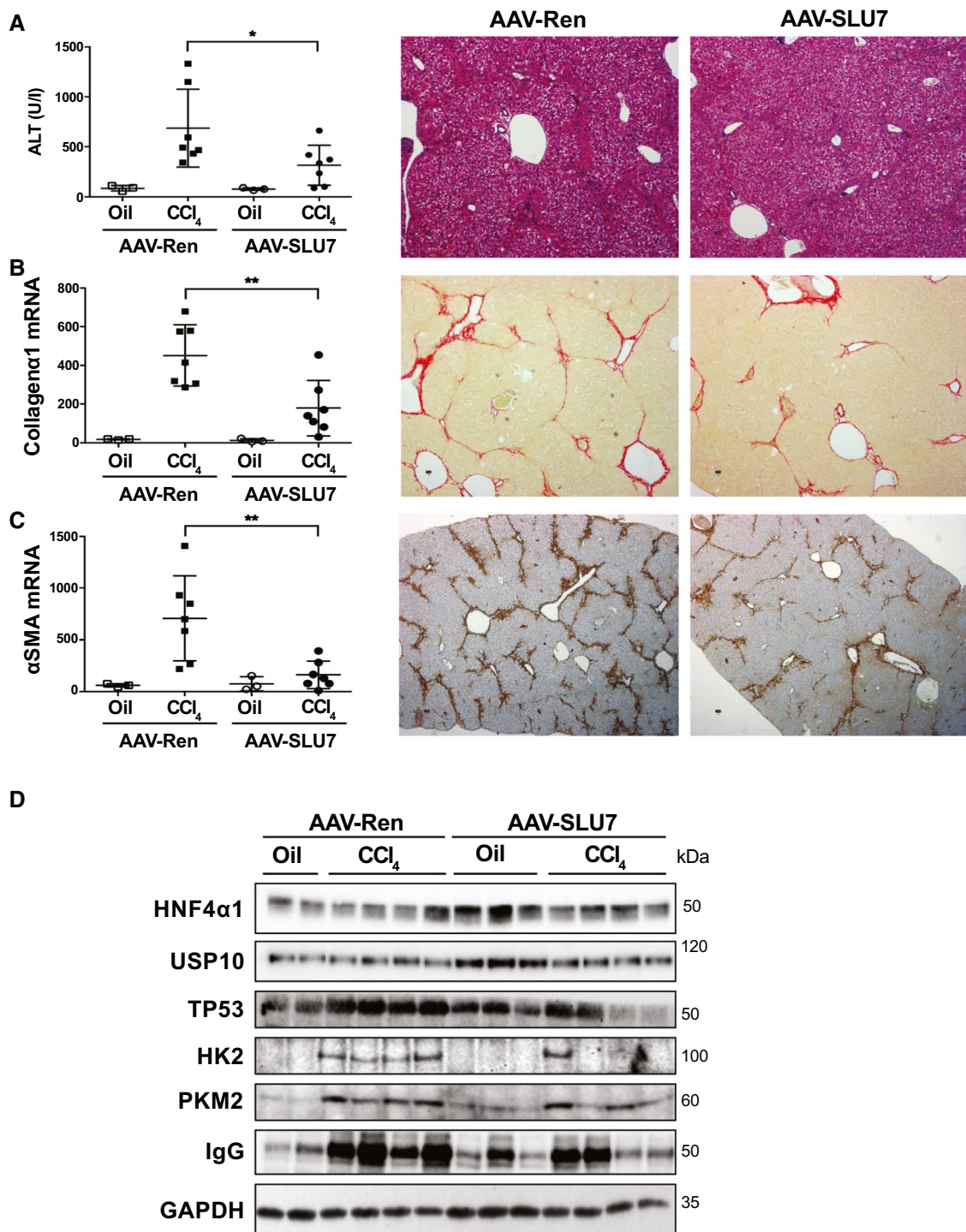
To further demonstrate the important hepatoprotective role of SLU7, we evaluated the effect of preventing damage-mediated SLU7 down-regulation on the development of liver injury. To this end, mice were injected with a SLU7-expressing adeno-associated virus (AAV-SLU7) or a control virus (AAV-Ren)<sup>(10)</sup> before chronic CCl<sub>4</sub> treatment. While expression of SLU7 transgene was reduced upon damage, it was significantly higher than in control AAV-Ren CCl<sub>4</sub>-treated mice and similar to that in control mice (AAV-Ren oil) (Supporting Fig. S6A,B). Importantly, restoration of SLU7 expression protected against chronic liver damage. AAV-SLU7 significantly reduced serum transaminases, improved liver histology, inhibited hepatic collagen expression and

accumulation, and suppressed HSC activation (Fig. 7A-C), altogether translating into a reduced loss of body weight (Supporting Fig. S6C). Mechanistically, SLU7 expression attenuated *Hnf4 $\alpha$*  P1 and HNF4 $\alpha$ 1 down-regulation (Fig. 7D; Supporting Fig. S6D) and inhibited *Hnf4 $\alpha$*  P2 activity (Supporting Fig. S6D), while sustaining USP10 expression and reducing TP53 protein levels (Fig. 7D). Accordingly, expression of hepatic dedifferentiation markers such as the fetal/oncogenic enzyme isoforms hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 (PKM2) as well as the hepatic accumulation of IgGs was attenuated in CCl<sub>4</sub>-treated AAV-SLU7 mice (Fig. 7D). Therefore, preventing SLU7 down-regulation in the damaged liver preserves hepato-specific functions and protects against chronic injury.

## Discussion

Impairment of liver function dictates the prognosis of patients with acute and chronic hepatic diseases irrespective of the underlying etiology.<sup>(2)</sup> Importantly, hepatic dysfunction relates not only to hepatocellular loss but also to the dedifferentiation of the remaining parenchyma in a microenvironment shaped by cytokines, growth factors, oxidative stress, and matrix remodeling.<sup>(3,4,6,8,18)</sup>

Among transcription factors, HNF4 $\alpha$  is considered essential for preserving the normal functions of the fetal and the adult liver through the activity of *HNF4 $\alpha$*  P2 and P1, respectively.<sup>(7)</sup> Different observations strongly support the involvement of HNF4 $\alpha$  deregulation in the development of liver damage. First, HNF4 $\alpha$ 1 expression is significantly reduced<sup>(4,5)</sup> or mislocalized to the cytoplasm<sup>(12)</sup> in the liver of patients with cirrhosis and in animal models of liver injury, paralleling the loss of hepatic functions. Moreover, a switch from P1-driven to P2-driven *HNF4 $\alpha$*  expression is observed in human HCC tissues.<sup>(13)</sup> Second, when HNF4 $\alpha$  is reintroduced in models of liver cirrhosis and HCC,



**FIG. 7.** Preservation of hepatic SLU7 expression protects against CCl<sub>4</sub>-induced chronic damage. Mice were injected with AAV-SLU7 or control AAV-Ren 2 weeks before CCl<sub>4</sub> treatment, as in Fig 1B. (A) Serum ALT levels and representative H&E staining of liver sections. (B) RT-PCR analysis of *Collagen  $\alpha$ 1* mRNA and representative Sirius red stainings. (C) RT-PCR analysis of  $\alpha$ -*Sma* mRNA and representative  $\alpha$ -SMA stainings. (D) HNF4 $\alpha$ 1, USP10, TP53, HK2, PKM2, IgG, and GAPDH protein levels. Data are means  $\pm$  SEM. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01. Abbreviations: AAV, adenoassociated virus; ALT, alanine aminotransferase.

liver functions are reestablished, and hepatocyte differentiation is recovered.<sup>(5,14)</sup> Here, we demonstrate that *HNF4α* promoter switch is an early and conserved event occurring in human liver cirrhosis and in models of chronic liver damage. Importantly, and as discussed below, we uncover a molecular mechanism underlying HNF4α disruption which involves the splicing factor SLU7.

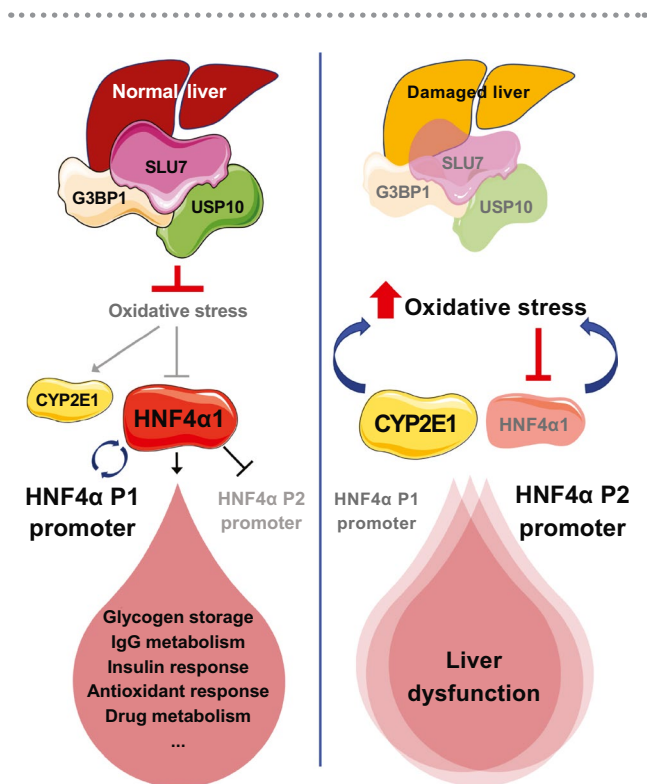
We previously demonstrated that SLU7 is required to maintain the differentiated and quiescent phenotype of the normal adult liver, regulating the hepatic transcriptome.<sup>(10)</sup> Importantly, we discovered that SLU7 controls the proper splicing and expression of *SRSF3* and the correct usage of *HNF4α* P1 promoter,<sup>(10,15)</sup> placing SLU7 upstream of two master regulators of liver differentiation.<sup>(9)</sup> Our earlier findings also evidenced that hepatic *SLU7* mRNA expression is significantly reduced in patients with cirrhosis,<sup>(16)</sup> altogether suggesting a role of SLU7 dysregulation in liver dysfunction. Now we show that SLU7 down-regulation occurs in both human and mouse liver upon injury and that reduced SLU7 expression contributes to both the loss of hepatic function and the development of parenchymal damage. In fact, we found that SLU7 haploinsufficiency is enough to exacerbate liver dysfunction and sensitivity to APAP-induced and CCl<sub>4</sub>-induced acute and chronic liver damage, respectively.

In this context, the hepatic dysfunction concomitant with SLU7 down-regulation was associated with a maintained or faster recovery of CYP2E1 levels in the liver of CCl<sub>4</sub>-treated and APAP-treated *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. Sustained CYP2E1 expression could contribute to higher sensitivity to liver damage as it has been shown that CYP2E1 overexpression or its induction by ethanol, obesity, or diabetes<sup>(42,43)</sup> is associated with enhanced oxidative stress and liver damage susceptibility, while *Cyp2E1*<sup>-/-</sup> mice are resistant to CCl<sub>4</sub> and APAP-induced hepatotoxicity.<sup>(23)</sup> Regarding the mechanisms implicated in the regulation of CYP2E1 expression, it has been proposed that oxidative stress induces<sup>(44)</sup> and insulin inhibits *CYP2E1* transcription, and accordingly insulin resistance results in CYP2E1 up-regulation.<sup>(42)</sup> Based on these notions, the enhanced hepatic expression of CYP2E1 in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice upon damage could be explained by higher levels of oxidative stress and insulin resistance observed in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice, which could be attributable to an inhibition of USP10 expression.

In agreement with our previous observations on the effect of SLU7 on *Hnf4α* transcription in the normal liver,<sup>(10)</sup> we found that SLU7 haploinsufficiency led to the inhibition of *Hnf4α* P1 promoter activity. However, when we explored the mechanisms implicated in SLU7-mediated HNF4α regulation *in vitro*, we uncovered an unexpected role for SLU7 in the preservation of HNF4α1 protein stability in an oxidative stress-dependent and PKC-dependent manner. MS-based protein interactome studies demonstrated that SLU7 interacts with components of the SGs in unstressed conditions, both *in vivo* and *in vitro*. Moreover, we found that SLU7 is necessary to secure SG formation upon stress induction as SLU7 is required to maintain the expression of the SG core components G3BP1 and USP10,<sup>(28)</sup> which in turn also have antioxidant capacity.<sup>(30,31)</sup> While the specific mechanisms involved in the stabilization of SG components by SLU7 remain to be fully elucidated, we revealed that USP10 antioxidant function controls HNF4α1 stability and that upon liver damage SLU7 haploinsufficiency results in USP10 down-regulation. Moreover, we found that USP10 expression is reduced in the liver of patients with cirrhosis as well as in HCC tissues, which would be in agreement with the recent description of USP10 down-regulation in the liver of patients with NAFLD<sup>(45)</sup> and in HCC in association with poor prognosis.<sup>(46)</sup> Interestingly, these studies described mechanisms associated with USP10 function as ubiquitin-specific protease interacting and stabilizing proteins like sirtuin 6, AMP-activated protein kinase α, and phosphatase and tensin homolog. Therefore, and in view of their physical interaction, a direct role for USP10 in maintaining HNF4α stability cannot be disregarded.<sup>(32)</sup>

Interestingly, reduced HNF4α1 protein stability would explain the changes observed in P1/P2 usage *in vivo* as it has been demonstrated that HNF4α1 activates P1<sup>(47)</sup> while it inhibits P2.<sup>(48)</sup> Moreover, impaired expression of P1-driven *HNF4α* isoforms results in *Hnf4α* P2 promoter activation.<sup>(49)</sup> Importantly, and from a physiopathological perspective, impaired expression of P1-driven *HNF4α* isoforms in *Slu7*<sup>+/-</sup> mice would be responsible for the down-regulation of HNF4α1 target genes such as *Hnf1α*, *Alb*, *Gys2*, *Ttr*, *Ugt1α*, and *Sod2*.<sup>(50)</sup> These transcriptomic alterations not only have functional consequences but can indeed contribute to the development of liver damage. It has been demonstrated that the response to stress largely





**FIG. 8.** Mechanisms involved in SLU7-mediated preservation of liver differentiation and function.

depends on the differentiation state of the cells. Particularly in the liver, reduced expression of *Gys2* and *Ugt1α* would explain the observed decrease in glycogen stores and APAP glucuronidation detected in *Slu7<sup>+/-</sup>* mice, which in turn may contribute to the higher sensitivity of these animals to APAP-induced liver damage. Moreover, the down-regulation of the antioxidant enzyme *Sod2*<sup>(20)</sup> and the depleted levels of glycogen, an evolutionarily conserved antioxidant,<sup>(21)</sup> may further contribute to the increased oxidative and nitroxidative stress observed in *Slu7<sup>+/-</sup>* mice and therefore to their enhanced susceptibility to CCl<sub>4</sub> and APAP.<sup>(41)</sup>

The biological response to stress is orchestrated through multiple mechanisms which will eventually dictate cellular fate. The correct performance of such mechanisms largely depends on cellular differentiation. Our present results demonstrate that in the liver SLU7 integrates antioxidative stress responses with the maintenance of hepatocellular differentiation (Fig. 8). Moreover, we show that the loss of hepatic functions is not only a consequence of liver damage but a key player in its onset and development. Importantly,

our results demonstrate that subtle changes in the expression of central homeostatic genes, such as SLU7, can drastically influence both liver function and injury progression. Finally, we uncover a hierarchical pathway linking SLU7 to HNF4α regulation.

**Acknowledgment:** We particularly acknowledge the patients for their participation and the Biobank of the University of Navarra for its collaboration. We thank the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project and its funders for providing the mutant mouse line (Allele: *Slu7<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup>*). Funding and associated primary phenotypic information may be found at [www.sanger.ac.uk/mouseportal](http://www.sanger.ac.uk/mouseportal). We acknowledge Drs. Guguen-Guillouzo, Gripon, and Trepo for the generation of the HepaRG cell line obtained from Biopredic with a material transfer agreement. We thank Dr. Guembe (CIMA, University of Navarra, Pamplona, Spain) for technical support with immunohistochemical analyses.

**Author Contributions:** M.G-R., M.R., M.J., M.E., M.A., I.U., M.U.L., R.U., conducted the research and provided methodology. I.B. and B.S. provided resources. C.G-R, J.C.F-C., F.J.C., A.E. and A.P-L. contributed to the acquisition of data. M.G.F-B. contributed to interpretation of data and reviewed the manuscript. M.A.A., M.A., and C.B. contributed to conceptualization, fund acquisition, project administration, supervision, and writing.

## REFERENCES

- 1) Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol* 2019;70:151-171.
- 2) Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 2005;42(Suppl.): S100-S107.
- 3) Avila MA, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;33:907-914.
- 4) Berasain C, Herrero J-I, García-Trevijano ER, Avila MA, Esteban JI, Mato JM, et al. Expression of Wilms' tumor suppressor in the liver with cirrhosis: relation to hepatocyte nuclear factor 4 and hepatocellular function. *HEPATOLOGY* 2003;38:148-157.
- 5) Nishikawa T, Bell A, Brooks JM, Setoyama K, Melis M, Han B, et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J Clin Invest* 2015;125:1533-1544.
- 6) Hyun J, Oh S-H, Premont RT, Guy CD, Berg CL, Diehl AM. Dysregulated activation of fetal liver programme in acute liver failure. *Gut* 2019;68:1076-1087.
- 7) Dubois V, Staels B, Lefebvre P, Verzi MP, Eeckhoutte J. Control of cell identity by the nuclear receptor HNF4 in organ pathophysiology. *Cells* 2020;9:2185.

- 8) Berasain C, Avila MA. Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:3831-3851.
- 9) Sen S, Jumaa H, Webster NJG. Splicing factor SRSF3 is crucial for hepatocyte differentiation and metabolic function. *Nat Commun* 2013;4:1336.
- 10) Elizalde M, Urtasun R, Azkona M, Latasa MU, Goñi S, García-Irigoyen O, et al. Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J Clin Invest* 2014;124:2909-2920.
- 11) **Bhate A, Parker DJ**, Bebee TW, Ahn J, Arif W, Rashan EH, et al. ESRP2 controls an adult splicing programme in hepatocytes to support postnatal liver maturation. *Nat Commun* 2015;6:8768.
- 12) **Florentino RM, Fraunhoffer NA**, Morita K, Takeishi K, Ostrowska A, Achreja A, et al. Cellular location of HNF4 $\alpha$  is linked with terminal liver failure in humans. *Hepatol Commun* 2020;4:859-875.
- 13) **Tanaka T, Jiang S**, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* 2006;208:662-672.
- 14) Ning B-F, Ding J, Yin C, Zhong W, Wu K, Zeng X, et al. Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:7640-7651.
- 15) **Jiménez M, Urtasun R**, Elizalde M, Azkona M, Latasa M, Uriarte I, et al. Splicing events in the control of genome integrity: role of SLU7 and truncated SRSF3 proteins. *Nucleic Acids Res* 2019;47:3450-3466.
- 16) Castillo J, Goñi S, Latasa MU, Perugorria MJ, Calvo A, Muntané J, et al. Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology* 2009;137:1805-1815.e1-4.
- 17) Tanaka S, Okamoto Y, Yamazaki M, Mitani N, Nakajima Y, Fukui H. Significance of hyperglobulinemia in severe chronic liver diseases—with special reference to the correlation between serum globulin/IgG level and ICG clearance. *Hepatogastroenterology* 2007;54:2301-2305.
- 18) Argemi J, Latasa MU, Atkinson SR, Blokhin IO, Massey V, Gue JP, et al. Defective HNF4 $\alpha$ -dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat Commun* 2019;10:3126-3219.
- 19) Irimia JM, Meyer CM, Segvich DM, Surendran S, DePaoli-Roach AA, Morral N, et al. Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and steatosis in mice. *J Biol Chem* 2017;292:10455-10464.
- 20) Ramachandran A, Lebofsky M, Weinman SA, Jaeschke H. The impact of partial manganese superoxide dismutase (SOD2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;251:226-233.
- 21) Gusarov I, Pani B, Gautier L, Smolentseva O, Eremina S, Shamovsky I, et al. Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nat Commun* 2017;8:15868-15912.
- 22) **Liu WT, Jing YY, Han ZP**, Li XN, Liu Y, Lai FB, et al. The injured liver induces hyperimmunoglobulinemia by failing to dispose of antigens and endotoxins in the portal system. *PLoS One* 2015;10:e0122739.
- 23) Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;153:109-118.
- 24) **Xu J, Ma H-Y**, Liang S, Sun M, Karin G, Koyama Y, et al. The role of human cytochrome P450 2E1 in liver inflammation and fibrosis. *Hepatol Commun* 2017;1:1043-1057.
- 25) **Urtasun R, Elizalde M**, Azkona M, Latasa MU, García-Irigoyen O, Uriarte I, et al. Splicing regulator SLU7 preserves survival of hepatocellular carcinoma cells and other solid tumors via oncogenic miR-17-92 cluster expression. *Oncogene* 2016;35:4719-4729.
- 26) **Yu D, Chen G**, Pan M, Zhang J, He W, Liu Y, et al. High fat diet-induced oxidative stress blocks hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  and leads to hepatic steatosis in mice. *J Cell Physiol* 2018;233:4770-4782.
- 27) Sun K, Montana V, Chellappa K, Brelivet Y, Moras D, Maeda Y, et al. Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol* 2007;21:1297-1311.
- 28) Markmiller S, Soltanieh S, Server KL, Mak R, Jin W, Fang MY, et al. Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. *Cell* 2018;172:590-604.e13.
- 29) Youn J-Y, Dyakov BJA, Zhang J, Knight JDR, Vernon RM, Forman-Kay JD, et al. Properties of stress granule and P-body proteomes. *Mol Cell* 2019;76:286-294.
- 30) Cho E, Than TT, Kim S-H, Park E-R, Kim M-Y, Lee KH, et al. G3BP1 depletion increases radiosensitisation by inducing oxidative stress in response to DNA damage. *Anticancer Res* 2019;39:6087-6095.
- 31) **Takahashi M, Higuchi M**, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, et al. Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol Cell Biol* 2013;33:815-829.
- 32) Daigo K, Kawamura T, Ohta Y, Ohashi R, Katayose S, Tanaka T, et al. Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 (HNF4) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. *J Biol Chem* 2010;286:674-686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154732>.
- 33) Lee WM. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity—isn't it time for APAP to go away? *J Hepatol* 2017;67:1324-1331.
- 34) McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res* 2013;30:2174-2187.
- 35) Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol* 2016;10:148-156.
- 36) **Shomron N, Alberstein M**, Reznik M, Ast G. Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *J Cell Sci* 2005;118:1151-1159.
- 37) Cubero FJ, Zoubek ME, Hu W, Peng J, Zhao G, Nevzorova YA, et al. Combined activities of JNK1 and JNK2 in hepatocytes protect against toxic liver injury. *Gastroenterology* 2016;150:968-981.
- 38) Kamiyama Y, Matsubara T, Yoshinari K, Nagata K, Kamimura H, Yamazoe Y. Role of human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007;22:287-298.
- 39) Chiang JYL. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  regulation of bile acid and drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5:137-147.
- 40) Bánhegyi G, Garzó T, Antoni F, Mandl J. Glycogenolysis—and not gluconeogenesis—is the source of UDP-glucuronic acid for glucuronidation. *Biochim Biophys Acta* 1988;967:429-435. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(88\)90106-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(88)90106-7).
- 41) Abdelmegeed MA, Moon K-H, Chen C, Gonzalez FJ, Song B-J. Role of cytochrome P450 2E1 in protein nitration and ubiquitin-mediated degradation during acetaminophen toxicity. *Biochem Pharmacol* 2010;79:57-66.
- 42) Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35:630-637.
- 43) Abdelmegeed MA, Ha S-K, Choi Y, Akbar M, Song B-J. Role of CYP2E1 in mitochondrial dysfunction and hepatic injury by alcohol and non-alcoholic substances. *Curr Mol Pharmacol* 2017;10:207-225.

- 44) Jin M, Ande A, Kumar A, Kumar S. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell Death Dis* 2013;4:e554.
- 45) **Luo P, Qin C, Zhu L**, Fang C, Zhang Y, Zhang H, et al. Ubiquitin-specific peptidase 10 (USP10) inhibits hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation through Sirt6. *HEPATOLOGY* 2018;68:1786-1803.
- 46) **Lu C, Ning Z, Wang A**, Chen DI, Liu X, Xia T, et al. USP10 suppresses tumor progression by inhibiting mTOR activation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2018;436:139-148.
- 47) Kyrnizi I, Hatzis P, Katrakili N, Tronche F, Gonzalez FJ, Talianidis I. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 2006;20:2293-2305.
- 48) Briançon N, Bailly A, Clotman F, Jacquemin P, Lemaigre FP, Weiss MC. Expression of the alpha7 isoform of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 is activated by HNF6/OC-2 and

HNF1 and repressed by HNF4alpha1 in the liver. *J Biol Chem* 2004;279:33398-33408.

- 49) Lu H. Crosstalk of HNF4 $\alpha$  with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. *Acta Pharm Sin B* 2016;6:393-408.
- 50) Bolotin E, Liao H, Ta TC, Yang C, Hwang-Verslues W, Evans JR, et al. Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays. *HEPATOLOGY* 2010;51:642-653.

Authors names in bold designate shared co-first authorship.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.32029/supinfo](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.32029/supinfo).



## SUPPORTING INFORMATION

### SLU7 prevents oxidative stress-mediated HNF4 $\alpha$ degradation preserving hepatic differentiation and protecting from liver damage

María Gárate-Rascón<sup>1</sup>, Miriam Recalde<sup>1</sup>, Maddalen Jimenez<sup>1</sup>, María Elizalde<sup>1</sup>, María Azkona<sup>1</sup>, Iker Uriarte<sup>1,2</sup>, M Uxue Latasa<sup>1</sup>, Raquel Urtasun<sup>1#</sup>, Bruno Sangro<sup>2,3,4</sup>, Carmen Garcia-Ruiz<sup>2,5,6</sup>, José C. Fernandez-Checa<sup>2,5,6</sup>, Fernando J Corrales<sup>2,7</sup>, Argitxu Esquivel<sup>8</sup>, Antonio Pineda-Lucena<sup>8</sup>, Maite G. Fernández-Barrena<sup>1,2,4</sup>, Matías A. Ávila<sup>1,2,4\*</sup>, María Arechederra<sup>1,4\*</sup>, Carmen Berasain<sup>1,2,4\*</sup>

1. Hepatology Program, CIMA, University of Navarra, Pamplona, Spain.
2. CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.
3. Hepatology Unit, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain.
4. Instituto de Investigaciones Sanitarias de Navarra IdiSNA, Pamplona, Spain.
5. Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Barcelona, Spain
6. Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS and CIBEREHD, Barcelona, Spain
7. Functional Proteomics Laboratory, National Center for Biotechnology, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain.
8. Molecular Therapeutics Program, CIMA, University of Navarra, Pamplona, Spain.

## MATERIAL AND METHODS

### ANIMAL MODELS

SLU7 haploinsufficient mice (C57BL/6NTac-Slu7tm1a(KOMP)Wtsi/Wtsi) were generated by the KOMP/EUCOMM targeted embryonic stem cells resource and were obtained from European Mouse Mutant Archive (EMMA). Mice were maintained on a consistent inbred C57BL/6N background. 14-weeks-old SLU7 haplo-insufficient male mice (*Slu7*<sup>+/-</sup>) and their corresponding wild type littermates (*Slu7*<sup>+/+</sup>) were maintained under fed conditions with regular chow diet or fasted overnight when experimentation required. For the acute model of liver damage mice were fasted overnight and then intraperitoneal injected with a single dose of 300 mg/kg of acetaminophen (APAP) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dissolved in warm phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco-Life Technology, Madrid, Spain) as described(1). Controls received the equivalent volume of PBS. Three hours after the injection, mice were allowed to eat *ad libitum* and were euthanized when indicated.

For the chronic model of liver damage, mice received an intraperitoneal injection twice a week for 6.5 weeks with CCl<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) at 0.6  $\mu$ L/g dissolved in corn oil(2).

Controls received the equivalent volume of corn oil. Mice were sacrificed 24h after the last administration.

For both models, blood was collected at indicated time points and at sacrifice livers were removed to be snap frozen in liquid nitrogen or formalin-fixed and paraffin-embedded. For adeno-associated virus (AAV) experiments, mice were intravenously injected with  $10^{11}$  pfu of control (AAV-Ren) or SLU7 expressing (AAV-SLU7) AAVs(3) two weeks before CCl<sub>4</sub> chronic treatment.

Experiments were performed with a minimum of 5 animals per group and were repeated at least twice.

### **CELL LINES, TRANSFECTIONS AND TREATMENTS**

Human HCC cell lines PLC/PRF/5 and HepG2 were obtained from the ATCC and were grown in DMEM (Gibco-Life Technology, Madrid, Spain) supplemented with 5% (PLC/PRF/5) or 10% (HepG2 and Hep3B) fetal bovine serum (FBS), glutamine and antibiotics. The human HCC cell line HepaRG was obtained from BioPredic (Rennes, France). Differentiated HepaRG cells were obtained following described culture conditions (4). All cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

Transfections with siRNAs were performed using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) following the manufacturer's instructions. All siRNAs were obtained from Sigma-Aldrich and were used at 75 nM individually or at 37.5 nM when combined. Silencing was confirmed by qPCR and Western blot. Sequence of siRNAs will be provided upon request.

Where indicated, cells were treated with 10 μM of the proteasome inhibitor MG-132 (Calbiochem, CA, USA 474790) for the last 12 h; with 10 μg/mL of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich, C-7698) for the last 4, 12 or 24 h; or with 10 mM of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) (Sigma-Aldrich, A8199) added to the culture medium 4 h after transfection with siRNAs. The same volume of vehicle (DMSO for MG-132 and CHX, and water for NAC) was added to control cells.

### **RNA ISOLATION AND PCR**

Cell lines lysates and liver tissue samples were homogenated and subjected to total RNA extraction using the automated Maxwell RSC Instrument with simplyRNA tissue kit (Promega, Madison, WI, USA). Reverse transcription was performed as described (2). Real-time PCRs were performed with the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) as previously described (5). Gene expression was normalized relative to that of the housekeeping gene *Rplp0* as described (6). Sequence of primers used in the study will be provided upon request.

### **PROTEIN EXTRACTION AND WESTERN BLOT ANALYSIS**

For protein extraction, mouse or human liver tissue samples were lysed in urea buffer (Urea, Thiourea, Chaps, Dithiothreitol (DTT), a cocktail of phosphatases (1mM sodium orthovanadate, 10mM sodium fluoride, 100mM  $\beta$ -glycerophosphate) and proteases inhibitors (Roche, Basel, Switzerland)). The homogenates were sonicated and cleared by centrifugation at 75000 rpm for 20 min at 4°C. Cell lines were lysed in RIPA buffer (5M NaCl, 1M Tris, 0,5% Deoxycholate, 20% SDS, 1% Tritón X-100 and proteases-phosphatases inhibitors cocktail) for 20 min at 4°C under constant rotation, sonicated and centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4°C. Protein extracts were subjected to Western blot analysis as reported (6). Antibodies used are described in Table S1.

### **SUBCELLULAR FRACTIONATION**

PLC/PRF/5 siGL-transfected cells were subjected to subcellular fractionation to separate cytoplasm, nucleoplasm and chromatin-bound fraction for subsequent Western blot analysis. The NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA #78835) was used following the manufacturer's instructions. Next, nuclear extract was incubated in NP40 buffer (15 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 0.1% NP40 and protease-phosphatase inhibitors cocktail) for 30 min at 4°C 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 treated with 250 U/ $\mu$ L benzonase (Sigma-Aldrich) in a buffer containing 20 mM Tris HCl pH 7.4, 60 mM NaCl,

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40 and protease-phosphatase inhibitors cocktail for 30 min at 4°C and then centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4°C to get the supernatant.

### **IMMUNOFLUORESCENCE**

PLC/PRF/5 cells were cultured on glass coverslips, transfected with siGL or siSLU7 for 48h and treated with 500 μM sodium arsenite (Sigma-Aldrich S7400) for the last 1 h. Cells were washed twice with PBS, fixed in 4% formaldehyde for 10 min and quenched with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 10 min. After three washes with PBS, cells were permeabilized with 0,1% Triton X-100 in PBS for 5 min at 4°C, and excess binding sites were blocked with SuperBlock Blocking Buffer in PBS (Thermo Fisher Scientific, #37517) for 1 h at room temperature. Incubation with the primary antibody was carried out overnight at 4°C, followed by incubation with secondary antibody for 1 h at room temperature. The antibodies used are described in Table S1. Cells were then washed three times with PBS-BSA 1% and coverslips were mounted onto glass slides using Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were captured using the Zeiss Axio ImagerM1 automated microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

### **COIMMUNOPRECIPITATION ASSAY**

To coimmunoprecipitate endogenous proteins with SLU7 in PLC/PRF/5 cells, cytoplasmic and nuclear soluble protein complexes were isolated as described in the subcellular fractionation section. Frozen liver samples were lysed in ice-cold lysis buffer containing 20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA and protease-phosphatase inhibitors cocktail for 30 min at 4°C under constant rotation. 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) and 800-100 μg of proteins were incubated with 25 μL of Protein G dynabeads (Invitrogen, #10003D) for 2 h at 4°C under constant rotation. Precleared samples were incubated with 5 μg of primary antibody or the corresponding control IgG, previously coupled to protein G dynabeads (2 h under constant rotation at room temperature), overnight at 4°C under constant rotation. The immunocomplexes were washed three times with cold PBS with proteases and phosphatases inhibitors and eluted in loading buffer (50 mM Tris pH 6.8,



100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.01% bromophenol Blue) at 95°C for 5 min. Pelleted beads were discarded and the supernatants were subjected to Western blot analysis. The antibodies used are described in Table S1.

### **MASS SPECTROMETRY ANALYSIS**

Soluble protein lysates of PLC/PRF/5 were prepared following the subcellular fractionation protocol described (7) and discarding the chromatin fraction. The antibody used to immunoprecipitate human SLU7 and the pre-immune IgG are described in Table S1. Eluted samples were subjected to LC-ESI-MS/MS TRIPLE-TOF analysis as previously described (8). According to the analysis, proteins with at least 5 peptide sequences identified in SLU7 and none in the IgG immunoprecipitated were considered for cross-matching with two stress granule components databases: MSGP (<https://msgp.pt/index/>) (9) and RNA Granule Database (<http://rnagranuledb.lunenfeld.ca/>) (10).

### **SERUM BIOCHEMISTRY**

Collected blood was conserved at 4°C overnight and was centrifuged at maximum rpm for 15 minutes to separate serum from blood clot. The supernatant (serum) was collected and diluted 1/10 with physiological serum for the determination of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) on a Roche/Hitachi Cobas system.

### **HISTOLOGICAL DETERMINATIONS**

Sections from formalin-fixed and paraffin-embedded liver tissue were stained with Haematoxylin-Eosin (H&E) to visualize liver morphology and with Pico-Sirius Red to determine collagen deposition as described (2). Periodic acid-Schiff (PAS) staining was performed for liver glycogen detection as described (3).

Immunohistochemical detections in liver sections were carried out as described (2) using the antibodies listed in Table S1.

**ROS DETECTION**

Estimation of intracellular reactive oxygen species (ROS) in PLC/PRF/5 cell line and in freshly prepared liver extracts (40 mg) homogenized in ice-cold 40mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (1:10 w/v) and incubated with 10 $\mu$ M DCFDA in Tris-HCl buffer at 37°C for 30 min was performed as previously described (5).

**ANALYSIS OF APAP-GLUCURONIDE**

APAP-Glucuronide (APAP-Gluc) was measured in the serum of APAP-treated mice by liquid chromatography dual mass spectrometry (LC-MS/MS) in an Acquity UPLC (Waters) equipped with an Acquity HSS T3 C18 2.1x100mm 1.8  $\mu$ m column (Waters), which was coupled to a Xevo TQ MS triple-quadrupole mass spectrometer (Waters) using an electrospray ionization source in negative ionization mode. The protocol was adapted from a Waters' application note (11).

**Supporting Table S1. Antibodies used in the study**

Antibody name	Catalog number	Manufacturer	Technique	Dilution/Quantity
SLU7	NBP2-20403	Novus Biologicals (Centennial, USA)	Western blot	1:1000
SLU7	612604	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)	Coimmunoprecipitation	5µg
SLU7	Sc-10829	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	Immunohistochemistry	1:500
CYP2E1	Ab28146	Abcam (Cambridge, UK)	Western blot	1:1000
G3BP1	Ab181150	Abcam	Western blot	1:1000
			Immunocytochemistry	1:700
			Coimmunoprecipitation	5µg
USP10	Ab72486	Abcam	Western blot	1:1000
HISTONE 3	Ab1012	Abcam	Western blot	1:1000
3'NITROTYROSINE	Sc-32757	Santa Cruz	Western blot	1:500
HK2	Sc-28889	Santa Cruz	Western blot	1:500
PKCα	Sc-8393(H-7)	Santa Cruz	Western blot	1:500
PKCδ	Sc-937 (C-20)	Santa Cruz	Western blot	1:1000
HNF4α P1 isoforms	K9218-00	R&D Systems (Minneapolis, USA)	Western blot	1:1000
HNF4α P2 isoforms	H6939-00	R&D Systems	Immunohistochemistry	1:400
HNF4α	Sc-374229	Santa Cruz	Coimmunoprecipitation	5µg
PKM2	3198	Cell Signalling (Danvers, USA)	Western blot	1:1000
p-GSK3β	9336	Cell Signalling	Western blot	1:1000
γH2AX	2577	Cell Signalling	Western blot	1:1000
TP53	9282S	Cell Signalling	Western blot	1:1000
p-SAPK/JNK (T183/Y185)	9251S	Cell Signalling	Western blot	1:1000
α-SMA	A2547	Sigma-Aldrich	Immunohistochemistry	1:1000
GAPDH	2118	Cell Signalling	Western blot	1:5000
ACTIN	A2066	Sigma-Aldrich	Western blot	1:5000
goat anti-rabbit IgG HRP-linked	A0545	Sigma-Aldrich	Western blot	1:6000
goat anti-mouse IgG HRP-linked	A0168	Sigma-Aldrich	Western blot	1:6000
m-IgGκ BP-HRP	Sc-516102	Santa Cruz	Western blot	1:6000
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	A21207	Invitrogen	Immunocytochemistry	1:1000
IgG mouse	Sc-2025	Santa Cruz	Coimmunoprecipitation	5µg
IgG rabbit	Sc-2027	Santa Cruz	Coimmunoprecipitation	5µg

Supporting Table S2. SLU7 interactome

Protein AC	Description / Name
1	sp O75165 DnaJ homolog subfamily C member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJC13 PE=1 SV=5
2	sp Q92900 Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UPF1 PE=1 SV=2
3	sp P42704 Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=1 SV=3
4	sp Q04637 Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G1 PE=1 SV=4
5	sp Q9UDY2 Tight junction protein ZO-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP2 PE=1 SV=2
6	sp Q10570 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF1 PE=1 SV=2
7	sp Q08211 ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4
8	sp Q7L2E3 ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX30 PE=1 SV=1
9	sp Q9NZ18 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2
10	sp P26599 Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP1 PE=1 SV=1
11	sp P11940 Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=2
12	sp Q92499 ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX1 PE=1 SV=2
13	sp Q13310 Polyadenylate-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC4 PE=1 SV=1
14	sp P14866 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPL PE=1 SV=2
15	sp Q14152 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3A PE=1 SV=1
16	sp Q9Y6M1 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP2 PE=1 SV=2
17	sp O00425 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP3 PE=1 SV=2
18	sp Q9HCE1 Putative helicase MOV-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MOV10 PE=1 SV=2
19	sp P61978 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1
20	sp Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3
21	sp P43243 Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=2
22	sp Q96PU8 Protein quaking OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QKI PE=1 SV=1
23	sp Q07157 Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP1 PE=1 SV=3
24	sp Q8WWM7 Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATXN2L PE=1 SV=2
25	sp P17844 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1
26	sp P23246 Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2
27	sp Q92841 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2
28	sp Q13283 Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G3BP1 PE=1 SV=1
29	sp O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNCRIP PE=1 SV=2
30	sp O75643 US small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRNP200 PE=1 SV=2
31	sp P51114 Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FXR1 PE=1 SV=3
32	sp O00571 ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=3
33	sp Q9H361 Polyadenylate-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC3 PE=1 SV=2
34	sp Q9BUJ2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU1 PE=1 SV=2
35	sp P67809 Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YBX1 PE=1 SV=3
36	sp Q15233 Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4
37	sp P22626 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
38	sp Q96PK6 RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM14 PE=1 SV=2
39	sp Q8IX12 Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2
40	sp Q14444 Caprin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPRIN1 PE=1 SV=2
41	sp Q58FF7 Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB3P PE=5 SV=1
42	sp Q9FP10 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF2 PE=1 SV=2
43	sp P52272 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=3
44	sp Q96H51 Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM5 PE=1 SV=2
45	sp Q15637 Splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF1 PE=1 SV=4
46	sp Q07666 KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1
47	sp P51991 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2
48	sp Q6PKG0 La-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LARP1 PE=1 SV=2
49	sp Q7Z417 Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUFIP2 PE=1 SV=1
50	sp Q9UN86 Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G3BP2 PE=1 SV=2
51	sp P62140 Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CB PE=1 SV=3
52	sp O43390 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPR PE=1 SV=1
53	sp Q9P2E9 Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=5
54	sp Q9Y262 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3L PE=1 SV=1
55	sp P60228 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3E PE=1 SV=1
56	sp Q9Y310 tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTCB PE=1 SV=1
57	sp Q9H0D6 5'-3' exoribonuclease 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRN2 PE=1 SV=1
58	sp P49750 YLP motif-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YLPM1 PE=1 SV=4
59	sp P09651 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5
60	sp Q9NR30 Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=5
61	sp P63244 Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=3
62	sp Q13137 Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALCOCO2 PE=1 SV=1
63	sp Q9NZB2 Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM120A PE=1 SV=2
64	sp Q14694 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP10 PE=1 SV=2
65	sp Q8IY67 Ribonucleoprotein PTB-binding 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAVER1 PE=1 SV=1
66	sp P42167 Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMPO PE=1 SV=2
67	sp Q9Y2W1 Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THRAP3 PE=1 SV=2
68	sp P31943 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4
69	sp P60842 Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1

70 sp|Q07955 Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=2

71 sp|O00303 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3F PE=1 SV=1

72 sp|P36873 Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CC PE=1SV=1

73 sp|O75533 Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3

74 sp|Q9Y224 RNA transcription, translation and transport factor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTRAF PE=1 SV=1

75 sp|Q9UKF6 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF3 PE=1 SV=1

76 sp|Q14240 Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A2 PE=1 SV=2

77 sp|QB8WVV9 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPLL PE=1 SV=1

78 sp|Q9C0J8 pre-mRNA 3' end processing protein WDR33 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR33 PE=1 SV=2

79 sp|P38159 RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=3

80 sp|Q12905 Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF2 PE=1 SV=2

81 sp|A5A3E0 POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POTEF PE=1 SV=2

82 sp|B5ME19 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3CL PE=3 SV=1

83 sp|Q53EPO Fibronectin type III domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FND3B PE=1 SV=2

84 sp|Q8N684 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF7 PE=1 SV=1

85 sp|P32969 60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL9 PE=1 SV=1

86 sp|P51116 Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FXR2 PE=1 SV=2

87 sp|P26196 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX6 PE=1 SV=2

88 sp|Q9UM54 Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF19 PE=1 SV=1

89 sp|P38919 Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4

90 sp|O75534 Cold shock domain-containing protein E1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSDE1 PE=1 SV=2

91 sp|Q00839 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6

92 sp|P12956 X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=2

93 sp|Q07065 Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP4 PE=1 SV=2

94 sp|P62277 40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS13 PE=1 SV=2

95 sp|Q9NVI7 ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2

96 sp|Q15393 Splicing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B3 PE=1 SV=4

97 sp|P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF2 PE=1 SV=4

98 sp|Q16630 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF6 PE=1 SV=2

99 sp|Q6P2Q9 Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF8 PE=1 SV=2

100 sp|P0DN76 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF1L5 PE=1 SV=1

101 sp|Q13151 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1

102 sp|O43143 Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX15 PE=1 SV=2

103 sp|P11169 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC2A3 PE=1 SV=1

104 sp|Q722W4 Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZC3HAV1 PE=1 SV=3

105 sp|Q13347 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1

106 sp|Q96519 Spermatid perinuclear RNA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRBP PE=1 SV=1

107 sp|P55795 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1

108 sp|Q01844 RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EWSR1 PE=1 SV=1

109 sp|Q06787 Synaptic functional regulator FMR1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FMR1 PE=1 SV=1

110 sp|Q9NQ94 APOBEC1 complementation factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A1CF PE=1 SV=1

111 sp|O15371 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3D PE=1 SV=1

112 sp|O43432 Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G3 PE=1 SV=2

113 sp|Q96124 Far upstream element-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUBP3 PE=1 SV=2

114 sp|O95782 AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2A1 PE=1 SV=3

115 sp|O75821 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3G PE=1 SV=2

116 sp|P15880 40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2

117 sp|P51398 28S ribosomal protein S29, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DAP3 PE=1 SV=1

118 sp|P55884 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3B PE=1 SV=3

119 sp|Q15366 Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1

120 sp|Q92945 Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHSRP PE=1 SV=4

121 sp|Q00341 Vigilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=2

122 sp|P62081 40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1

123 sp|P07910 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4

124 sp|P36542 ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1C PE=1 SV=1

125 sp|O43809 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUDT21 PE=1 SV=1

126 sp|Q7L2H7 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3M PE=1 SV=1

127 sp|P62829 60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1

128 sp|Q15717 ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAVL1 PE=1 SV=2

129 sp|P35637 RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUS PE=1 SV=1

130 sp|P62491 Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB11A PE=1 SV=3

131 sp|Q9Y6C9 Mitochondrial carrier homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTCH2 PE=1 SV=1

132 sp|Q8NCA5 Protein FAM98A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM98A PE=1 SV=1

133 sp|Q6UN15 Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FIP1L1 PE=1 SV=1

134 sp|Q14498 RNA-binding protein 39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM39 PE=1 SV=2

135 sp|P10412 Histone H1.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H1E PE=1 SV=2

136 sp|Q2Q1W2 E3 ubiquitin-protein ligase TRIM71 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM71 PE=1 SV=1

137 sp|P57721 Poly(rC)-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP3 PE=2 SV=2

138 sp|P22090 40S ribosomal protein S4, Y isoform 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4Y1 PE=1 SV=2

139 sp|P09012 U1 small nuclear ribonucleoprotein A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPA PE=1 SV=3

140 sp|O15372 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3H PE=1 SV=1

141 sp|Q9BQ39 ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX50 PE=1 SV=1

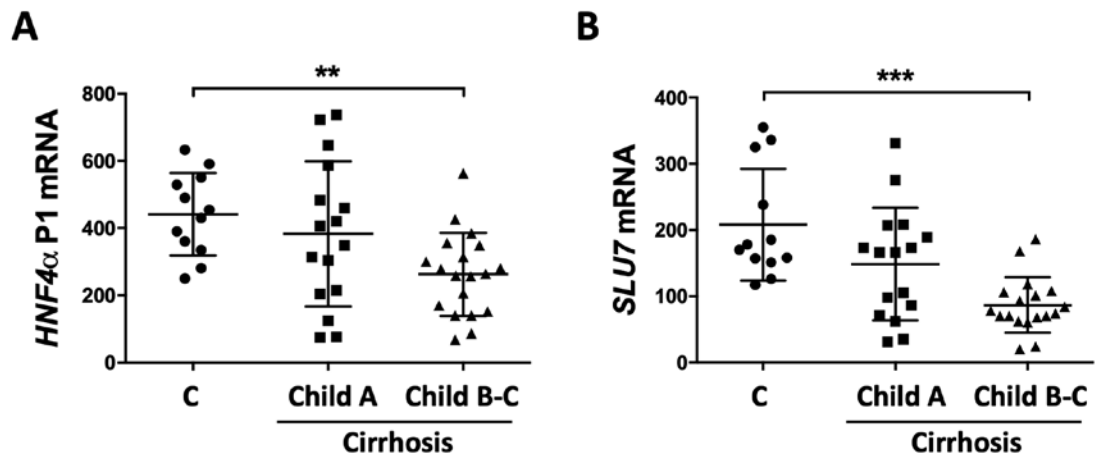
142 sp|Q12996 Cleavage stimulation factor subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSTF3 PE=1 SV=1

143 sp|Q96E39 RNA binding motif protein, X-linked-like-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMXL1 PE=1 SV=1

144 sp|Q14157 Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBAP2L PE=1 SV=2

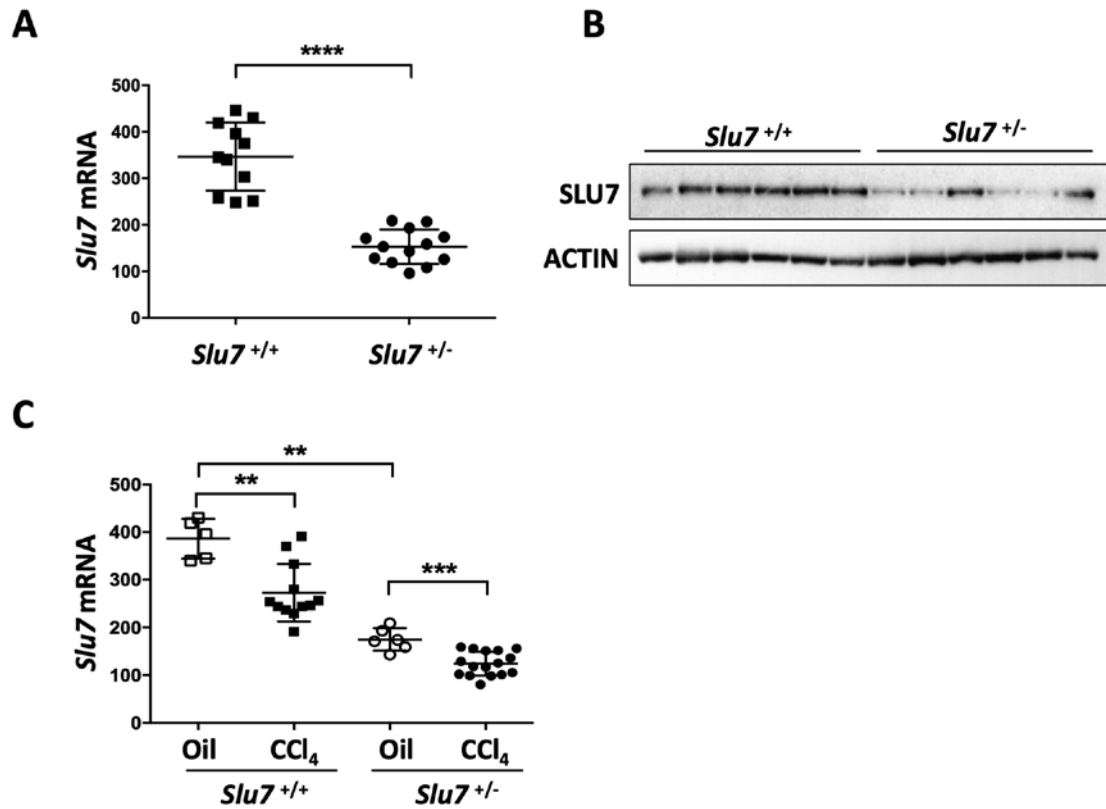
145 sp|Q9BWF3 RNA-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM4 PE=1 SV=1

## SUPPORTING FIGURES



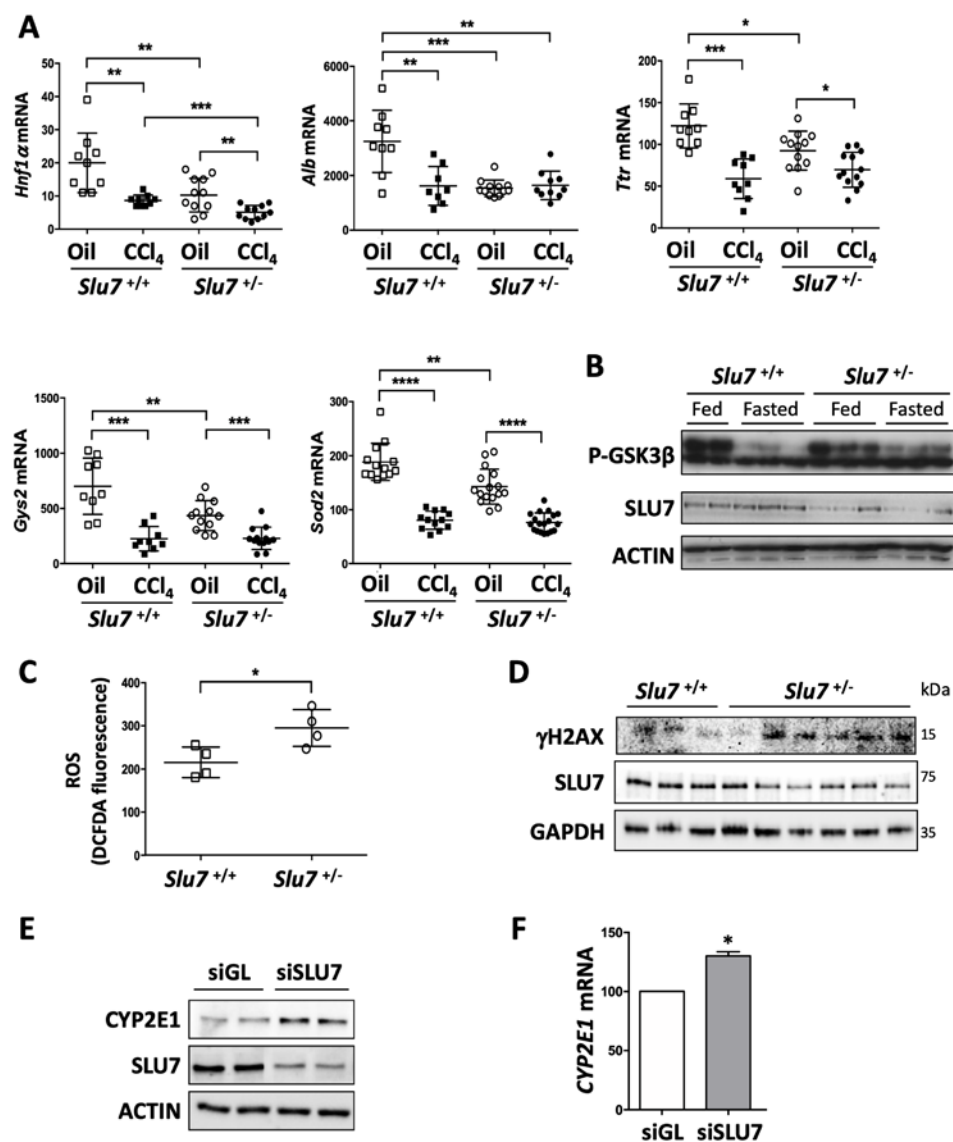
## Supporting Figure 1

**FIG. S1. A-B.** The mRNA of *HNF4 $\alpha$*  isoforms expressed from P1 promoter (**A**) and SLU7 (**B**) was analyzed by real time PCR in the liver of controls (n=12) and patients with Child-Pugh A (n=16) or Child-Pugh B-C (n=19) cirrhosis.



## Supporting Figure 2

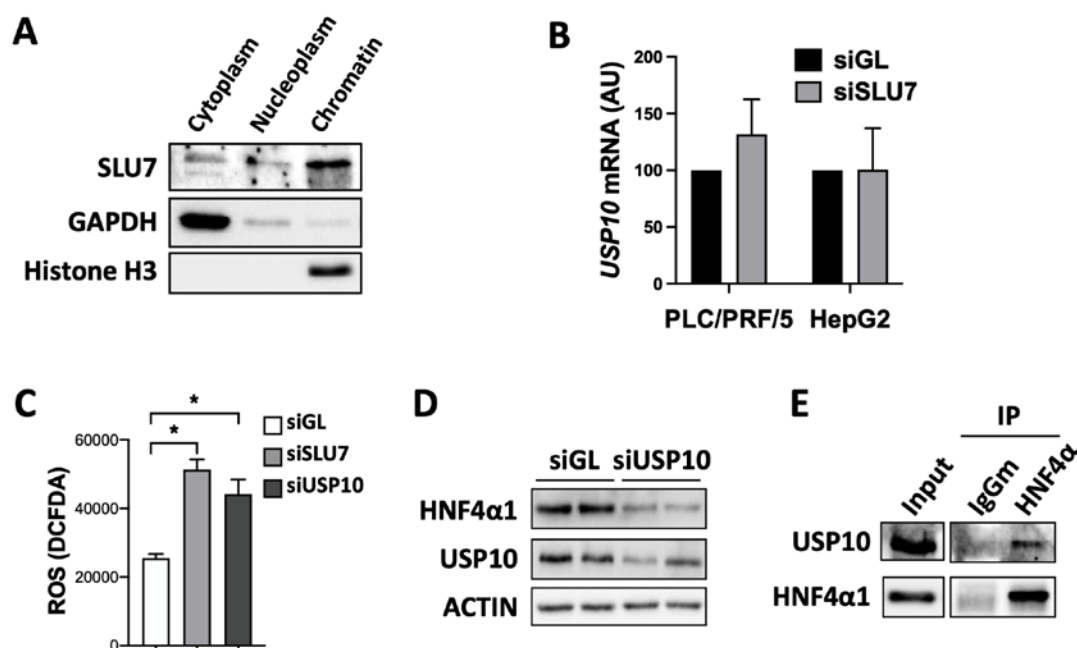
**FIG. S2. A-B.** *Slu7* mRNA (**A**) and protein (**B**) levels in the liver of *Slu7* haploinsufficient mice (*Slu7*<sup>+/-</sup>) and their control littermates (*Slu7*<sup>+/+</sup>). **C.** *Slu7* mRNA levels in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice intraperitoneally injected with vehicle (Oil) or CCl<sub>4</sub> twice a week for 6.5 weeks.



### Supporting Figure 3

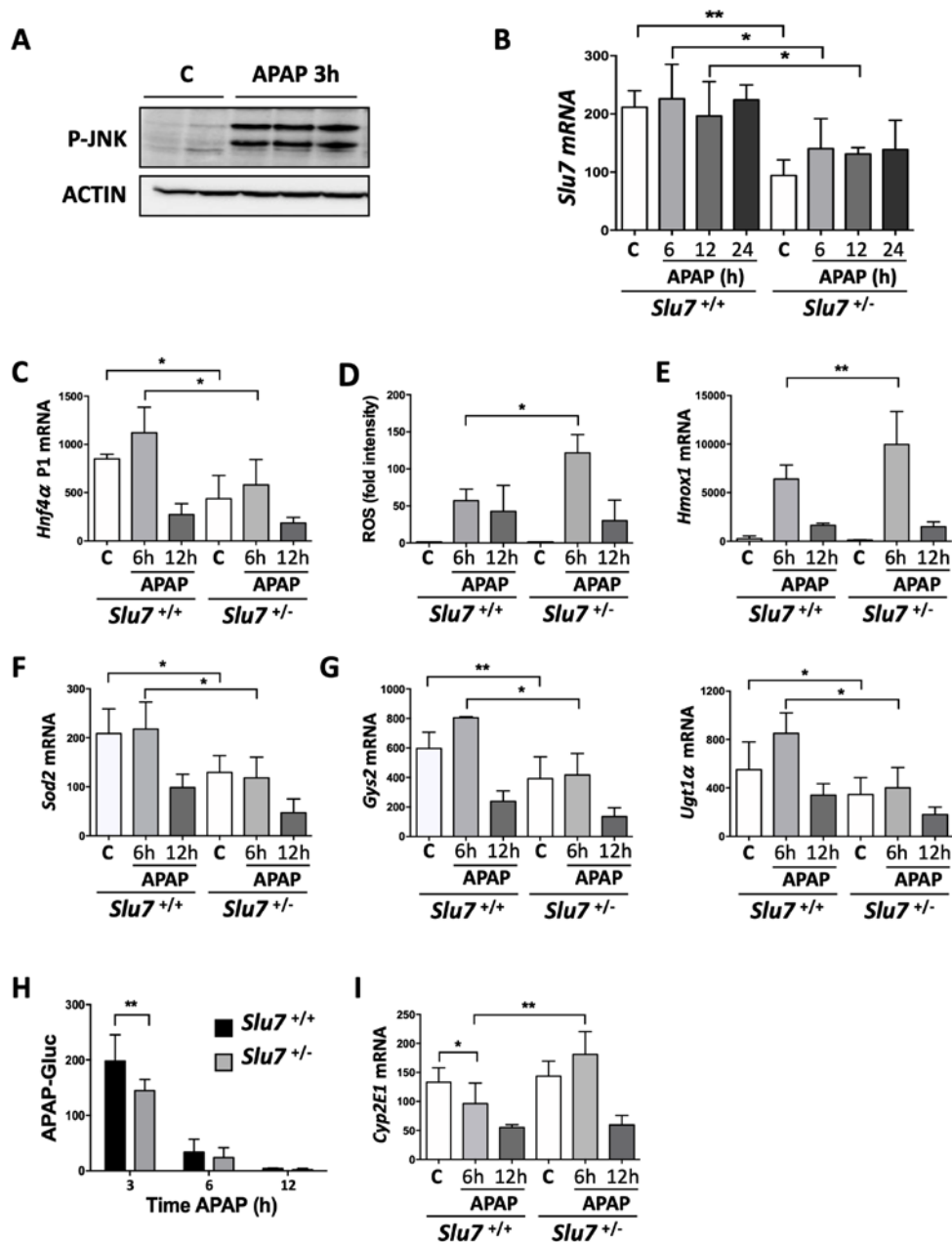
**FIG. S3. A.** RT-PCR analysis of the expression of the hepato-specific genes transcription factor *Hnf1α*, the serum proteins albumin (*Alb*) and transthyretin (*Ttr*), the enzymes glycogen synthase 2 (*Gys2*) and antioxidant superoxide dismutase 2 (*Sod2*) in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice intraperitoneally injected with vehicle (Oil) or CCl<sub>4</sub> twice a week for 6.5 weeks. Data are expressed as mean ± SEM. **B.** Western blot analysis of proteins P-GSK3β, SLU7 and ACTIN, as loading control, in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice fasted overnight or refed for 4 hours. **C.** Levels of reactive oxygen species (ROS) measured as 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescence in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. **D.** Western blot analysis of γH2AX, SLU7 and GAPDH, as loading control, in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. The samples are the same as in FIG. 3A. **E.** Western blot analysis of CYP2E1, SLU7 and ACTIN, as loading control, in HepRG cells 72 hours after transfection with siGL or siSLU7 siRNAs. **F.** RT-PCR analysis of *CYP2E1* in HepG2 cells 72 hours after transfection with siGL or siSLU7 siRNAs. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.





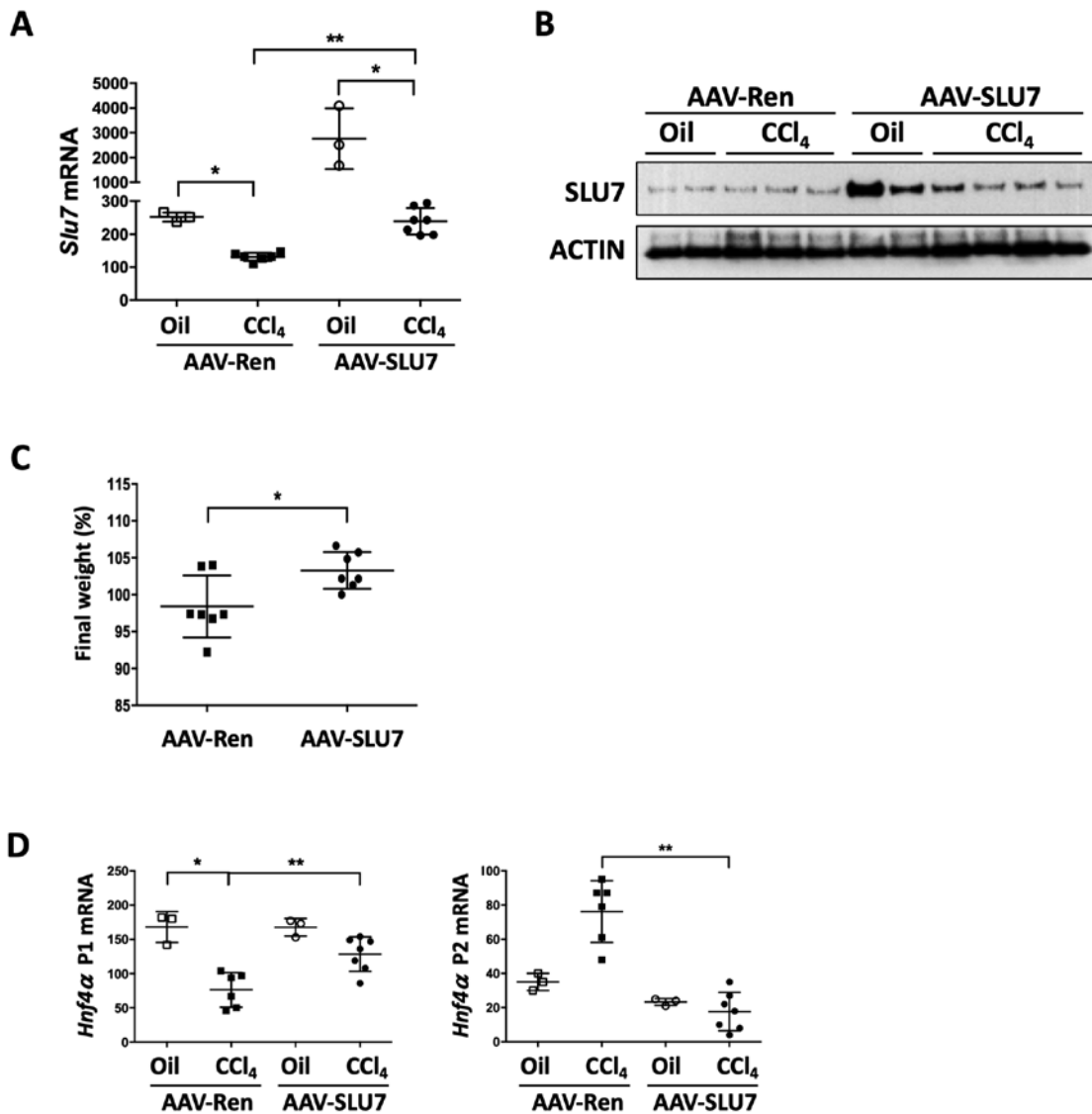
### Supporting Figure 4

**FIG. S4. A.** Western blot analysis of SLU7 expression in different cellular compartments after cell fractionating. The expression of GAPDH and histone H3 is shown as control. **B.** *USP10* mRNA levels measured by real-time PCR in PLC/PRF/5 and HepG2 cells 48 hours after transfection with control siGL or siSLU7. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed with biological duplicates. **C.** Quantification of reactive oxygen species (ROS) by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay in PLC/PRF/5 cells 48 hours after transfection with siGL, siSLU7 or siUSP10. **D.** Western blot expression of HNF4 $\alpha$ 1 in HepG2 cells 48 hours after transfection with control siGL or siUSP10. The expression of USP10 and ACTIN is shown as control. **E.** USP10 and HNF4 $\alpha$ 1 proteins in HNF4 $\alpha$ 1 immunoprecipitated (IP) from PLC/PRF/5 cells. Input and IP with control mouse (m) IgG are shown as control.



### Supporting Figure 5

**FIG. S5. A.** Western blot analysis of P-JNK expression in the liver of wild type mice 3 hours after treatment with acetaminophen (APAP). **B.** *Slu7* mRNA levels measured by real-time PCR in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice intraperitoneally injected with vehicle PBS (C) or APAP, 6, 12 or 24 hours before. **C.** mRNA levels of *Hnf4α* P1 isoforms measured by real-time PCR in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice 6 or 12 hours after APAP or vehicle (C) intraperitoneal injection. **D.** Levels of reactive oxygen species (ROS) measured as fold change in the intensity of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescence in the liver of *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice 6 or 12 hours after APAP or vehicle intraperitoneal injection referred to control mice without APAP. **E-G.** mRNA levels of *Hmox1* (**E**), *Sod2* (**F**), *Gys2* and *Ugt1α* (**G**) measured as described in C. **H.** Serum levels of APAP-glucuronide (APAP-Gluc) conjugate in APAP-treated *Slu7*<sup>+/+</sup> and *Slu7*<sup>+/-</sup> mice. **I.** *Cyp2E1* mRNA measured as described in C. Data are expressed as mean ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.



### Supporting Figure 6

**FIG. S6. A.** *Slu7* mRNA levels in the liver of wild type mice injected with a control adenoassociated virus (AAV-Ren) or an adenoassociated virus expressing SLU7 in the liver (AAV-SLU7) that 15 days later were intraperitoneally injected with vehicle (Oil) or CCl<sub>4</sub> twice a week for 6.5 weeks. **B.** SLU7 protein levels in the liver of wild type mice treated as described in A. **C.** Body weight of the AAV-Ren and AAV-SLU7 mice after the treatment with CCl<sub>4</sub> as described in A. The weight is expressed as the percentage with respect the weight recorded at the onset of CCl<sub>4</sub>-treatment. **D.** Real time PCR analysis of *Hnf4α*-P1 and *Hnf4α*-P2 isoforms expression in the samples described in A.

## REFERENCES

1. **Alvarez-Sola G, Uriarte I**, Latasa MU, Jiménez M, Barcena-Varela M, Santamaría E, et al. Engineered fibroblast growth factor 19 protects from acetaminophen-induced liver injury and stimulates aged liver regeneration in mice. *Cell Death Dis.* 2017;8:e3083.
2. **Perugorría MJ, Latasa MU**, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goñi S, et al. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology.* 2008;48:1251–1261.
3. Elizalde M, Urtasun R, Azkona M, Latasa MU, Goñi S, Garcia-Irigoyen O, et al. Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J. Clin. Invest.* 2014;124:2909–2920.
4. Young CKJ, Young MJ. Comparison of HepaRG cells following growth in proliferative and differentiated culture conditions reveals distinct bioenergetic profiles. *Cell Cycle.* 2019;18:476–499.
5. **Urtasun R, Elizalde M**, Azkona M, Latasa MU, García-Irigoyen O, Uriarte I, et al. Splicing regulator SLU7 preserves survival of hepatocellular carcinoma cells and other solid tumors via oncogenic miR-17-92 cluster expression. *Oncogene.* 2016;35:4719–4729.
6. Castillo J, Erroba E, Perugorría MJ, Santamaría M, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2006;66:6129–6138.
7. Gillotin S. Isolation of Chromatin-bound Proteins from Subcellular Fractions for Biochemical Analysis. *Bio-protocol.* 2018;8:e3035–e3035.
8. Ciordia S, Alvarez-Sola G, Rullán M, Urman JM, Avila MA, Corrales FJ. Digging deeper into bile proteome. *J Proteomics.* 2021;230:103984.
9. Nunes C, Mestre I, Marcelo A, Koppenol R, Matos CA, Nóbrega C. MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules. *Database (Oxford).* 2019;2019.
10. Youn J-Y, Dyakov BJA, Zhang J, Knight JDR, Vernon RM, Forman-Kay JD, et al. Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes. *Molecular Cell.* 2019;76:286–294.
11. Wilson ID, Dargue R, Grant I, Coen M, Nye L, Plumb R. A Quantitative UPLC-MS/MS Research Method for the Measurement of Acetaminophen and 5 Metabolites in Plasma. *Waters-Application Note.* 2019;:1–7.

Authors names in bold designate shared co-first authorship.

**ANEXO 5: Premio Fundación Lilly – Publicación  
artículo The Conversation**

---





2ª edición del Premio de divulgación

# Medicina y Salud



THE CONVERSATION

Certamen de divulgación sobre medicina y salud en idioma español para jóvenes graduados, menores de 30 años, del ámbito hispanohablante vinculados a centros de investigación o universidades.



Fuente: <https://www.fundacionlilly.com/fomento-ciencia/premios-cientificos/otrospremios>

La Fundación Lilly y The Conversation convocan por segunda vez el primer **Premio de Divulgación sobre Medicina y Salud** con el objetivo de promover y reconocer la divulgación en salud y medicina, fomentar la utilización del español como lengua para la transmisión del conocimiento científico en general y de las ciencias de la salud en particular, así como impulsar la divulgación social del conocimiento en el ámbito hispanohablante.

Reunido el jurado, resolvió proponer las siguientes candidaturas como ganadoras y finalistas de esta edición, que de acuerdo con las bases del Premio serán publicados en **The Conversation** antes de que finalice el año actual 2022.

## Primer Premio

**Luz: arquitecta de la vida** Claudia García Cobarro. Universidad de Murcia

## Segundo Premio

**Estimada inteligencia artificial, ¿podrías explicarme por qué no me han asignado el trasplante?**

Jon Rueda Echebarría. Universidad de Granada

## Finalistas

**Si alguien es un falso delgado, sus células inmunes le delatan** - Andrea Costa López. Universidad Islas Baleares

**El síndrome de Kartagener: Cuando tu vida está del revés**- Daniel Pellicer Roig. Universidad de Valencia

**Esto es lo que nos pasa cuando el hígado pierde su identidad**- María Gárate Rascón. Universidad de Navarra

**Insulina y leptina, el tira y afloja de lo que comemos** - Marina Martín y Elvira de Frutos. Universidad Rey Juan Carlos

**Todos los caminos del cerebro conducen al claustro** - Irene Echeverría Altuna. Universidad de Oxford

**Si ayunamos, las células reciclan: así funciona la autofagia** - Juan Zapata Muñoz. Universidad Autónoma Madrid

**Lo que no nos mata nos podría hacer más fuertes: terapia génica con virus** - Daniel Maeso Miguel. Universidad de Oviedo

**¿Le imprimo un corazón nuevo?** - María Pérez Araluce. Universidad de Navarra





Madrid a 27 de junio de 2022

Estimado/a candidato/a:

En primer lugar, en nombre The Conversation y la Fundación Lilly, queremos manifestarle nuestro agradecimiento por su candidatura a la convocatoria del Premio de Divulgación sobre Medicina y Salud Fundación Lilly – The Conversation 2022.

Así mismo, nos complace comunicarle que, reunido el jurado, resolvió proponer las siguientes candidaturas como ganadoras de esta edición:

**Primer Premio**

**Luz: arquitecta de la vida**

Claudia García Cobarro, Universidad de Murcia

**Segundo Premio**

**Estimada inteligencia artificial, ¿podrías explicarme por qué no me han asignado el trasplante?**

Jon Rueda Echebarría. Universidad de Granada

Además, le comunicamos que entre los artículos finalistas de esta edición se encuentra su trabajo, que de acuerdo con las bases del Premio será publicado en The Conversation antes de que finalice el 2022.

**Finalistas**

**Linfocitos y monocitos, más allá de su función inmunitaria**

Andrea Costa López, UIB

**Cuando tu vida está del revés: El síndrome de Kartagener**

Daniel Pellicer Roig, UV

**La identidad perdida del hígado**

María Gárate Rascón, Universidad de Navarra

**Insulina y leptina: un tándem necesario para nuestro cerebro**

Marina Martín y Elvira de Frutos, URJC

**Enclaustrado, interconectado y multifuncional**

Irene Echeverría Altuna, Universidad de Oxford

**La autofagia. El proceso celular del siglo XXI**

Juan Zapata Muñoz, UAM

**Lo que no te mata te hace más fuerte: de virus y terapia génica**

Daniel Maeso Miguel, Universidad de Oviedo

**¿Te imprimo un corazón? La fabricación de órganos en el laboratorio**

María Pérez Araluze, Universidad de Navarra

La entrega del **Premio de Divulgación sobre Medicina y Salud Fundación Lilly The Conversation**, tendrá lugar en Madrid en un acto organizado a tal efecto y será anunciado públicamente.



Rafael Sarralde  
Director general The Conversation



José A. Sacristán  
Director de la Fundación Lilly

Reiterándole nuestra gratitud y enhorabuena por haber quedado finalista, aprovechamos para transmitirle un saludo afectuoso.





Mi\_viri / Shutterstock

## Esto es lo que nos pasa cuando el hígado pierde su identidad

Publicado: 21 julio 2022 20:00 CEST

**María Gárate Rascón**

Investigadora predoctoral en el Programa de Hepatología del CIMA, Universidad de Navarra

Desde que en el colegio estudiábamos la asignatura de Ciencias Naturales, todos asimilamos que en el interior de nuestro cuerpo hay una serie de órganos que cumplen un abanico de funciones muy concreto. ¿Cuál es el primer ejemplo que se nos viene a la cabeza? Quizás el corazón, para bombear la sangre, o los pulmones, encargados de respirar. ¿Pero acaso algún lector ha pensado en primer lugar en el hígado? Seguramente no, a pesar de que es un órgano clave para nuestra supervivencia.

El hígado es un regulador central del metabolismo del cuerpo. En él se fabrican hormonas y factores de coagulación, se almacena energía, se producen sales biliares para digerir las grasas, se regulan los niveles de colesterol y de glucosa en sangre, se almacenan vitaminas y minerales, y se limpia la sangre de toxinas, incluidas drogas, fármacos u otras sustancias nocivas.

### Las células se especializan

Nuestro cuerpo está compuesto por aproximadamente 30 billones de células, que se agrupan de manera organizada en tejidos y posteriormente en órganos. Las células que componen cada órgano están especializadas en realizar una serie de tareas muy concretas.

Para más inri, en cada órgano existen diversos tipos de células con funciones distintas aunque un objetivo común. Lo suyo sí que es trabajo en equipo.

Así, por ejemplo, en el cerebro encontramos mayoritariamente neuronas y astrocitos, en el corazón cardiomiocitos, en la piel queratinocitos y melanocitos, y en el hígado encontramos hepatocitos y colangiocitos.

Aunque todas las células de nuestro cuerpo contienen una copia exacta de los mismos genes, unas células utilizan unos genes y otras otros.

Para entenderlo mejor, pensemos en el material genético como un almacén de herramientas de bricolaje y en los genes como cada una de estas herramientas. Los diferentes *gremios* de obra portan una caja de herramientas con el material que necesitan para realizar su función. Es más, esas herramientas les identifican. De este modo, la caja de herramientas de un fontanero será distinta de la de un carpintero, a su vez diferente de la de un electricista.

En el organismo, entre todo el conjunto de genes (el mismo *almacén común*), cada célula se especializa utilizando genes concretos (su *caja de herramientas*), que la diferencian del resto. Lo que en la vida laboral llamamos especialización profesional, en biología lo denominamos diferenciación celular.

## **El encargado de almacén del hígado**

En su mayoría, los genes sirven para fabricar las proteínas que las células utilizan para realizar sus funciones. Además, algunas de estas proteínas deciden qué genes pasan y cuáles no a proteína.

En el hígado, por ejemplo, hay una proteína que actúa de esta manera que se llama HNF4 $\alpha$ . De ella depende qué genes implicados en las diferentes funciones que realiza el hígado se utilizan, otorgando, por tanto, identidad a los hepatocitos.

Es una regulación jerárquica y, siguiendo el símil anterior, HNF4 $\alpha$  sería el *encargado del almacén*, la persona que reparte las herramientas según las tareas que se vayan a realizar.

## **¿Cuándo pierde el hígado esta identidad?**

El hígado puede dañarse por diferentes motivos. De manera aguda por una intoxicación por fármacos, alcohol o toxinas. De manera crónica cuando alguna de estas agresiones en dosis más moderada persiste en el tiempo, o cuando se acumula excesiva grasa o se producen infecciones por los virus de la hepatitis B y C, por ejemplo.

En estas situaciones, muchos hepatocitos mueren y el resto pierden la capacidad de realizar sus funciones porque han perdido su identidad, se *desdiferencian*. Es cuando los pacientes comienzan a manifestar los síntomas de la enfermedad.

¿Cómo ocurre esto? Nuestro grupo de investigación ha identificado que la proteína denominada SLU7 se encuentra disminuida en el hígado de pacientes. Además, demostramos que SLU7 es esencial en el hígado sano para mantener sus funciones, controlando la utilización de otros muchos genes.

Más recientemente hemos demostrado que SLU7 es el equivalente al *gerente del almacén* de herramientas de bricolaje. Desde su nivel superior en la jerarquía, SLU7 es necesaria para que HNF4α permanezca en los hepatocitos, preservando su función e identidad.

Para que lo entendamos, si el jefe se pone enfermo repentinamente y no acude al trabajo, es decir, disminuye la cantidad de SLU7, el resto de los trabajadores se descoloca y no sabe qué hacer.

En resumen, la función e identidad de nuestras células depende de la correcta utilización de la información contenida en nuestros genes. En determinadas circunstancias, esta identidad se pierde y, como resultado, enfermamos.

Como investigadores pretendemos identificar qué genes o proteínas están fallando para, cuando eso suceda, devolver lo antes posible al hígado su identidad perdida.

---

*Este artículo fue finalista en la II edición del certamen de divulgación joven organizado por la Fundación Lilly y The Conversation España.*

---



# THE CONVERSATION

A fecha de 26 de agosto de 2022, el artículo “Esto es lo que nos pasa cuando el hígado pierde su identidad” publicado en The Conversation (<https://theconversation.com/esto-es-lo-que-nos-pasa-cuando-el-higado-pierde-su-identidad-187443>) ha superado las 39.000 lecturas, más de 52% de ellas de procedencia internacional, sobre todo de países latinoamericanos como Venezuela, Ecuador y la comunidad hispanohablante de EEUU.

Además, el artículo ha sido republicado en otros medios digitales nacionales e internacionales, entre los que, por ejemplo, se encuentran:

- El Español: [https://www.elespanol.com/ciencia/nutricion/20220728/higado-pierde-identidad-factores-danan-organo-vital/689681316\\_0.html](https://www.elespanol.com/ciencia/nutricion/20220728/higado-pierde-identidad-factores-danan-organo-vital/689681316_0.html)
- Diario de Navarra: <https://www.diariodenavarra.es/noticias/vivir/ciencia/2022/07/22/esto-pasa-el-higado-pierde-identidad-535664-3241.html>
- Grupo 24 horas: <https://bilbao24horas.com/esto-es-lo-que-nos-pasa-cuando-el-higado-pierde-su-identidad/>
- El Obrero: <https://elobrero.es/medicina-salud/91638-esto-es-lo-que-nos-pasa-cuando-el-higado-pierde-su-identidad.html>
- Medicina y Salud: <https://medicinaysalud.info/el-higado/hepatologia/>
- Revista Semana (Colombia): <https://www.semana.com/vida-moderna/articulo/las-consecuencias-para-una-persona-cuando-el-higado-pierde-su-identidad/202246/>
- Viajes 24 horas: <https://www.viajes24horas.com/esto-es-lo-que-nos-pasa-cuando-el-higado-pierde-su-identidad/>
- The Cartagena Post (Colombia): <http://thecartagenapost.com/esto-es-lo-que-nos-pasa-cuando-el-higado-pierde-su-identidad/>

