



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**REGULACIÓN DEL SPLICING ALTERNATIVO DE LA  
SURVIVINA DEX3**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**FRANCISCO JAVIER GAYTÁN CERVANTES**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA**

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DRA. ROSA NAVARRO GONZÁLEZ**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Ciudad Universitaria, CDMX, Octubre 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Genómica Funcional del Cáncer” bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla, en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Medicina Genómica**

# INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	i
1.1. Abstract.....	ii
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2.1. Apoptosis.....	1
2.2. Proteínas inhibidoras de la apoptosis.....	4
2.3. Survivina.....	5
2.4. Survivina y sus isoformas.....	9
2.5. Survivina DEx3.....	11
2.6. Splicing Alternativo.....	13
2.7. Proteínas Sr y hnRNPs.....	17
2.8. Sam68.....	23
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1. General.....	26
4.2. Específicos.....	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
5.1. Diseño y construcción del minigen.....	27
5.2. Transformación y análisis de clonas.....	29
5.3. Deleciones y mutaciones en el minigen.....	29
5.4. Cultivo celular.....	31
5.5. Transfección transitoria.....	31
5.6. Extracción de ARN total.....	31
5.7. Síntesis de ADN complementario (RT-PCR).....	32
5.8. Reacción en cadena de la polimerasa semi-cuantitativo (PCR) y pcr en tiempo real (qPCR).....	32
5.9. Análisis computacional o bioinformático de element <i>cis</i> y <i>trans</i> .....	33
5.10. Western Blot.....	34
5.11. Pull Down de ARN.....	35
5.12. ARN de interferencia para elementos en <i>trans</i> .....	36
5.13. Sobreexpresión de Sam68.....	37
5.14. CRISPR/Cas.....	37
5.15. Análisis densitométrico.....	38
5.16. Análisis estadístico.....	38
<b>6. RESULTADOS</b> .....	39
6.1. Construcción del minigen.....	39
6.2. Expresión del minigen en células HeLa.....	41
6.3. Análisis bioinformático.....	44
6.4. Determinación de los elementos <i>cis</i> intrónicos.....	47

6.5. Determinación de los elementos <i>cis</i> exónicos .....	50
6.6. Mutaciones en los elementos <i>cis</i> exónicos que afectan el splicing alternativo del exón 3.....	52
6.7. Identificación de los elementos <i>trans</i> que regulan el splicing alternativo del exón 3 de la survivina .....	56
6.8. Sam68 como potencial regulador del splicing alternativo de la survivina DEx3 endógena .....	61
6.9. Efecto fisiológico de la mutación del sitio consenso de sam68.....	66
<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
Anexo 1. Abreviaturas .....	82
Anexo 2. Tabla de oligos utilizados .....	83
Anexo 3. Artículo .....	85

# 1. RESUMEN

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada, la cual es importante para la homeostasis tisular de cualquier organismo. Una de las familias involucradas en la regulación de este mecanismo, es la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (por sus siglas en inglés IAPs) dentro de los cuales uno de sus miembros es la survivina. Se sabe bien que el gen de survivina posee una estructura de 4 intrones y 4 exones; se ha reportado que genera 6 isoformas a partir del splicing alternativo, dentro de las cuales está la survivina DEx3. Esta isoforma es generada por la pérdida del exón 3, lo que genera un nuevo carboxilo terminal, donde se reporta radica su función anti-apoptótica. La survivina DEx3 es expresada en diversos tipos de cáncer como lo son cáncer de mama y cáncer cervicouterino, por lo que entender el mecanismo que regula el splicing alternativo es de suma importancia.

Para analizar la regulación del splicing de la survivina DEx3, se diseñó un minigén (M) que contiene los elementos mínimos necesarios para llevar a cabo el mecanismo de splicing alternativo. Se realizó una serie de deleciones y mutaciones en los elementos *cis* localizados en el exón 3, así como en los intrones río arriba y abajo del exón. Se determinó que los primeros 22pb del exón 3 contienen elementos *cis* regulatorios que modulan el splicing alternativo de esta isoforma. Además, usando ensayos de pulldown se observó que la proteína sam68 es un posible factor *trans* que se une a esta región y regula el splicing del exón 3. Este resultado fue corroborado al mutar el sitio de unión para sam68 con el sistema CRISPR/Cas en la línea celular HeLa. En conclusión el presente trabajo proporciona las primeras evidencias sobre la regulación del splicing alternativo del ARNm de la survivina DEx3.

## 1.1 Abstract

Messenger RNA alternative splicing (AS) regulates the expression of a variety of genes involved in both physiological and pathological processes. AS of the antiapoptotic and proliferation-associated survivin (BIRC5) gene generates six isoforms, which regulate key aspects of cancer initiation and progression. One of the isoforms is survivin DEx3, in which the exclusion of exon 3 generates a unique carboxyl terminus with specific antiapoptotic functions. This isoform is highly expressed in advanced stages of breast and cervical tumours. Therefore, understanding the mechanisms that regulate survivin DEx3 mRNA AS is clearly important. To this end, we designed a minigene (M), and in combination with a series of deletions and site-directed mutations, we determined that the first 22 bp of exon 3 contain *cis*-acting elements that enhance the exclusion of exon 3 to generate the survivin DEx3 mRNA isoform. Furthermore, using pull-down assays, we discovered that Sam68 is a possible *trans*-acting factor that binds to this region and regulates exon 3 splicing. This result was corroborated using a cell line in which the Sam68 binding site in the survivin gene was mutated with the Crispr/Cas system. This work provides the first clues regarding the regulation of survivin DEx3 mRNA splicing.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada, el cual es esencial para el desarrollo de un organismo, ya que mantiene la homeostasis tisular al mantener un balance entre las células que mueren y las que proliferan(1,2). Se ha observado que este mecanismo de muerte celular es finamente regulado por un balance entre factores proapoptóticos y antiapoptóticos, por lo que una alteración en este balance puede ser causa de diversas patologías, como ejemplo claro el cáncer(3).

La apoptosis se caracteriza por tener dos vías principales, la vía intrínseca y la vía extrínseca, ambas vías son reguladas por miembros de una familia de proteasas de cisteínas conocidas como caspasas; las caspasas 1,2,9,8,7 y 3 usualmente son las que participan en estas procesos(4).

La activación de ambas vías es dada por diversos estímulos; por ejemplo la vía extrínseca o también conocida como de receptores de muerte puede ser activada por TNF-alfa que al unirse y activar a su receptor, desencadena la activación de la caspasa 8, a través de la formación del complejo de muerte que se integra por ligando-receptor para activar a la caspasa 8 que a su vez activará caspasa 3 para su interacción con sus respectivos sustratos(2).

Por otro lado la vía intrínseca, se ha observado que puede ser activada por radiación UV o rayos X, este tipo de estímulos ocasiona una despolarización y permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que conlleva a la liberación de citocromo C desencadenando así la activación de la caspasa 9 y posteriormente la activación de la caspasa 3(4). (Figura 1)

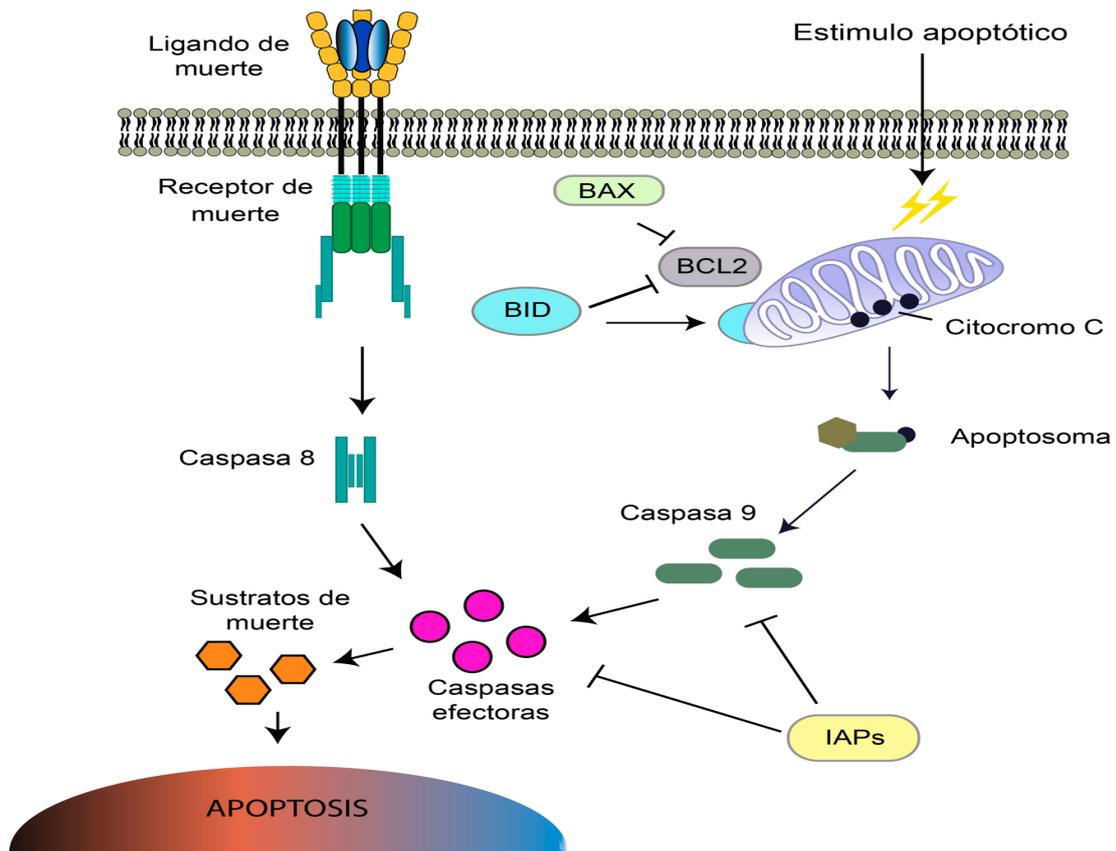


Figura 1. Esquema de las vías extrínseca e intrínseca que regulan el proceso de apoptosis.

Este mecanismo es finamente regulado por factores que promueven la muerte celular, conocidos como factores proapoptóticos dentro de los cuales destacan algunos miembros de la familia de BCL-2 como lo son BAX y BAK, proteínas que ayudan a permeabilizar la membrana mitocondrial lo que conlleva a la liberación de citocromo C, promoviendo la activación de la vía de las caspasas desencadenando así la muerte celular(5).

Por otro lado tenemos a los factores antiapoptóticos que regulan de forma negativa la apoptosis; dentro de estos factores se encuentran algunos miembros de la familia de Bcl-2 que han sido ampliamente estudiados en su papel inhibitorio de la apoptosis, dentro de los cuales se han identificado las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1(6,7). Además de los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, también se encuentra la familia de las proteínas inhibitoras de la apoptosis también conocidas como IAPs (por sus siglas en inglés Inhibitor of Apoptosis Protein) (8). Este grupo de proteínas se caracteriza por poseer de uno a tres dominios BIR localizados en la región Amino-terminal,

dominio que se ha reportado que interactúa con las caspasas. Las IAPs además posee un dominio RING localizado en la región Carboxilo-terminal, este dominio posee actividad de ligasa para ubiquitina; además poseen un dominio CARD y un dominio UBA, estos dos últimos dominios no los poseen todas las IAP solo algunos miembros de la familia. Esta familia consta de 8 miembros en humanos: Apollon, CIAP-1, CIAP-2, ILP-2, NAIP, XIAP, ML-IAP, y Survivina. Se ha reportado que algunas de estas proteínas regulan las formas activas de las caspasas que son las principales efectoras del proceso apoptótico(9,10). (Figura 2)

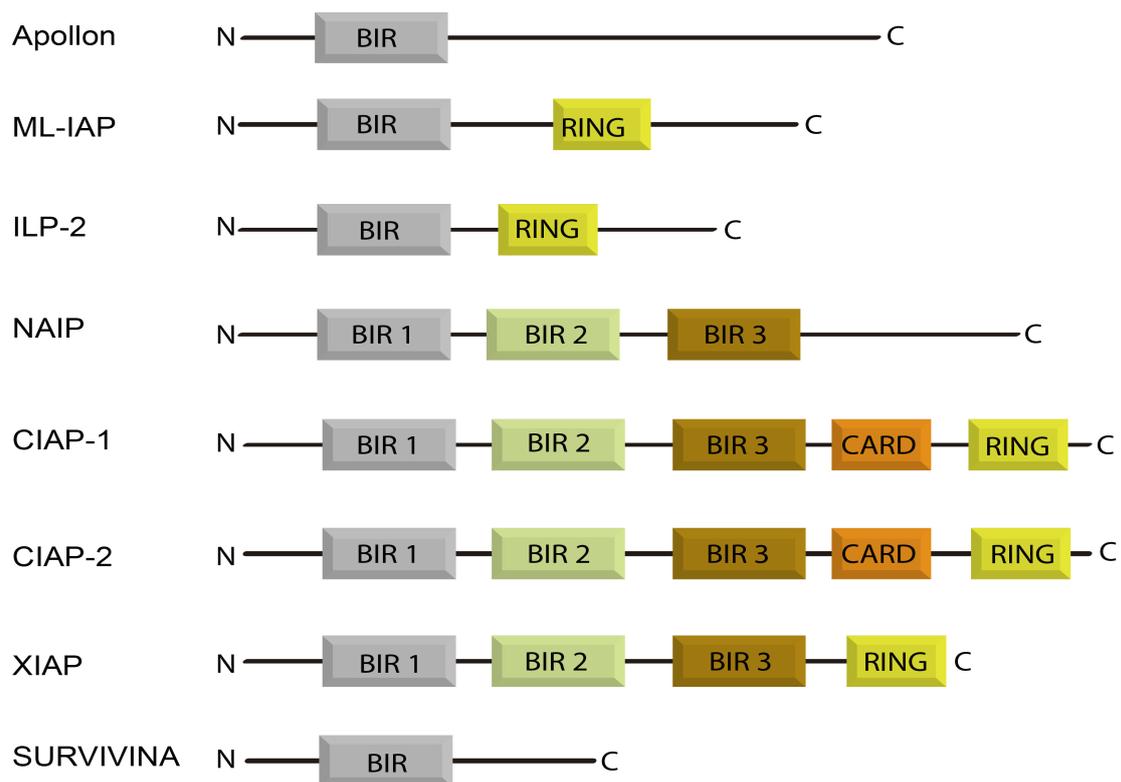


Figura 2. Esquema de los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs por sus siglas en ingles). El dominio BIR se representa con cuadros grises, verdes y cafés, en los cuadro amarillos el dominio RING, y en los cuadros naranja el dominio CARD, N corresponde al dominio Amino terminal y C al carboxilo terminal.

## **2.2 Proteínas inhibidoras de la apoptosis.**

La familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis fue descrita inicialmente en baculovirus, y posteriormente se encontraron a sus homólogos en mamíferos.(11)

La estructura y función de cada miembro es diferente, aunque de manera general comparte ciertos dominios como son el dominio BIR, el cual puede contener de 1 a 3 dominios, el dominio CARD y el dominio RING.(12)

Brevemente, el dominio BIR es una característica fundamental para los miembros de esta familia, presenta una longitud aproximada de 70 aminoácidos aunque puede variar dependiendo de la proteína. Este dominio se ha caracterizado por darle su función antiapoptótica a los miembros de esta familia, ya que se ha reportado que a través de este dominio pueden interactuar con las caspasas, que son estas últimas las encargadas de llevar a cabo el proceso de apoptosis. Un ejemplo claro es la interacción entre la proteína XIAP y la caspasa 9. (12)

El dominio CARD se encarga de favorecer la interacción proteína-proteína a fin de formar homodímeros o en su caso heterodímeros entre miembros de la misma familia. El dominio RING presenta actividad de ligasa de ubiquitina, lo que unirá a la proteína de ubiquitina con la proteína blanco con el fin de marcarla para su posterior degradación. (13)

Entre los miembros más estudiados de esta familia se encuentran las proteínas CIAP 1 y 2, caracterizadas por contener 3 dominios BIR. Se ha reportado que estas proteínas pueden regular el proceso de apoptosis mediante la unión a las caspasas 8 y 9. Aunado a esto, CIAP 1 y 2 poseen un papel activo en otras vías como son la vía de NF $\kappa$ B o la vía de la MAP cinasas. (11,14)

Otro ejemplo es la proteína NIAP, también conocida como proteína inhibidora de la apoptosis neuronal. Se ha reportado que esta proteína inhibe la apoptosis en las neuronas motoras, además de que puede tener interacción con las caspasa 3, 7 y 9 que son importantes en el proceso de la cascada de apoptosis. (12)

ML-IAP es una proteína que se expresa en tejido embrionario y al igual que algunas de las proteínas inhibidoras se sobre expresa en diversos tipos de

cáncer. Se ha asociado a la inhibición de la apoptosis, ya que puede unirse a la pro-caspasa 3 y 7. (12)

Dentro de esta familia se encuentra la survivina, también conocida como *BIRC5*. Esta proteína con características antiapoptóticas juega un papel muy importante en la regulación de la apoptosis, así como en la mitosis.

### 2.3 Survivina

La necesidad de encontrar nuevos blancos moleculares en el cáncer aún sigue siendo un tema de suma importancia en la lucha contra esta enfermedad. Se han propuestos diferentes blancos dentro de los cuales destaca la survivina (Figura 3). Este gen ha ganado una importancia como blanco terapéutico en cáncer debido a su participación en la inhibición de la apoptosis así como en la regulación del ciclo celular.

El gen de la survivina fue clonado por Ambrosi en 1998, se localiza en el cromosoma 17, codifica una proteína de 144 aminoácidos y pesa 16.5 kD (15,16). La estructura de esta proteína es muy similar a la de los miembros de las IAPs. Es el miembro más pequeño de esta familia, cuenta con un solo dominio BIR que contiene un dedo de zinc, un dominio de dimerización (DD), un dominio carboxilo terminal el cual le permite tener una interacción proteína-proteína, así como un dominio de exporte nuclear. La survivina se encuentra de forma estable formando homodímeros, esto dado por la interacción de las regiones amino terminal (17).



Figura 3. Esquema de la proteína survivina. Posee dos dominios DD que corresponde al dominio de formación de dímeros, un dominio BIR, y el dominio PDB/NE este dominio tiene una función dual ya que le confiere la característica de unirse a microtúbulos además de ser una marca de exporte nuclear

Se ha reportado que la survivina participa en la inhibición tanto de la vía extrínseca como de la vía intrínseca de la apoptosis. Esto se ha observado en líneas celulares y en algunos modelos animales (18,19).

La survivina se ha co-inmunoprecipitado con caspasa 3, 7 y 9, por lo cual la survivina puede ser considerada un inhibidor de caspasas (20). Aunque en este punto hay reportes contradictorios en cuanto a la función de la survivina y su interacción directa con caspasas. Se ha reportado que debido a la carencia del dominio CARD, (dominio esencial para la unión a caspasas) survivina no puede unirse a ellas, por lo cual necesita intermediarios para poder realizar su acción. Un ejemplo de esto es la formación del heterodímero survivina:XIAP, esto potencia la estabilidad de la proteína XIAP lo que favorece su interacción con caspasa 9, y evita la interacción con SMAC/DIABLO (proteína proapoptótica) el cual es un inhibidor de XIAP. También se ha reportado una interacción de la survivina con HBXP esto con el fin de interactuar también con caspasa 9 y así evitar la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (8,21). Además se ha observado una interacción de la survivina y SMAC/DIABLO la cual previene la inhibición de las caspasas por las IAPs (Figura 4).(22)

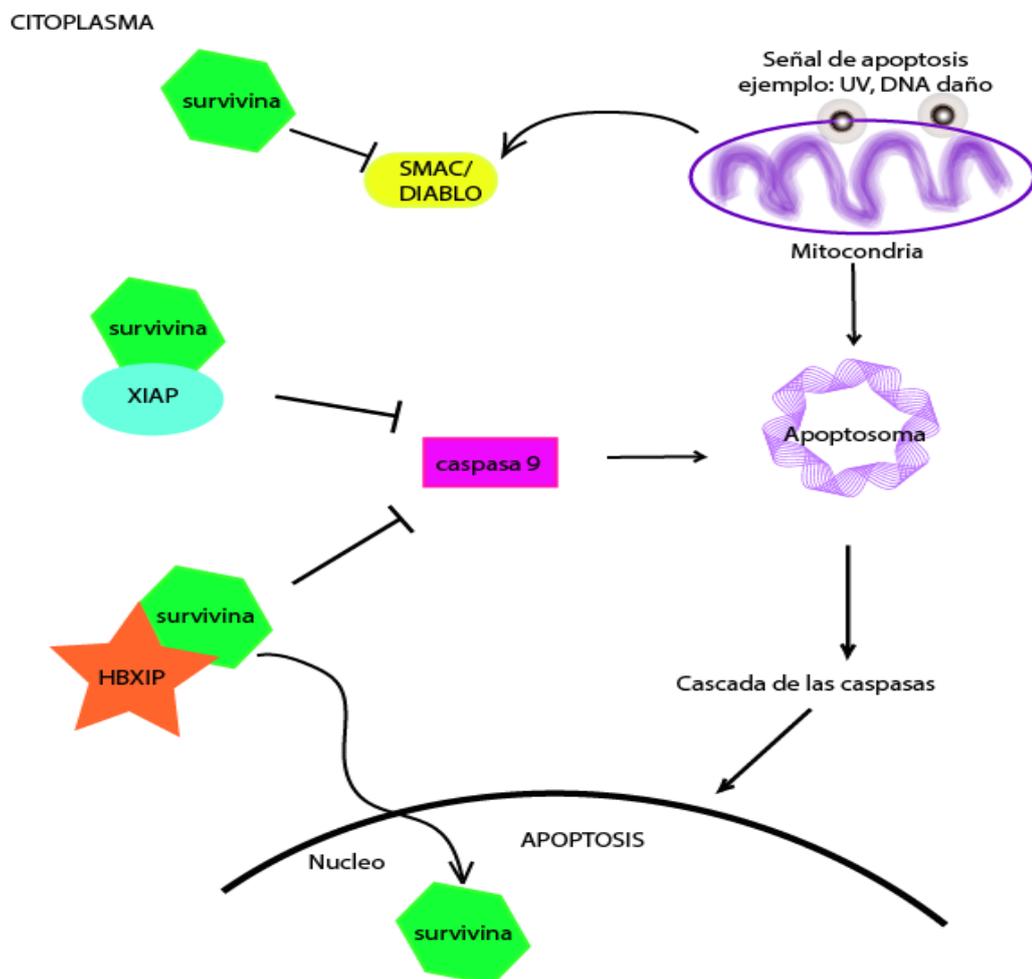


Figura 4. Esquema representativo de la función de survivina en la vía de la apoptosis y su interacción con diversas proteínas a fin de inhibir el proceso apoptótico.

Además de la inhibición de la apoptosis, survivina tiene un papel fundamental en el proceso de mitosis. Se ha observado que la expresión de survivina es finamente regulada, teniendo un pico de expresión en la fase G2/M y una rápida disminución en la fase G1(23). Durante la mitosis esta proteína se localiza en el huso mitótico, donde interactúa con tubulina. Survivina también se acumula en los centrómeros en la fase G2; posterior a esto comienza a difundirse a los brazos cromosómicos, también se hace abundante en los centrómeros interiores de la profase y metafase en la mitosis. Adicionalmente, la survivina es un componente muy importante del complejo pasajero cromosomal (CPC), el cual se conforma de, INCENP, Borealina y la cinasa Aurora B. INCENP sirve como estabilizador de todo el complejo, mientras que Borealina promueve la unión de survivina al complejo pasajero cromosomal.

El CPC tiene un papel importante en diferentes procesos de la mitosis, facilita la correcta alineación de los centrómeros en la metafase, facilita la correcta unión de los microtúbulos con los cromosomas(24,25). (Figura 5)

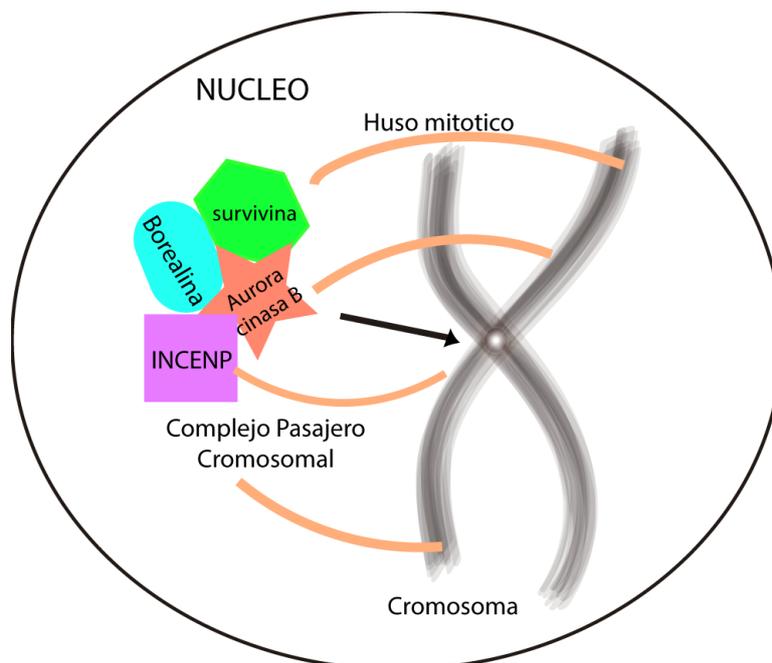


Figura 5. Esquema de la participación de la survivina en el proceso de mitosis, y su interacción en el complejo pasajero cromosomal.

Debido a su importancia en diferentes procesos, como se menciona anteriormente, la survivina es regulada tanto a nivel transcripcional como

postranscripcional; por ejemplo puede ser regulada por una amplia variedad de micro ARNs (26), además de diferentes cinasas de tirosina como son EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal), Her2 (factor de crecimiento epidermal 2) , IGF 1(factor de crecimiento de tipo insulina 1)(27,28) . Además de la vía de la apoptosis survivina participa en diferentes vías de señalización como son las vías de PI3K/AK3, MEK/MAPK, mTOR, STAT3 y HIF-1 (29,30).

Los niveles de expresión de survivina son de suma importancia para el desarrollo del cáncer, ya que esta se expresa en etapas embrionarias, pero es indetectable en tejidos adultos normales. Sin embargo la sobre expresión de survivina ha sido reportada en diversos tipos de cáncer, como lo son cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de mama, estomago, hígado, ovarios y algunos cánceres hematológicos(31), por eso la importancia de la survivina como un posible marcador diagnóstico o pronóstico.

Debido a su participación en la agresividad y en la resistencia tumoral, se han buscado diferentes estrategias terapéuticas con la finalidad de modular la expresión de la survivina . Por ejemplo, se han desarrollado inhibidores de la transcripción de survivina incluyendo oligonucléotidos antisentido, ribozimas y siRNAs, así como también inhibidores de survivina a nivel post-transcripcional.

(Figura 6)

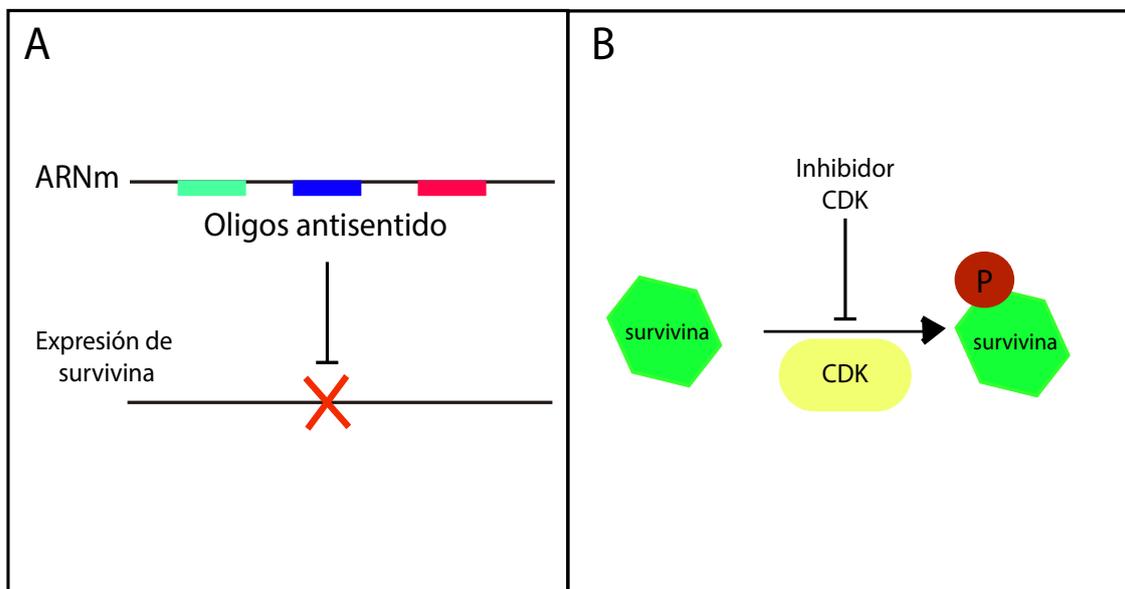


Figura 6. Tipos de terapias dirigidas a survivina. A) terapia con oligos antisentido, B) inhibición de la fosforilación de la survivina. “P” representa la marca de fosforilación , CDK (ciclina dependiente de cinasas o por sus siglas en ingles cyclin-dependent kinases

## 2.4. Survivina y sus isoformas.

El gen de survivina consta de 4 exones y 3 intrones, y debido al proceso de splicing alternativo puede generar 6 isoformas con características similares o antagónicas entre sí. (Figura 7)

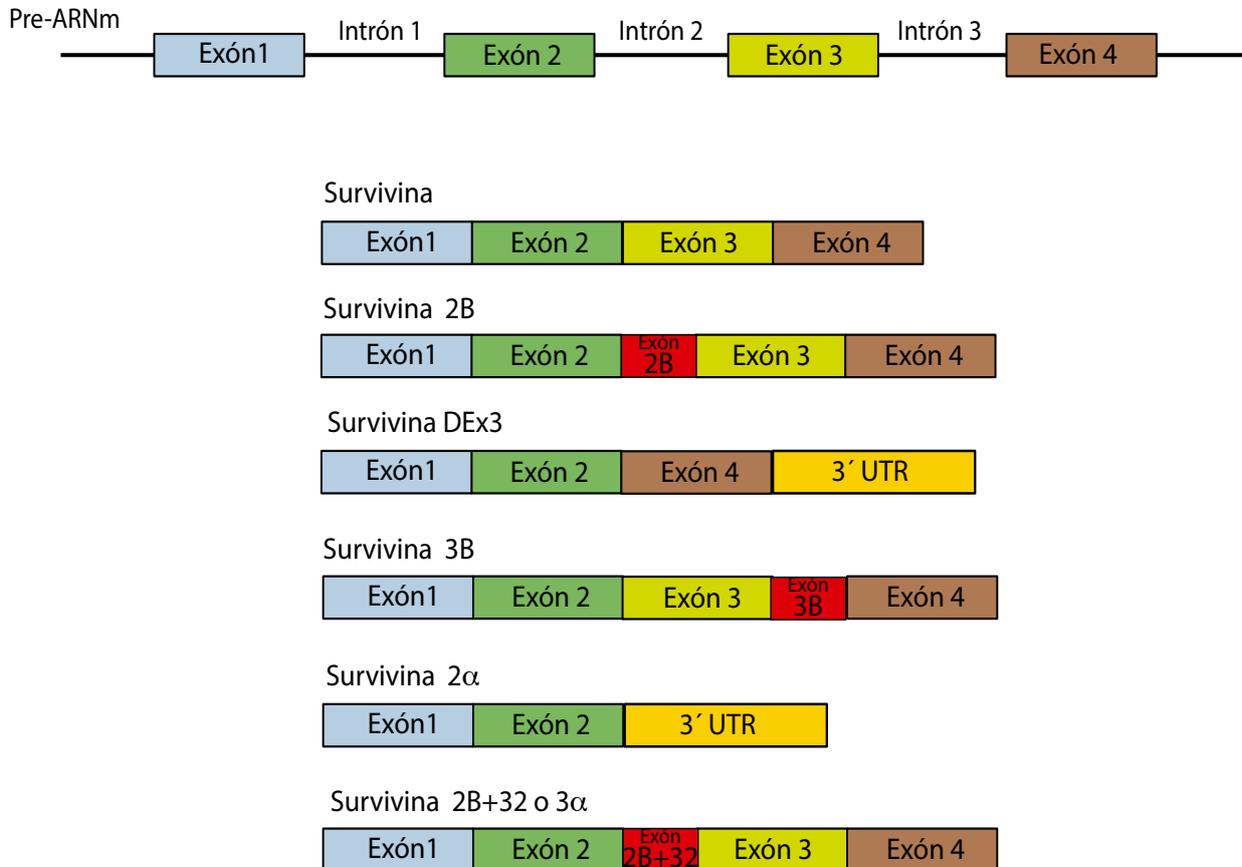


Figura 7. Esquema de las 6 isoformas generadas por splicing alternativo del pre-ARNm de survivina.

Estructuralmente se han caracterizado a las isoformas de survivina como a continuación se mencionan, la survivina tipo posee 4 exones, la survivina 2B que retiene parte del intrón 2, incorporando el exón 2B, la survivina DEx3 (survivina Delta Exón3) que pierde el exón 3 e incorpora la región 3'UTR, la survivina 3B que incorpora parte del intrón y genera el exón 3B, la survivina 2 $\alpha$  que pierde los exones 3 y 4 e incorpora la región 3 UTR y finalmente la survivina 2B+32 que incorpora 32 pares de bases anexos al exón 2B.(32,33)

Las variantes de la survivina presentan diferente localización intracelular, lo que se relaciona con el posible papel que pueden tener en la regulación del mecanismo de apoptosis. Se ha reportado que la co-expresión de la survivina con alguna de sus otras variantes les permite interactuar formando heterodímeros; esta interacción proteína-proteína se ha reportado que puede estar involucrada en una nueva localización intracelular de la survivina y con esto tener diferentes funciones en el papel tumorigénico. (34)

Las características funcionales de cada isoforma varían dependiendo de su estructura, ya que la ganancia o pérdida de dominios les confiere un papel dentro del proceso apoptótico o tumorigénico.

La survivina 2B genera una proteína de 18.6kD y posee 165 aminoácidos, se ha observado que esta isoforma posee una función proapoptótica esto podría ser debido a que posee un dominio BIR trunco. Su localización es preferencialmente citoplasmática, aunque también una parte de esta puede localizarse en núcleo. Se ha reportado que esta isoforma puede formar heterodímeros con la survivina; consistente con lo anterior una sobre expresión de esta isoforma en la línea celular de cáncer de pulmón A549, disminuye el crecimiento celular e induce la muerte celular. (35)

La survivina 3B fue descrita por primera vez en el año 2004 por Bradan y colaboradores, posee 120 aminoácidos y tiene una función antiapoptótica, se sugiere que esta característica es dada debido a que posee el dominio BIR completo. Se ha reportado una elevada expresión de esta isoforma en líneas celulares de cáncer de mama por lo cual se le atribuye un papel en el proceso carcinogénico; por otra parte estudios han demostrado que la inhibición de esta isoforma conlleva a una disminución de la masa tumoral así como un incremento en la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama, asimismo se observó una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapéuticos. (35)

La survivina 2 $\alpha$ , otra variante de splicing fue descubierta por Caldas y su grupo en el año de 2005, posee solo 74 aminoácidos y genera una proteína de 8.5 kD, se localiza tanto en núcleo como en citoplasma. Se ha propuesto que esta isoforma tiene características proapoptóticas debido a que tiene un dominio

BIR trunco. Se ha reportado que puede formar heterodímeros con la survivina, además de que la expresión de la survivina 2 $\alpha$  atenúa la función antiapoptótica de la survivina en diferentes líneas celulares. (36)

La survivina 2B+32, también conocida como survivina 3 $\alpha$ , fue descrita por Vetri y colaboradores en el año de 2005. De esta isoforma se tiene muy poca información respecto a su papel en el proceso tumorigénico. En reportes previos analizaron tumores en cáncer de mama y se encontró una expresión de esta proteína y no así en tejido adyacente normal. Se le ha clasificado como una proteína antiapoptótica aunque aún faltan estudios para determinar el efecto de esta isoforma en la carcinogénesis. (36)

## 2.5. Survivina DEx3.

Esta isoforma, objeto de estudio de esta tesis, fue identificada en el año de 1999 por Mahotka y colaboradores. Esta isoforma se genera por la pérdida del exón 3 y la incorporación de la región 3' UTR, lo que genera un cambio en el marco de lectura, generando así un nuevo y único carboxilo terminal, en el cual se considera radica su función antiapoptótica.(37) (Figura 8)

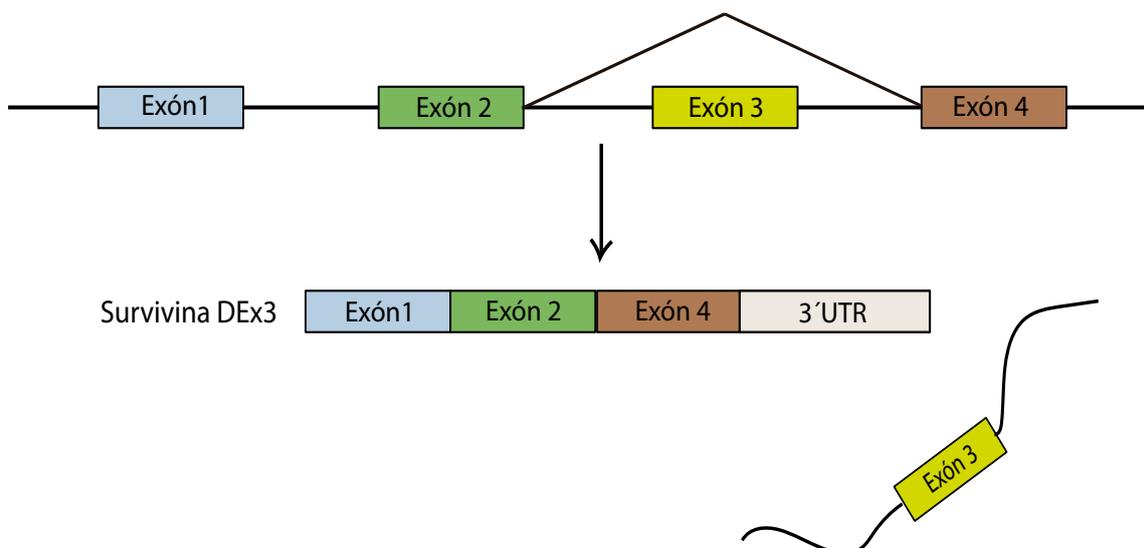


Figura 8. Esquema del splicing alternativo de la isoforma Survivina DEx3. En la figura se puede observar la pérdida del exón 3 y la incorporación de la región 3'UTR en la isoforma survivina DEx3.

La Survivina DEx3 consta de 135 aminoácidos y genera una proteína de 15.6 kD, posee una secuencia de localización nuclear y una secuencia de localización mitocondrial estas contenidas en el carboxilo terminal. (Figura 9).

Reportes previos han descrito que este nuevo carboxilo es importante en la inhibición de la apoptosis, ya que además de los dominios de localización mitocondrial y nuclear, en esta región posee un dominio BH2, característico de otra familia de proteínas que participan en la regulación de la apoptosis, la familia de BCL-2. Se ha reportado que la asociación de la survivina DEx3 con BCL-2 a través de este dominio BH2, le confiere mayor estabilidad en la interacción con las caspasas, lo que conlleva a una inhibición de la apoptosis.(38)

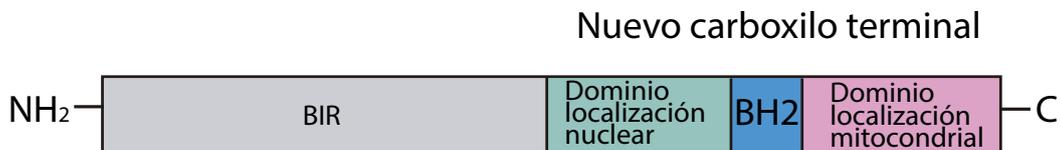


Figura 9. Esquema de la proteína Survivina DEx3, BIR: Dominio BIR trunco, BH2: dominio que comparte con la familia de BCL-2 también involucrada en el proceso carcinogénico, NH<sub>2</sub>: región Amino terminal, C: región Carboxilo terminal.

Esta isoforma a diferencia de la survivina, no posee una función en ciclo celular aunque se le ha localizado en núcleo en la fase G1 y G2 de la división celular, así mismo se ha reportado que aproximadamente un 22% se localiza en citoplasma y una menor proporción en mitocondria, por lo que probablemente su papel de acción se lleve acabo en citoplasma.

La survivina DEx3 se expresa en diferentes tipos de cáncer como son, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer oral, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer cervicouterino, leucemia mieloide aguda, cáncer de pulmón y cáncer de hígado; debido a su constante expresión se le ha considerado como un potencial marcador diagnóstico y pronóstico. (34,39,40)

Hay evidencia de que la sobre expresión de esta isoforma se asocia a una pobre respuesta a quimioterapias así como a una baja sobrevida del paciente, también se ha observado en varios reportes que hay una correlación de la

expresión de esta isoforma con la angiogénesis ya que se han detectado niveles altos de esta proteína en células vasculares endoteliales (41).

Debido a la importancia de la survivina y sus isoformas en la inhibición del proceso apoptótico y en su papel en el cáncer, entender el mecanismo por el cual el splicing alternativo regula la expresión de las diferentes isoformas es importante, ya que a la fecha se desconoce el proceso que controla el splicing alternativo del gen de survivina tanto en células normales como de cáncer.

## 2.6 Splicing Alternativo

El splicing es un mecanismo de regulación complejo en el cual los intrones son removidos y los exones son empalmados. Este mecanismo se conocía como splicing constitutivo en donde un transcrito da origen a una única proteína, sin embargo, esta idea cambio debido a que el número de genes no corresponde con la gran cantidad de proteínas descritas en humano. Es aquí donde entra el mecanismo de splicing alternativo, un término introducido por primera vez en el año de 1970 y que solo era aplicado para algunos genes; este mecanismo consiste en que partiendo de un mismo pre-ARNm (pre-Ácido Ribonucleico mensajero) se pueden generar diversas isoformas de ARNm.(42,43) (Figura 10)

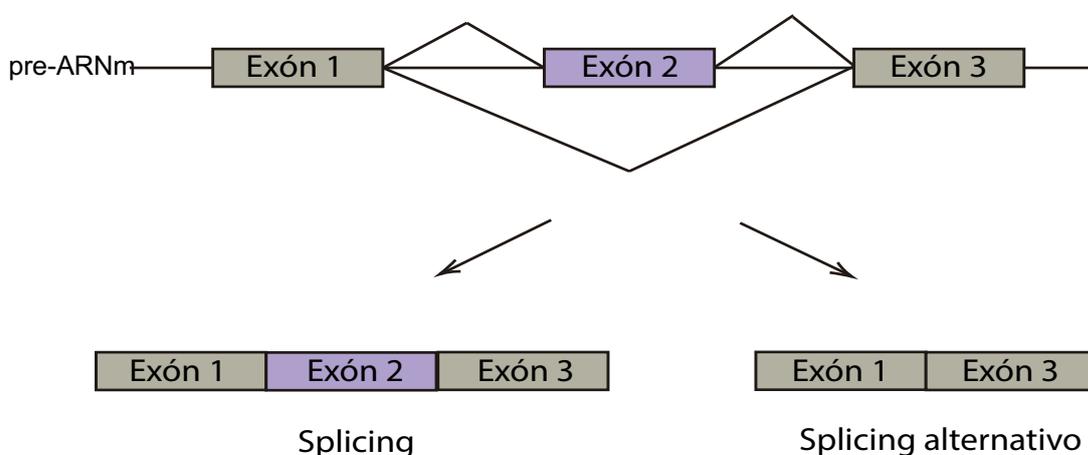


Figura 10. Esquema del proceso de splicing alternativo, en donde a partir de un solo pre-ARNm se pueden generar dos isoformas con características estructurales y funcionales diferentes.

El genoma del humano contiene un poco más de 25 mil genes de los cuales alrededor de 95% sufren splicing alternativo, y gracias a este proceso que se encarga de expandir el proteoma humano, a la fecha se han descrito alrededor de 90 mil proteínas diferentes (44,45); cabe mencionar que este mecanismo no es exclusivo de humanos, también se ha reportado que ocurre en plantas, gusanos y ratones por mencionar algunos.

La maquinaria, que se encarga de realizar el mecanismo de splicing alternativo es un complejo de proteínas y ARN que se le denomina espliceosoma (45).

El espliceosoma es un conjunto complejo y dinámico de proteínas que se encarga de reconocer y eliminar intrones, para posteriormente empalmar los exones, esto lo realiza con la ayuda de cinco complejos de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs por su siglas en inglés) denominadas U1, U2, U4/U6 y U5. El mecanismo de acción de este complejo consiste en realizar cambios conformacionales del pre-ARNm, debido al reconocimiento y unión de las snRNPs a secuencias consenso localizadas en los pre-ARNm, esta unión origina un rompimiento de los enlaces fosfodiéster que se localizan en los límites de los exones e intrones, que da como consecuencia una ruptura del exón-intrón, esta separación favorecerá la unión exón-exón debido a los enlaces fosfodiéster libres, para así generar un ARNm maduro.(46,47)

Durante la última década se ha logrado un progreso notable para aislar, purificar y caracterizar la composición proteica y la actividad bioquímica del espliceosoma, ya que estas 5 ribonucleoproteínas, están compuesta por más de 100 diferentes proteínas. Se ha reportado que el centro catalítico del espliceosoma está compuesto de ARN, por lo que ahora podemos decir definitivamente que el espliceosoma es una ribozima, como el ribosoma.(48,49)

La generación de las diferentes isoformas de un mismo pre-ARNm es debido a los diversos tipos de eventos de splicing alternativo que se han reportado, como se muestra en la figura 11 y como se describen a continuación: A) la selección alternativa del sitio de splicing 5', un ejemplo claro de un ARNm que sufre este mecanismo es un miembro de la familia de BCL-2 conocido como BCL-X, este transcrito dependiendo del sitio de splicing 5' seleccionado puede generar la isoforma BCL-X<sub>L</sub> o BCL-X<sub>S</sub>, B) la exclusión mutua de los exones,

esto quiere decir que puede estar uno de los dos exones alternativos pero no ambos, un ejemplo es el gen Dscam, este transcrito posee 48 exones y a partir de herramientas bioinformáticas se ha descrito que puede presentar este evento, C) el cassette exón, representa un tercio de todos los eventos de splicing reportados, este mecanismo consiste en incluir o no a un exón, un ejemplo es la survina DEx3 la cual pierde el exón 3, D) retención del intrón, que como su nombre lo indica retiene una parte del intrón ya que la maquinaria del splicing reconoce secuencias consenso en estas regiones, e incluye parte de esta secuencia al transcrito maduro, este tipo de exones provenientes de un intrón también son conocidos como exones crípticos. Un ejemplo claro es la Survivina 2B la cual incorpora 69pb del intrón 2 al transcrito.(50,51)

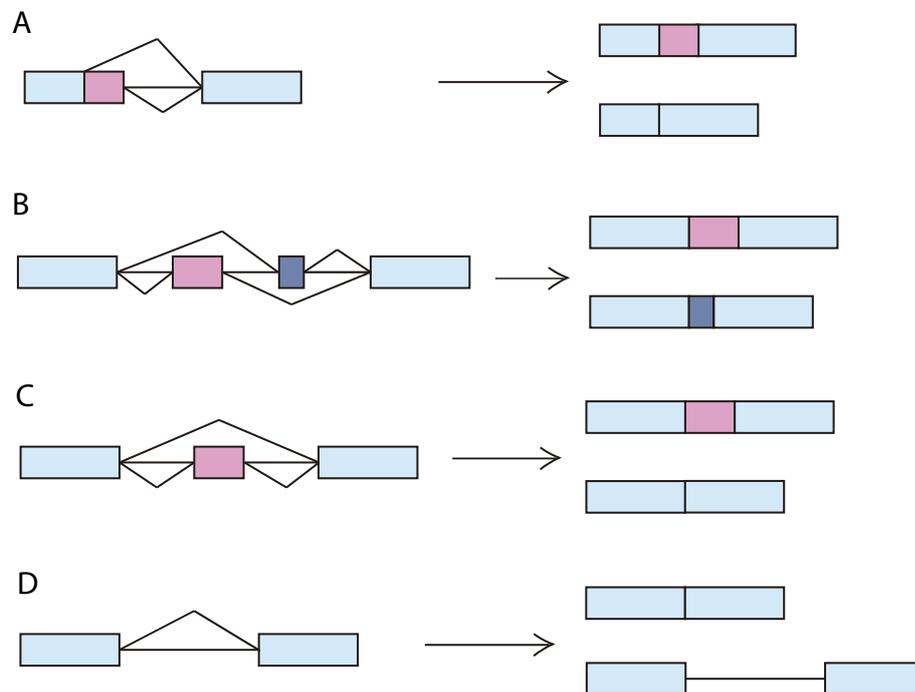


Figura 11. Esquema de algunos eventos de splicing alternativo que se llevan a cabo en humano.

Para que se pueda llevar a cabo el splicing de cualquier gen, además de la maquinaria del splicing y de las secuencias consenso, es necesaria la presencia ya sea en los intrones o en los exones de secuencias regulatorias en *cis* conocidas como potenciadores (enhancers) o silenciadores (silencers) del splicing. Los potenciadores exónicos (ESE por sus siglas en inglés Exonic Splicing Enhancer) o intrónicos (ISE, intronic Splicing Enhancer) juegan un

papel positivo en el reconocimiento del exón, ya que favorece que este sea integrado al transcrito maduro, por el contrario los silenciadores exónicos (ESI por sus siglas en inglés Exonic Splicing Silencer) o intrónicos (ISS por sus siglas en inglés Intronic Splicing Silencer) poseen una función negativa al bloquear los sitios de reconocimiento del exón y por ende es removido junto con los intrones creando un nuevo transcrito con características diferentes; los potenciadores o silenciadores se ven favorecidos por elementos *trans* auxiliares, que juntos generan un balance entre el reconocimiento o la pérdida de los exones.(52-54) (Figura 12)

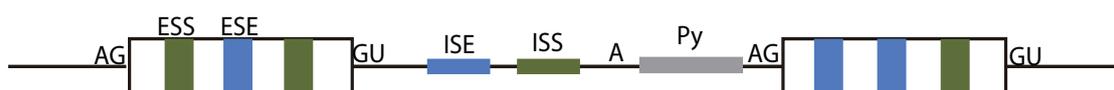


Figura 12. Esquema de los potenciadores y silenciadores intrónicos y exónicos del splicing alternativo. ESS: silenciador exónico, ESE: potenciador exónico, ISE: potenciador intrónico, ISS: silenciador intrónico, A: punto de ramificación, Py: tracto de poli-pirimidinas, AG y GU: sitios consenso del splicing.

Se ha observado que los elementos potenciadores juegan un papel dominante en el splicing de la gran mayoría de los ARNm, mientras que los silenciadores son más importantes en el control del splicing alternativo de ciertos ARNm . En general el reconocimiento positivo o negativo de los sitios de splicing es regulado a través de varios mecanismos, como por ejemplo la actividad o concentración de los factores *trans* de splicing, esto dado por ciertas condiciones patológicas.(55,56)

El splicing alternativo es un mecanismo finamente regulado ya que es necesario para el buen funcionamiento de los diferentes tejidos normales, mientras que un splicing aberrante parece ser la causa de una gran número de enfermedades. Se ha reportado que la mutación de los potenciadores o silenciadores, o de los sitios consenso de splicing, así como la desregulación de la expresión de elementos *trans* conllevan a un splicing alternativo aberrante, esto se ha asociado a diversas enfermedades, como el cáncer. Se ha reportado que la generación de nuevas isoformas por splicing alternativo conlleva a que las células adopten nuevas características que afectan su proliferación, migración, cambios en los patrones de metilación, resistencia a la

apoptosis y a algunos tratamientos quimioterapéuticos. Por lo cual el splicing alternativo se ha visto implicado en casi todos los aspectos del desarrollo del cáncer por lo que entender este mecanismo es sumamente importante para el desarrollo de la enfermedad.(57)

## **2.7 Proteínas SR y hnRNPs**

Como se describió anteriormente, en la secuencia de los pre-ARNm están localizadas regiones potenciadoras o silenciadoras. Estas regiones no actúan solas, ya que se han visto asociadas con diferentes elementos en *trans*, los elementos más descritos que participan interactuando con estas regiones son las proteínas SR (por sus siglas en inglés Serine (S) – Arginine (R)) y las proteínas hnRNPs (Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares).

Las proteínas SR fueron descubiertas como factores de splicing en el año de 1990. Estas proteínas poseen un dominio de dipéptidos ricos en Arginina y Serina, de ahí el nombre del dominio SR, este dominio se localiza en la región del carboxilo terminal, promueve la interacción proteína-proteína facilitando así el reclutamiento del espliceosoma, además de funcionar como un dominio de localización nuclear ya que se ha reportado que tiene interacción con el receptor de transporte a núcleo transportin-SR. Las proteínas SR además poseen de una a dos copias del dominio RRM (dominio de reconocimiento de ARN) localizado en la región amino terminal (Figura 13). Se ha caracterizado la función de estas proteínas y se han relacionado principalmente con el mecanismo de splicing alternativo, aunque también posee otras funciones, como son en la remodelación de la cromatina, en la regulación de la transcripción, y también se ha reportado que participan en ciclo celular (58,59).

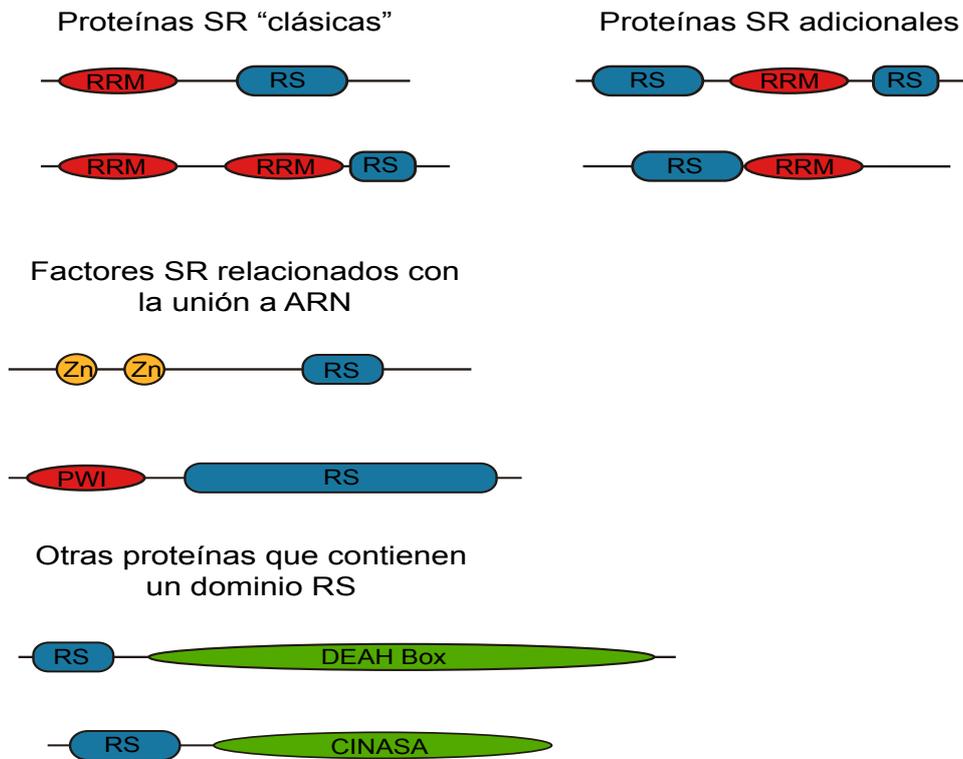


Figura 13. Esquema representativo de los tipos de proteínas SR y los dominios característicos de esta familia de proteínas. En azul el dominio RS, en rojo el dominio RMM, amarillo y verde dominios variables.

Se ha observado que la mayoría las proteínas SR se encuentran asociadas a los speckles nucleares y son reclutadas y llevadas de este sitio a los sitios donde nacen nuevos transcritos generados por la ARN pol II (polimerasa que transcribe la mayoría de los ARNm), ya que se sabe que el splicing alternativo ocurre de manera co-transcripcional.(58,60). En la tabla 1 se muestran los miembros de esta familia de proteínas y sus funciones en el splicing alternativo.

Proteínas SR clásicas	
Nombre de la proteína	Rol en el splicing
SF2/ASF	Splicing constitutivo y alternativo
SC35	Splicing constitutivo y alternativo
SRp20	Splicing constitutivo y alternativo
SRp75	Splicing constitutivo y alternativo
SRp40	Splicing constitutivo y alternativo
SRp55	Splicing constitutivo y alternativo
9G8	Splicing constitutivo y alternativo
Proteínas SR adicionales	
p54	Represor del splicing alternativo

<b>SRp30c</b>	Regulador de splicing constitutivo
<b>SRp38, TASR</b>	Represor del splicing alternativo
<b>hTra2<math>\alpha</math></b>	Potenciador del splicing alternativo
<b>hTra2<math>\beta</math></b>	Potenciador del splicing alternativo
<b>RNPS1</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>SRp35</b>	Regulador negativo del splicing alternativo
<b>SRp86, SRp508</b>	Potenciador o represor del splicing alternativo
<b>U2AF35</b>	Factores Transn del splicing
<b>U2AF65</b>	Factores Transn del splicing
<b>U1-70K</b>	Factores Transn del splicing
<b>XE7</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>SRp46</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>Factores de unión a ARN tipo-SR</b>	
<b>Urp</b>	Factor Trans del splicing
<b>HCC1/CAPER</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>hSWAP</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>Pinin</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>SRp129</b>	Factor Trans del splicing
<b>U4/U6 · U5 tri-snRNP de 27 kDa</b>	Mecanismo desconocido
<b>LUC7B1</b>	Mecanismo desconocido
<b>Acinus</b>	Mecanismo desconocido
<b>SR-A1</b>	Mecanismo desconocido
<b>ZNF265</b>	Regulador del splicing alternativo
<b>SRm160</b>	Co-activador del splicing alternativo
<b>SRm300</b>	Co-activador del splicing alternativo
<b>RBM5</b>	Mecanismo desconocido
<b>U2-associated protein SR140</b>	Mecanismo desconocido
<b>RBM23</b>	Mecanismo desconocido
<b>SFRS15</b>	Mecanismo desconocido

Tabla 1. Familia de proteínas SR (58)

Las proteínas SR regularmente se asocian con los potenciadores tanto intrónicos como exónicos del splicing, favoreciendo así el reconocimiento del exón, y su inclusión en el transcrito. Se han propuesto dos modelos por los cuales las proteínas SR puede llevar su acción, el primero es por medio del reclutamiento de las proteínas SR a las secuencia potenciadoras, esto favorece que los elementos consenso, ya sea de la región 5' o 3' del exón sean reconocidas de manera adecuada por la maquinaria del splicing. El segundo modelo consiste en antagonizar el efecto de las proteínas hnRNPs, proteínas

que se han asociado al splicing de una manera negativa, ya que regularmente se unen a las regiones silenciadoras favoreciendo la pérdida del exón, por lo que la unión de las proteínas SR bloquearía la interacción de las proteínas hnRNP a sus sitios consenso favoreciendo así el reconocimiento del exón (Figura 14).(61)

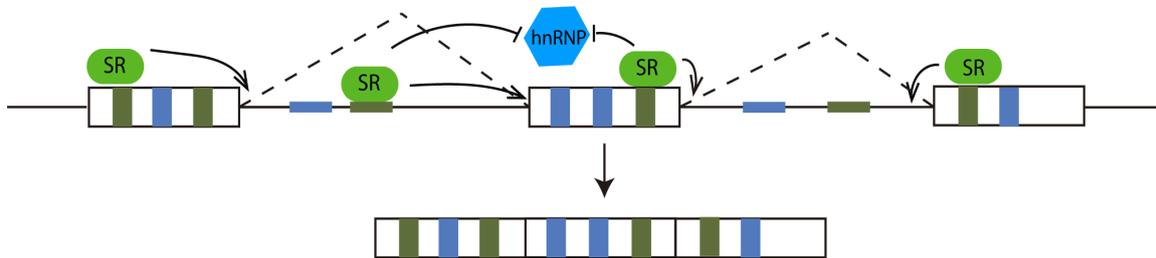


Figura 14. Esquema de la interacción de las proteínas SR con los potenciadores del splicing a fin de promover la inclusión del exón al transcrito maduro. También se muestra como las proteínas SR bloquean la unión de las proteínas hnRNP.

Las proteínas SR se han asociado a diversas enfermedades como el cáncer, ya que algunos miembros de esta familia se ha reportado que tienen un papel en la progresión tumoral, tal es el caso de la proteína ASF/SF2, considerada un proto-oncogen, las proteínas SC35 y SR20 se han reportado que presentan una elevada expresión en cáncer de ovario. También en cáncer de mama se ha reportado una elevada expresión de varias proteínas SR.(58,62).

Las proteínas hnRNP (Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares), son un grupo de proteínas nucleares las cuales se unen a los transcritos nacientes generados por la ARN Pol. II. Los miembros de esta familia de proteínas se muestran en la tabla 2; las hnRNPs contienen diferentes dominios, dentro de los cuales se encuentra el dominio RRM (dominio de unión al ARN), el dominio RGG que se caracteriza por una serie de repetidos de arginina-glicina-glicina, este dominio es el responsable de formar homodímeros o heterodímeros con otras proteínas de la misma familia de hnRNPs, algunos miembros poseen un dominio KH, el cual es esencial para la unión con el ARN. Esta familia de proteínas no posee una estructura en común, como en el caso de la familia de las SR, pero los dominios mencionado son los que mayormente se presentan.(63,64)

<b>Proteínas hnRNPs</b>	
<b>Proteínas hnRNPs</b>	<b>Función en el splicing/ Otras funciones</b>
hnRNP A1	Splicing alternativo, Regulación traduccional
hnRNP A2	Splicing alternativo, Estabilidad del ARNm
hnRNP B1	Splicing alternativo, Regulación traduccional
hnRNP C1	Splicing alternativo, Estabilidad del ARNm
hnRNP C2	Represor del splicing , Regulación traduccional
hnRNP D (AUF1)	Degradación del ARN
hnRNP E1	Regulación transcripcional, regulación traduccional
hnRNP E2	Regulación transcripcional, regulación traduccional
hnRNP F	Splicing alternativo
hnRNP G	Splicing alternativo
hnRNP H	Splicing alternativo
hnRNP I (PTB1)	Splicing alternativo, Estabilidad del ARNm
hnRNP K	Splicing alternativo, Estabilidad del ARNm, Regulación traduccional
hnRNP L	Splicing alternativo, Estabilidad del ARNm
hnRNP M	Splicing alternativo
hnRNP P	Splicing alternativo
hnRNP Q1	Splicing alternativo, Regulación traduccional
hnRNP Q2	Splicing alternativo, Regulación traduccional
hnRNP Q3	Splicing alternativo, Regulación traduccional
hnRNP R	Regulación transcripcional, Regulación traduccional
hnRNP U	Splicing alternativo, Regulación traduccional

Tabla 2. Familia de proteínas hnRNP

Al igual que los miembros de la familia SR, las proteínas hnRNP tienen una influencia directa en el splicing del pre-ARNm, uniéndose a los transcritos nacientes por medio de su dominio RMM o KH. A diferencia de los integrantes de la familia SR, el mecanismo por el cual las proteínas hnRNP interfieren con el splicing alternativo es conocido solo para un pequeño grupo de estas proteínas. Dicho mecanismo, el cual está bien caracterizado, es mediante la unión de las hnRNPs a los sitios silenciadores, bloqueando así la unión de la maquinaria del splicing. Las hnRNPs también bloquean los sitios *cis* consenso para el reconocimiento de los exones debido a que generan loops en los exones, modificando así la estructura secundaria del pre-ARNm que van a sufrir splicing, ocultándolos de la maquinaria del splicing lo que ocasiona que

no sean reconocidos y por consecuencia la pérdida del exón.(63) Se ha propuesto también que estas proteínas al unirse a su secuencia consenso puede bloquear la unión de las proteínas SR al transcrito, lo que ocasiona en la mayoría de los casos que el exón no sea reconocido como parte del transcrito maduro (Figura 15).(58)

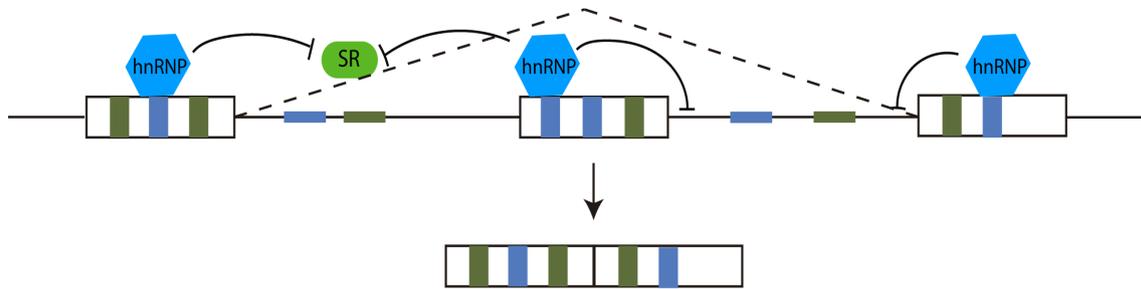


Figura 15 Esquema que representa el mecanismo por el cual las proteínas hnRNPs se unen a los sitios silenciadores del splicing y evitan que el exón sea reconocido y por lo tanto no sea incluido en el transcrito maduro.

Aunque el mecanismo de regulación del splicing por las hnRNPs está bien caracterizado, existen casos particulares en el cual algunas hnRNPs pueden favorecer o reprimir el reconocimiento del exón, esta característica se debe a la posición que puedan ocupar en el pre-ARNm y al sitio de splicing consenso que tengan cercano.

Se ha reportado que los miembros de la familia de las hnRNP presentan una alteración en su regulación en diversas enfermedades, dentro de las que se encuentra el cáncer, ya que modulan el splicing alternativo de genes pro-tumorigénicos y anti-tumorigénicos, por ejemplo la proteína hnRNP K regula el splicing alternativo del transcrito de BCL-X, favoreciendo la generación de la isoforma BCL-X<sub>L</sub> que se ha asociado a la inhibición del proceso apoptosis. La proteína hnRNP A2/B1 se ha caracterizado como un proto-oncogen y su expresión se ha correlacionado con un mal pronóstico en gliomas. La proteína hnRNP M regula el splicing alternativo del transcrito CD44, asociado a la transición epitelio mesénquima en cáncer de mama. (65,66)

En los últimos años se ha observado que la arquitectura de los exones tiene una influencia muy importante en la regulación del splicing ya que estos poseen cierto número de elementos regulatorios potenciadores o silenciadores, para activar o inhibir su reconocimiento. Además de estos elementos, se suman los sitios específicos consenso, ya que se ha reportado que cada exón posee un único par de sitios de splicing, también un único set de proteínas que pueden unirse, ya sea SR o hnRNPs, es aquí donde el balance entre una familia de proteínas y otra juega un papel importante al reprimir o potenciar el reconocimiento de los exones.(58,67)

## 2.8 Sam68 (KHDRBS1)

Sam68 fue identificada como una proteína asociada a la cinasa de tirosina c-SRC durante la mitosis, de ahí su nombre “proteína de 68kD asociada a SCR en la mitosis” (por sus siglas en inglés SRC associated in mitosis 68kDa). Sam68 pertenece a la familia de las proteínas STAR (por sus siglas en inglés Signal transduction and activation of RNA metabolism) , asociadas al metabolismo del ARN. (68)

Esta proteína posee diferentes dominios, dentro de los que se encuentra el dominio GSG el cual favorece la interacción proteína-ARN, también dentro de este sitio se encuentra el dominio KH que comparte con la proteína hnRNP K. Además, Sam68 posee una región rica en prolina y una región rica en tirosinas en el carboxilo terminal, esta región es importante para la fosforilación y activación de Sam68 a fin de formar homodímeros, lo que favorece la unión con el ARNm, además posee un dominio de localización nuclear(69,70) (Figura 16).

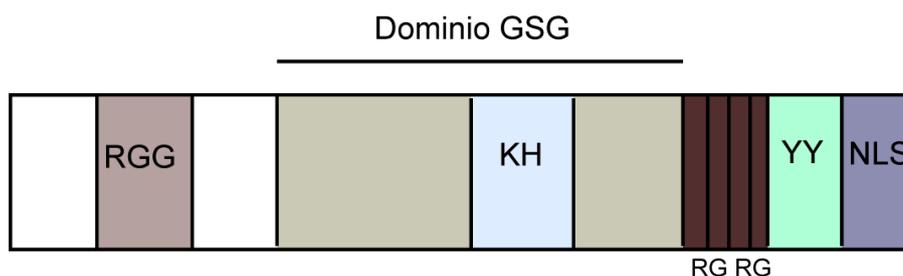


Figura 16. Representación de la estructura y dominios de sam68. RGG: corresponde a Arginina, glicina , glicina. RG: Arginina, glicina. GSG: dominio conformado por el dominio KH. KH: dominio de homología con la proteína hnRNP K. YY: dominio rico en tirosinas. NLS: dominio de localización nuclear.

Sam68 reconoce preferencialmente secuencias ricas en A/U en el ARNm, teniendo como sitio consenso el motivo UAAA, se ha observado que la modificación de una base de este sitio afecta la unión de Sam68 al ARNm afectando así el splicing alternativo de los transcritos a los cuales se une. Se ha reportado que Sam68 también se asocia a la señal de poliadenilación ya que posee un motivo de AAUAA por lo cual pudiera tener una función en la estabilidad del ARNm.(71)

Sam68 se ha identificado en una variedad de procesos como son apoptosis, proliferación, diferenciación celular y splicing alternativo. Para el caso particular del mecanismo de splicing alternativo se ha visto involucrada en la regulación de diferentes pre-ARNm que participan en cáncer, tal es el caso del CD44, el pre-ARNm contiene 10 exones y Sam68 preferencialmente se une al exón 5 rico en secuencias UAAA modulando el splicing de forma positiva ocasionando que este exón sea incluido, generando la variante CD44<sub>v5</sub>, que se ha visto sobre-expresada en diversos tipos de cáncer y se relaciona a un mal pronóstico en cáncer gástrico y renal. (68). Sam68 se ha asociado también al splicing alternativo del proto-oncogen CCND1 (ciclina D1), el cual genera dos isoformas, la tipo, que corresponde a la ciclina D1a, y la alternativa ciclina D1b, esta última con un potencial oncogénico mayor que la tipo; Sam68 se ha asociado a la isoforma alternativa, ya que se ha reportado que se une al intrón 4 favoreciendo su retención y por tanto se incluye en la isoforma.

Sam68 también afecta el splicing alternativo de la isoforma anti-apoptótica Bcl-X ya que por splicing genera dos isoformas con características antagónicas en el proceso de apoptosis, esto debido a la selección alternativa del sitio de splicing 5' en el exón 2, favoreciendo la expresión de la isoforma BCL-X<sub>s</sub> que posee características pro-apoptóticas.(72)

Sam68 a pesar de no pertenecer a las familias clásicas involucradas en el splicing alternativo, puede funcionar como un regulador positivo o negativo de este mecanismo, y esto depende de la selección de los sitios de splicing, así como también por su interacción con otras proteínas SR y hnRNPs ya que se ha observado que podrían competir por algunos sitios de splicing.

La alteración del splicing alternativo en cáncer frecuentemente se asocia a una pérdida del balance en la expresión de los factores que actúan en *trans* del

splicing, un ejemplo claro es el de Sam68, que se ha reportado sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer y se ha involucrado directamente como un elemento importante para el desarrollo y progresión de la enfermedad.(70,73)

### 3. HIPOTESIS

El splicing de la survivina DEx3 se regulará por elementos específicos *cis* y *trans*.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar los elementos de splicing alternativo que regulan la expresión del exón 3 de la survivina.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ◆ Construir un minigen para el estudio de la regulación de la expresión del exón 3 de la survivina.
- ◆ Estudiar la participación de elementos *cis* (ESE, ISE, ISS, ESS) en la regulación de la expresión del exón 3 de la Survivina.
- ◆ Determinar los elementos *trans* (proteínas SR o hnRNPs) que actúan en estos sitios utilizando herramientas bioinformáticas.
- ◆ Identificar los elementos *trans* que regulan el splicing del exón 3 de la survivina.
- ◆ Demostrar la interacción de los factores en *trans* identificados con su secuencia consenso.
- ◆ Determinar el efecto de la expresión de los factores *trans* identificados sobre la expresión de la Survivina DEx3 endógena.

## 5. Materiales y Métodos.

### 5.1 Diseño y construcción del minigen.

Para la construcción del minigen se utilizó la técnica de PCR; tomando como base el gen de survivina que consta de 4 exones y 3 intrones, se amplificaron el exón 2, exón 3 y 143 pb del exón 4; para los intrones se amplificaron 700pb río arriba y río abajo del exón 3, así como 396pb río abajo del exón 2 y 326pb río arriba del exón 4. Se mantuvieron estas proporciones en los intrones ya que se ha reportado que en los 300pb tanto río arriba como río abajo de los exones que sufren splicing, se localizan importantes elementos regulatorios para el proceso de splicing. (Figura 17)

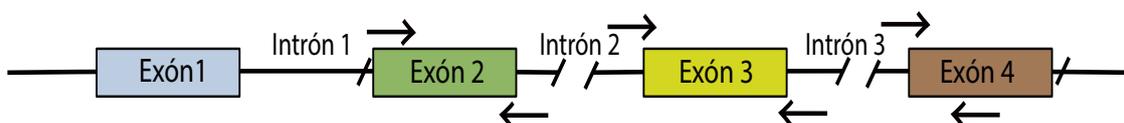


Figura 17. Representación del ARN de la survivina, las flechas indican la posición de los oligonucleótidos para amplificar por PCR cada región del minigen

Para la amplificación de las 3 secciones del minigen se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (los llamaremos oligos en lo subsecuente): el primer fragmento lo denominaremos minigen1, este comprende el exón 2 y los oligos utilizados fueron: Sentido 5' CGGGCTGCCAAGCTTACTCACGAGCTG 3' (HindIII) y Anti-sentido 5' AGCCTCCGGATCCGTGAAGTGCACACTT 3' (BamHI), minigen 2, que comprende el exón 3, Sentido: 5' TTCTCTGCCCTGGATCCTTACAGTGGGC 3' (BamHI) Anti-sentido: 5' AATAAAAAGAATTCCTGAGGCCAGGTGTG 3' (EcoRI) y finalmente el minigen 3, que comprende parte del exón 4, Sentido: 5' AGTAGGAATTCGGGAGCACCCAGCGC 3' (EcoRI), Anti-sentido: 5' GAATACTCGAGGGAAGTGGTGCAGCCACTC 3' (Xho I).

Se utilizó como templado ADN genómico, este fue obtenido de sangre periférica y purificado con el kit QIAamp DNA blood (Qiagen), se siguieron las especificaciones del proveedor.

Los programas de PCR que se utilizaron para amplificar cada fragmento fueron los siguiente:

Minigen1 (Exón 2)

35 ciclos

94°/1' | 94°/30'' 64°/30'' 72°/2' | 72°/ 2' 4°/ ∞

Minigen2 (Exón 3)

25 ciclos

94°/1' | 94°/30'' 66°/30'' 72°/2' | 72°/ 2' 4°/ ∞

Minigen3 (Exón 4)

35 ciclos

95°/10' | 95°/30'' 68°/2'' | 72°/5' 4°/ ∞

Cada producto de PCR fue purificado y verificado por secuenciación Sanger, para posteriormente clonarlo secuencialmente en el vector pcDNA 3.1(+) (Invitrogen).

La clonación secuencial de los fragmentos de PCR se realizó en el vector pcDNA 3.1, se utilizó el kit Rapid DNA ligation Kit (Thermo Scientific) y se siguieron las especificaciones del proveedor, una vez clonada se verificó la integridad de la construcción denominada minigen.

Para la secuenciación Sanger se utilizaron los siguientes oligos:

T7 : 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

BGH : 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'

Estos oligos se utilizaron ya que están en la secuencia del vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen), y con esto evitamos la amplificación de las isoformas endógenas y nos aseguramos de amplificar únicamente la construcción del minigen clonada en el vector. (Figura 18)



Figura 18. Representación del minigen y la localización de los oligos específicos del vector T7 y BGH para su análisis por PCR e identificación por secuenciación Sanger.

## 5.2 Transformación y análisis de colonias

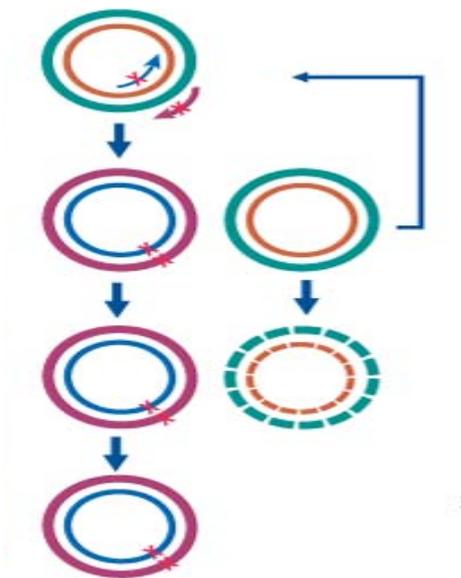
Los fragmentos obtenidos (Minigen1, 2 y 3) mediante PCR fueron clonados secuencialmente en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen); con cada construcción se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , utilizando el Kit Transform Aid Bacterial Transformation Kit (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la selección de las colonias que contenían el vector de interés, se utilizaron placas de agar LB/Ampicilina (100ug/ml) en donde se sembraron las bacterias transformadas y se incubaron toda la noche a 37°C.

Para el análisis de cada fragmento, así como de la construcción completa del minigen, se seleccionaron 5 colonias de la placa de LB y se procedió a realizar la extracción del plásmido utilizando el Kit S.N.A.P. miniprep (Invitrogen) y el kit HiSpeed Plasmid (Qiagen), utilizando las especificaciones de los proveedores.

## 5.3 Deleciones y Mutaciones en el minigen

Las deleciones se realizaron siguiendo el protocolo del kit Quik Change Lightning (Agilent technologies) con ligeras modificaciones. Se realizaron 14 deleciones sobre el minigen, 7 río arriba del exón 3 y 7 río abajo del exón 3, cada una de 100pb. Se mantuvieron 60 pb río arriba del exón 3 y 10 pb río abajo del exón 3, para conservar los sitios consenso de splicing (74). Para el exón 3 se realizaron 3 deleciones de 22pb, 49pb, 37pb, dejando en los extremos 5' y 3' del exón 2pb para evitar modificar las regiones consenso del splicing. Las secuencias de los oligos utilizados en la generación de las deleciones se muestran en el anexo 2.

Brevemente la técnica para la generación de las deleciones y mutaciones se muestra en la Figura 19:



-Síntesis de la hebra mutante mediante PCR. Se utilizan oligos con la mutación o deleción deseada

-Degradación del templado molde de la reacción de PCR, utilizando DPNI que reconocerá DNA metilado y hemimetilado .

-Transformación de bacterias competentes con el templado mutado .

Figura 19. Esquema general de la metodología realizada, con el objetivo de generar las deleciones y mutaciones del minigen

El programa de pcr utilizado para las deleciones y mutaciones en el minigen fue el siguiente:

18 ciclos

95°/2' | 95°/20'' 55°/10'' 68°/4:30' | 68°/5' 4°/ ∞

La condiciones para este ensayo fueron la siguientes, 100ng de templado, 125ng de cada oligonucleótido, 1ul de dNTPs mix, 1X de QuikChange Lightning Buffer y 1.5 ul de QuikSolution reagent .

Para el caso de las mutaciones la metodología y las condiciones de reacción fueron las misma que para las deleciones, los oligos para las mutaciones y doble mutación realizadas en el exón 3 se pueden observar en anexo 2.

El diseño de las mutaciones y de las deleciones se realizó en base al análisis bioinformático de los posibles elementos en *cis* que pueden estar interactuando con las secuencia del exón 3 (descrito en el apartado 5.9 de la metodología).

#### **5.4 Cultivo celular.**

Para todos los ensayos se utilizaron células de adenocarcinoma de cérvix (HeLa)(ATCC CCL-2) . Las células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 5% SFB, incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

#### **5.5 Transfección transitoria.**

Las células HeLa fueron transfectadas utilizando el liposoma lipofectamina 2000 (invitrogen), se siguieron las recomendaciones del fabricante. Para el análisis de las deleciones en los intrones se sembraron  $6.8 \times 10^4$  células en una caja de 24 pozos y se transfectaron con 800 ng de ADN y 2ul del liposoma. Para el caso de las deleciones en el exón, así como para las mutaciones, se sembraron  $250 \times 10^4$  células en una placa de 6 pozos, se utilizaron 4ug de ADN plasmídico que se mezclaron con 10ul de lipofectamina 2000. La mezcla liposoma-ADN se incubo con las células por 6 hrs, posteriormente se retiró el medio y se sustituyo por medio DMEM suplementado al 5% SFB; 48hrs después de la transfección se extrajo ARN total.

#### **5.6 Extracción de ARN total.**

Para la extracción del ARN se utilizó Trizol (invitrogen), se siguieron las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el procedimiento consistió en homogenizar las células con trizol y posteriormente se les adicionó cloroformo, se centrifugó y se tomó la fase acuosa que es la que contiene el ARN, para posteriormente precipitarlo con isopropanol y resuspender en agua Milli Q.

### **5.7 Síntesis de ADN complementario (RT-PCR)**

Para la síntesis se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem) , se partió de 1ug de ARN total para la reacción así como también se utilizaron hexámeros aleatorios, se siguieron las recomendaciones del fabricante. El programa para la reacción de RT fue el siguiente:

25° / 10' | 37° / 120' | 85° / 5' | 4° / ∞

### **5.8 Reacción en cadena de la polimerasa semi-cuantitativo (PCR) y PCR en tiempo real (qPCR).**

Para medir la abundancia relativa de survivina endógena, así como la expresión del minigen con las diferentes construcciones, se utilizaron las siguientes condiciones: 200uM de dNTPs , 0.2uM de oligos, 1.25 unidades de Taq Gold DNA polimerasa (Roche). Para la survivina endógena se utilizarón los siguientes oligos, sentido : 5' GCCATGAATTCATGGGTGCCCGACGTTGC 3' anti-sentido: 5' AGCTCTCTAGAGAG GCCTCAATCCATGGCA 3' , para el minigen se utilizaron los oligos T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' y BGH: 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3' , para GAPDH, que se usó como gen constitutivo, los oligos fueron sentido: 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3' anti sentido: 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3', así como los siguientes programas de PCR:

Survivina endógena:

3 ciclos

30 ciclos

95°/10' | 95°/30'' 68°/30'' 72°/30'' | 95°/30'' 62°/30'' 72°/30'' | 72°/5' 4°/ ∞

Minigen :

35 ciclos

95°/10' | 95°/30'' 47°/30'' 72°/30'' | 72°/5' 4°/ ∞

GAPDH:

20 ciclos

95°/10' | 95°/30'' 60°/30'' 72°/30'' | 72°/5' 4°/ ∞

De cada reacción se sacaron alícuotas a diferentes ciclos, esto para verificar que la reacción no estuviera saturada y aún estuviera en fase logarítmica. Cada producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 2% teñidos con el reactivo Sybr Safe (invitrogen) y visualizados en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad)

Para el PCR en tiempo real se adquirieron sondas Taqman (Applied Biosystems) para la survivina (Hs00977612\_mH) , survivina DEx3 (Hs03043576\_m1) y GAPDH (Hs00266705\_g1). Se siguieron las recomendaciones del proveedor y se utilizó el siguiente programa:

40 ciclos

95°/2' | 95°/15'' 60°/30'' 72°/1' |

Todos los ensayos se realizaron en el equipo Applied Biosystems Quant Studio 7 Flex Real-Time PCR system. El análisis de los resultados de PCR en tiempo real (qPCR) se realizó mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta CT$ , el cual consiste en normalizar el gen blanco mediante un gen constitutivo y finalmente se calculó la razón de cambio (fold change) mediante la formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **5.9 Análisis computacional o bioinformático de elementos cis y trans.**

Se utilizaron 3 softwares diferentes para el análisis de los elementos en cis y trans, splicing Rainbow (<http://www.embl.de/>, se discontinuó en 2012), ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>) y spliceaid (<http://www.introni.it/splicing.html>); en base a estos análisis se

realizó el diseño de las deleciones y las mutaciones, para esto se utilizaron la secuencia del exón 3 y 700 pares de bases río arriba y río debajo del exón.

### **5.10 Western Blot**

Se extrajeron proteínas totales de las células HeLa, utilizando el reactivo M-PER mammalian protein extraction reagent (thermo scientific), el procedimiento es el siguiente, inicialmente el botón de células se lavó con PBS, se adicionó el reactivo M-PER suplementado con inhibidores de proteasas, (por cada 100mg de células agregar 1ml de reactivo M-PER). Las células se incubaron a temperatura ambiente en agitación suave por 10 minutos, para posteriormente centrifugar a 13,000 RPM a 4°C por 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado ya que contiene las proteínas totales.

Para el análisis de las proteínas se prepararon geles de acrilamida al 15%, se colocaron cantidades de proteínas previamente estandarizadas, se realizó la electroforesis a 110V por alrededor de 2 hrs. Los geles fueron transferidos a membranas de PVDF (Polivinildifluoruro), estas se bloquearon con leche sin grasa al 5% preparada con TBS-Tween por alrededor de 1 hr. Se colocaron los anticuerpos primarios empleando diferentes diluciones, estos se dejaron toda la noche a 4°C. Posteriormente se colocaron los anticuerpos secundarios siguiendo las especificaciones del proveedor por 1hr, para proseguir con los lavados y posterior revelado de la membrana, para este último paso se utilizó el reactivo Immobilon Western (Millipore) siguiendo las condiciones del fabricante.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes, anti-Sam68 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology) dilución 0.2:1000, anti-SF2/ASF(96) (Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:1000, anti-RBMX(hnRNP G)(H-80) (Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:1000, anti-TRA2B (Abcam, Cambridge) dilución 1:1000, anti-Survivin DEx3 (Abcam, Cambridge) dilución 1:500 y anti-GAPDH(FL-335) (Santa Cruz Biotechnology) dilución 0.2:1000.

### 5.11 Pull Down de ARN.

Se diseñaron 4 sondas de ARN y se mandaron sintetizar a IDT, las secuencias de las sondas fueron las siguientes:

WT: ACAUAAAAGCAUUCGU

M2: ACAGUAUCGAAGUCGU

WTL: AGAGAGGAACAUA AAAAGCAUUCGUCCGGUUG

2MutL: AGCCAGUAUCUAAAAGCCUGAUUAUAGAUUG

Se utilizó el kit Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-Down (Thermo Scientific), y se siguieron las condiciones del fabricante, con algunas modificaciones. A continuación se ilustra brevemente en qué consiste la técnica:

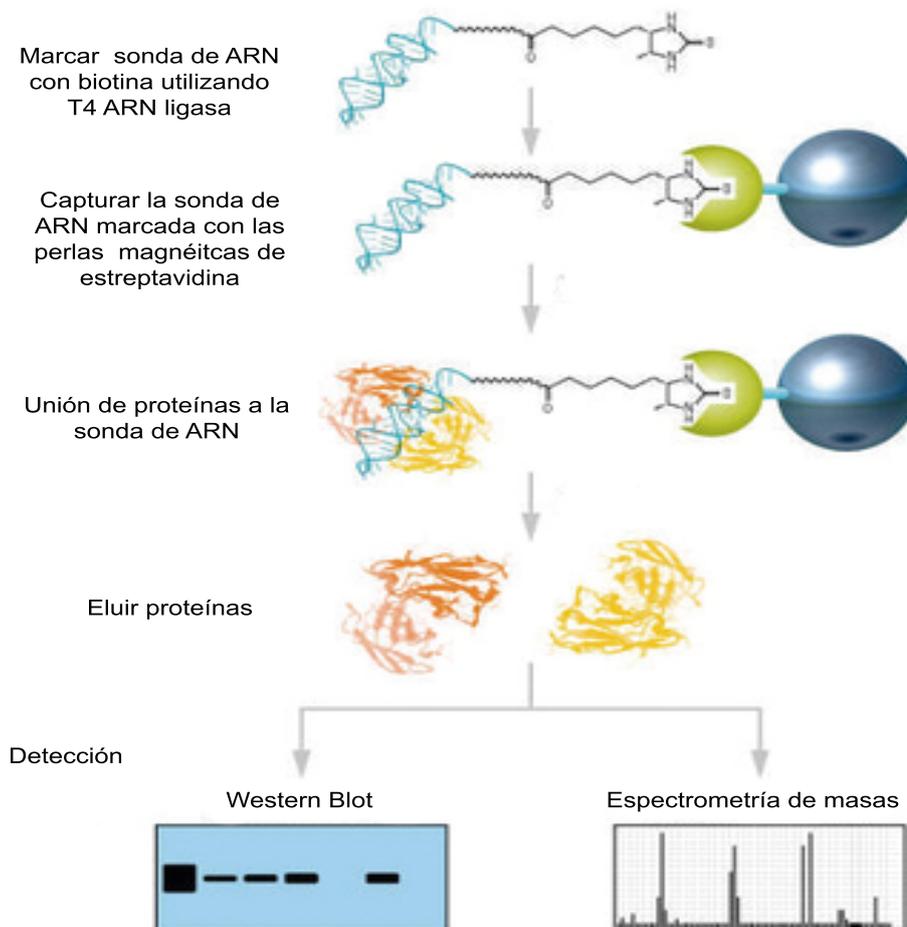


Figura 20. Representación general de la metodología de pull down de ARN

Brevemente el protocolo es el siguiente, 60 pmol de sonda de ARN se utilizaron para la reacción de ligación con la molécula Biotinylated Cytidine Bisphosphate (Biotina), posteriormente se validó el marcaje Sonda-Biotina, colocando 10nM de la sonda-biotina en una membrana de nylon cargada positivamente, la membrana fue expuesta a una lámpara de UV con un bulbo de 254nm por 5 min a 0.5cm de distancia de la lámpara; inmediatamente se validó la eficiencia del marcado con el kit Chemiluminescent Detection Module (Thermo Scientific) para detectar el spot de la sonda marcada. La sonda marcada con biotina se acopló posteriormente a perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina para poder recuperar la sonda y las posibles proteínas que pudieran interactuar. Se utilizaron 200ug de proteína total de células HeLa que se mezclaron con la sonda marcada previamente, esta reacción se llevó a cabo en movimiento orbital por 2 hrs a una temperatura de 4°C. Se prosiguió con los lavados, con el fin de eliminar exceso de proteína, 4 lavados con 100 mM de KCl y 4 lavados con el buffer de lavado proporcionado por el kit, para posteriormente hacer la elución de las proteínas y su análisis por Western blot.

### **5.12 ARN de interferencia para elementos en trans**

Los ARN de interferencia fueron diseñados utilizando el software E-RNAi (<https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>), las secuencias fueron las siguientes, para Sam68: GAAAGATCCTCATGAATTA , para hnRNP H1: GGUCCAAAUAGUCCUGACA, hnRNP H2: GGCACAUCAGGUUUCGUU, hnRNP F: CUCUGACUGCACGAUUCAU, SRp40: CGCAGACCUCGAAAUGAUA, SRp55: AGGCGAUCUUACUCUGGAA. Las construcciones fueron clonadas en el vector pSIREN-RetroQ (Clontech) que contiene el promotor U6. Los ARN de interferencia fueron transfectados en células HeLa como se describió previamente en la metodología de transfección, con una modificación en el tiempo de la extracción de proteína o ARN ya que se realizó a las 72hrs posteriores a la transfección. La eficiencia del ARN de interferencia fue evaluada mediante Western blot o PCR.

### **5.13 Sobreexpresión de Sam68**

La secuencia del marco de lectura para la sobreexpresión de Sam68 fue adquirida en Origene (SAM68(KHDRBS1 NM\_006559 Human Untagged Clone), esta secuencia fue clonada en el vector pCMV6-AC bajo la regulación del promotor CVM (citomegalovirus). Esta construcción se transfectó transitoriamente en células HeLa y se verificó la sobreexpresión de la proteína por Western blot.

### **5.14 CRISPR/Cas**

Las células HeLa fueron transfectadas con el vector lentiCas9-Blast (AddGene), que expresa la proteína Cas9 con el fin de obtener una línea celular estable de Cas9; pasadas 48 hrs de la transfección se adicionó a la línea celular una concentración de 6 ug /ml del fármaco Blastidina para realizar la selección, el tratamiento se mantuvo por 6 días. Ya obtenida la línea celular estable, se verificó por Western blot la expresión de la proteína Cas9, para la cual se empleó el anticuerpo Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody (Clontech). Para realizar la edición del ADN se siguió el protocolo de IDT, el cual consiste en el diseño de una guía de ARN (crRNA), esta se realizó con la ayuda del software *CRISPR DESIGN* (<http://crispr.mit.edu>), la secuencia utilizada fue : GAACAUAAAAGCAUTC. Se mandó sintetizar el crRNA a IDT además de adquirir la secuencia tracrRNA, indispensable para el reconocimiento de Cas9, con la misma compañía. Ambos oligos fueron mezclados en concentraciones equimolares para tener una concentración final de 3 uM, se hibridaron a 95°C por 5 min. Además de los oligos de ARN se utilizó un oligo ssADN de 45 nucleótidos de longitud, para poder incorporar la mutación en el ADN genómico, la concentración que se utilizó fue de 100nM del oligo de ADN. Los oligos de ARN y ADN fueron reversamente transfectados (la transfección reversa consiste en agregar inicialmente la mezcla de transfección y posteriormente agregar las células sobre el mix de transfección) en las células HeLa Cas9 estables utilizando el lípido RNAiMAX (Invitrogen) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Pasadas 48hrs de la transfección se tripzinizaron

las células para posteriormente subclonaras, para esto se utilizaron placas de 96 pozos y se verificó que por pozo solo hubiera una sola célula. Estas clonas se mantuvieron por 3 semanas para posteriormente realizar la extracción de ADN genómico y validar la incorporación de la mutación por secuenciación Sanger.

#### **5.15 *Análisis densitométrico.***

Para el análisis de los productos de PCR semicuantitativo y Western blot, se utilizó el software Image J (<https://imagej.net/Welcome>) para obtener unidades arbitrarias de área y de intensidad de cada una de las bandas. Las bandas se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH que se usó como gen constitutivo y control de carga.

#### **5.16 *Análisis estadístico.***

Se utilizó la prueba t de Student para comparar dos condiciones así como también una ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Dunnett para analizar 3 o más condiciones. Las barras de desviación estándar se muestran en todos los gráficos. Los valores con una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00.

## 6. Resultados

### 6.1 Construcción del minigen

El gen de la survivina consta de 4 exones y 3 intrones (Figura 4), de los cuales se amplificaron por PCR los exones 2, 3 y parte del exón 4, cada sección contenía parte de los intrones correspondientes, esto para asegurar que se incluyeron las regiones necesarias para que se lleve a cabo el splicing alternativo del minigen. Ya que está reportado que los primeros 300pb río arriba y abajo del exón que sufre splicing contiene los elementos necesarios para llevar este proceso. La construcción del minigen permitió tener una herramienta que pudiera ser sometida a los mismos eventos de splicing alternativo que el gene endógeno y por lo tanto generar dos isoformas, las cuales se denominaron SurM que contenía los exones 2, 3 y parte del exón 4, y SDx3M que contenía los exones 2 y 4 como podemos ver en la figura 21.

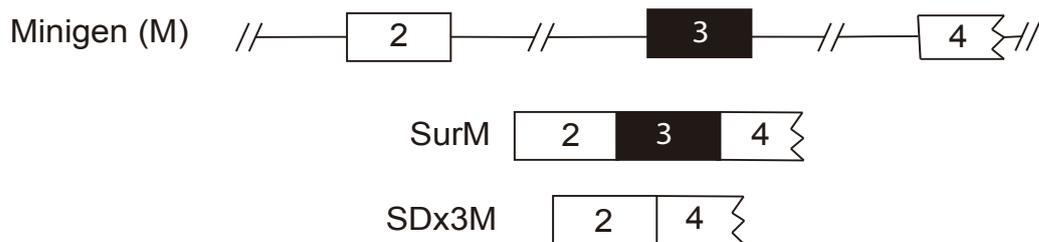


Figura 21. Esquema del minigen y de las isoformas que se genera por splicing alternativo, en los cuadros blancos se ilustran los exones 2 y 4, el cuadro negro indica el exón 3 el cual es sometido al mecanismo de splicing.

Cada fragmento del minigen, los cuales se denominaron minigen 1, minigen 2 y minigen 3, fueron amplificados mediante PCR (figura 22) para posteriormente clonarlos secuencialmente en el vector pcDNA 3.1, solo para el caso del fragmento minigen 2 debido a que se observaban amplicones inespecíficos, se decidió clonarlo inicialmente en el vector ptz57R/T a partir de una clonación TA y posteriormente se liberó el fragmento con las enzimas de restricción que contenía el fragmento para clonarlo en el vector pCDNA 3.1. Cada fragmento

fue mandado a secuenciar para verificar que no hubiera cambios de bases que pudieran alterar los elementos *cis* del splicing; En la figura 23 se muestra el mapa del vector así como también la posición de los 3 fragmentos que conforman el minigen de survivina.

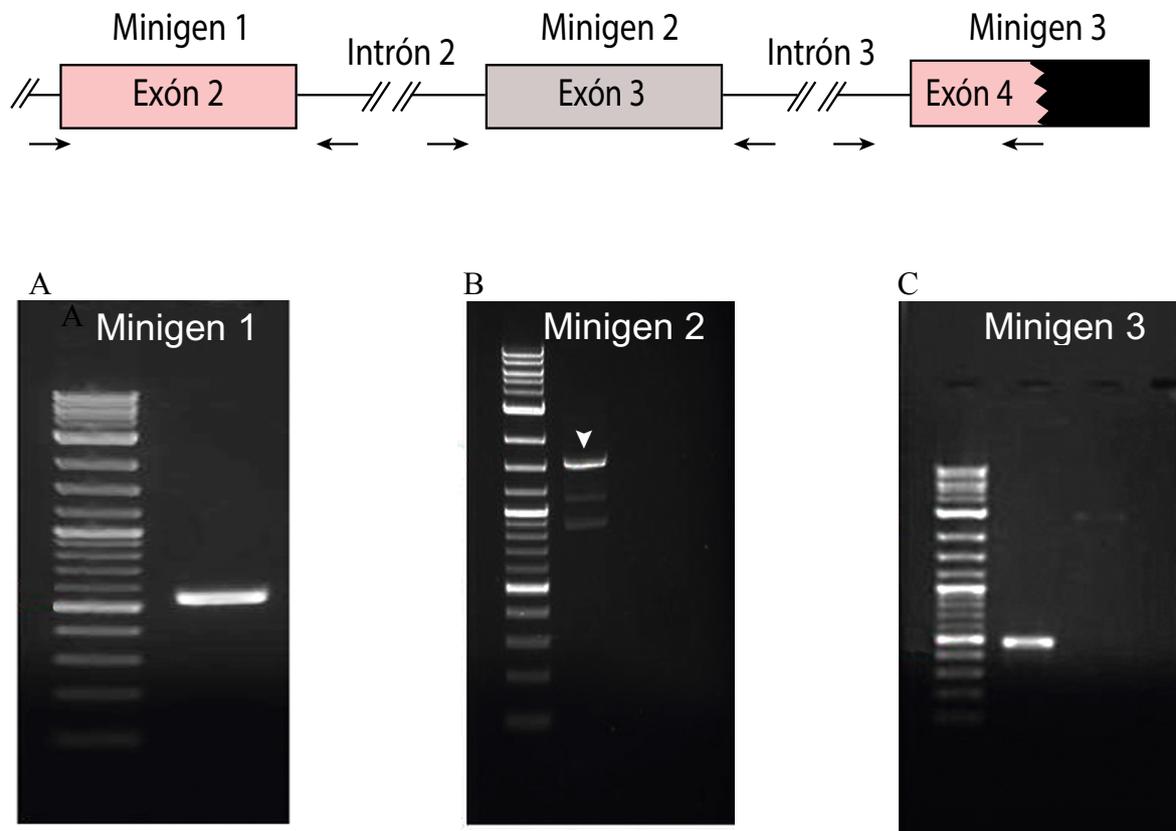


Figura 22. Esquema de los fragmentos que componen el minigen, las flechas representan la posición donde alinean los oligos (panel superior), RT- PCR de los fragmentos que conformaran el minigen, A) corresponde al minigen 1 que contiene el exón 2, B) minigen 2 que incluye el exón 3 y el C) que incluye parte del exón 4 (panel inferior)

Una vez verificada la secuencia del minigen y que esta no sufrió cambios de bases que pudieran afectar los elementos *cis* y con esto el splicing alternativo del minigen, el siguiente paso fue transfectar la construcción en células HeLa.

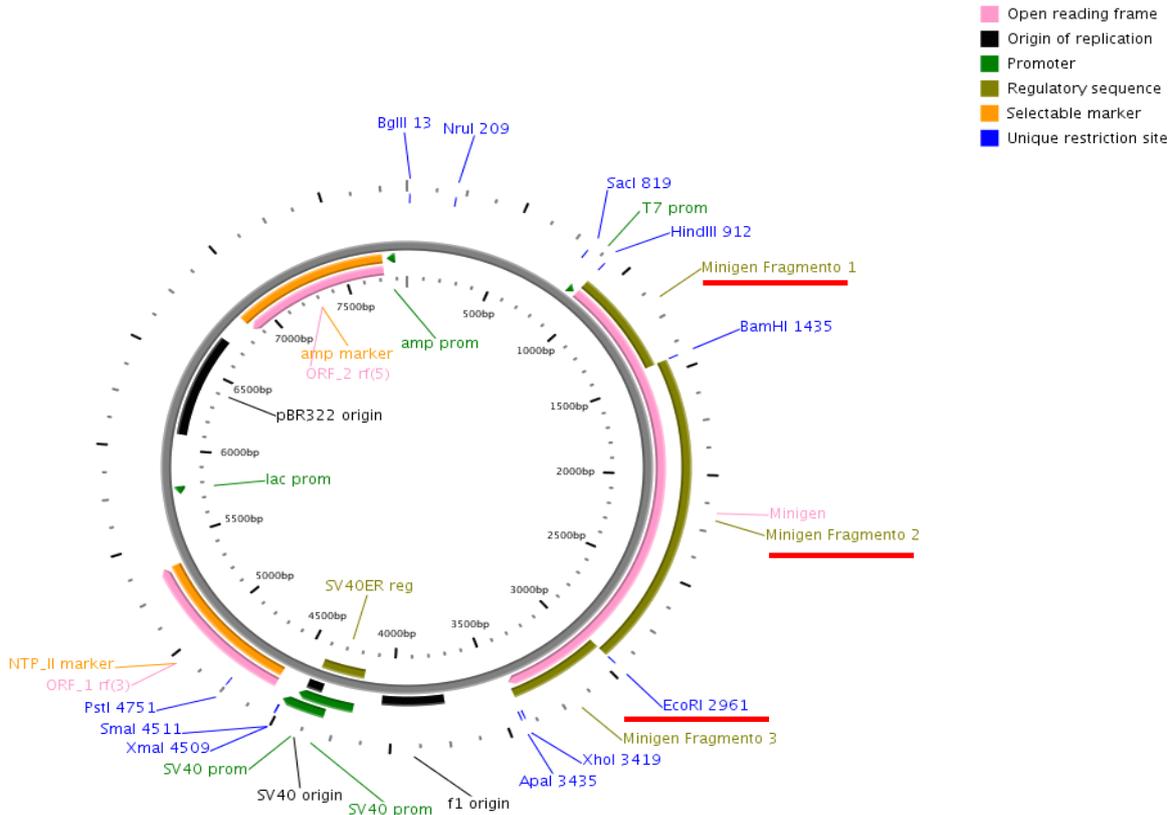


Figura 23. Mapa de la construcción del minigen clonada en el vector pcDNA3.1 en donde las barras verdes militar representa cada uno de los fragmentos que fueron clonados. Las líneas rojas indican la posición de cada uno de los fragmentos que conforman el minigen.

## 6.2 Expresión del minigen en células HeLa

El objetivo de la transfección fue verificar si el minigen sufre el mismo procesamiento de splicing alternativo que el ARNm endógeno de survivina, se ocupó como control el vector vacío de pcDNA 3.1; se utilizaron primers específicos que solo hibridan en el vector, los oligos fueron T7 y el BGH, estos se describieron ya en la parte de metodología, esto para asegurar que solo amplificaríamos el minigen y no la survivina endógena.

En la figura 24 podemos observar el RT-PCR de la transfección del minigen en células HeLa, se utilizó un marcador de 50 pb para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos. Como se puede observar se expresaron dos bandas, que correspondían a la isoformas SurM que contiene los exones 2,3 y 4, y la isoforma SDx3M que contiene los exones 2 y 4, ya que por splicing alternativo pierde el exón 3. La isoforma SurM representa a la survivina endógena,

mientras que la isoforma SDx3M representa a la isoforma survivina DEx3 ya que pierde el exón 3. Además en la figura 24 se puede observar una banda de menor peso, que se localiza a la derecha de la imagen, esta corresponde al sitio de clonación múltiple del vector, este control ayudo a verificar que solo se amplificó al minigen y no a la survivina endógena.



Figura 24. RT-PCR de la expresión del minigen. Para las reacción de RT-PCR se sacaron alícuotas a los 30, 35 y 40 ciclos, se utilizó el vector vacío (pcDNA3.1) como control, este tenía la finalidad de verificar que los oligos amplificarían exclusivamente al minigen. A la izquierda se muestra un esquema de los exones que contiene cada una de las dos isoformas generadas por splicing alternativo. SurM (corresponde a la isoforma que contiene los exones 2, 3 y parte del exón 4), SDx3M (corresponde a la isoforma que contiene los exones 2 y parte del exón 4).

Las dos bandas obtenidas fueron enviadas a secuenciar para validar el correcto empalme de los exones. Como se observa en la figura 25, el resultado de la secuenciación confirmó que la banda superior correspondía a la isoforma SurM, esto al comparar la secuencia de los exones 2, 3 y 4 de la survivina endógena con el resultado de la secuenciación, mientras que la banda inferior correspondía a la isoforma SDx3M.

Azul = Exon 2  
Rojo = Exon 3  
Amarillo = Exon 4

## Isoforma SurM

```
NCTTACTCACGANCTGTGCTGTCCCTTGCAGATGGCCGAGGCTGGCTTCATCCN
CTGNNCCACTGAGAACGAGCCAGACTTGGCCCAGTGTTTCTTCTGCTTCAAGGA
GCTGGAAGGCTGGGAGCCAGATGACGACCCCATNNANGNNNANNNAAANGNNTTC
NNCNNNTTGCCTTTCCCTTCTGTNANAAAGNAGTTTGAANAATTAACCCCTGG
NGAATTTTTGAAACTGACNNAGAANGANCCNANANCNAANNTGNNNNGGANACC
NACNNTNNNAANAANAATAATTNGANGAACTGCNNAGAANNTGNGCCNNGNCNTC
GANNANNTNGCTGCCATGGATTGAGGCCTCTGGCCGGAGCTGCCTGGTCCCAGA
GTGGCTGCACCACTTCCCTCGAGTCTAGAGGGCCCGNTTAAACCCGCTGATCAN
CCTCGACTGTGCCTTCTAA
```

Azul = Exon 2  
Rojo = Exon 4

## Isoforma SDx3M

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTTACTCACGAGCTGTGCTGTCCCTTGCAGAT
GGCCGAGGCTGGCTTCATCCNCTGCCCACTGAGAACGAGCCAGACTTGGCCCA
GTGTTTCTTCTGCTTCAAGGAGCTGGAAGGCTGGGAGCCAGATGACGACCCCAT
GCAAAGGAAACCAACAATAAGAAGAAAGAAATTTGAGGAACTGCGAAGAAAGTG
CGCCGTGCCATCGAGCAGCTGGCTGCCATGGATTGAGGCCTCTGGCCGGAGCTG
CCTGGTCCAGAGTGGCTGCACCACTTCCCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAA
CCCGCTGATCAGCCTCNACTGTGCCTTCTAA
```

Figura 25. Resultado de la secuenciación Sanger de las dos isoformas obtenidas mediante el splicing alternativo del minigen.

Este resultado mostro que la construcción del minigen sufría un procesamiento de splicing similar al que es sometido el pre-ARNm endógeno de la survivina, por lo que los elementos regulatorios tanto en *cis* como en *trans* que regulan el splicing de la survivina endógena se conservaron en la construcción denominada minigen.

Una vez que se determinó que el minigen era una buena herramienta para entender el proceso de splicing alternativo de la survivina, el siguiente paso fue determinar si los niveles de expresión de ambas isoformas del minigen, eran similares a la expresión de las isoformas endógenas. Se ha reportado que los niveles de expresión de la survivina siempre son más altos respecto a la survivina DEx3. De igual manera al realizar el análisis densitométrico de las

isoformas del minigen, se pudo observar que aunque los niveles de expresión global fueron menores respecto a la expresión de las dos isoformas endógenas, la relación entre ambas isoformas SurM y SDx3M fue de 3:1 como se puede observar en la figura 26 prevaleciendo la expresión de la isoforma SurM; por lo cual el minigen también conservó esta relación de expresión y por lo tanto es una buena herramienta para determinar los posibles elementos que participan en la regulación del splicing alternativo de la survivina DEx3.

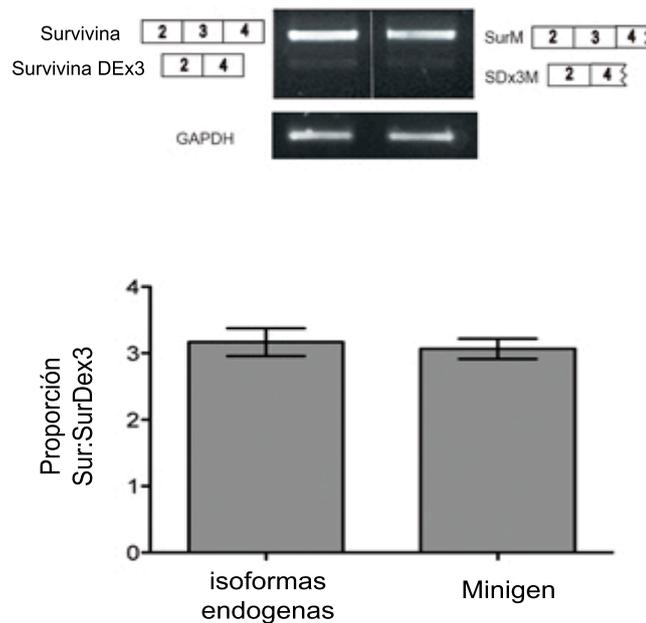


Figura 26. Análisis de la expresión por RT-PCR del minigen y de las isoformas endógenas generadas por splicing alternativo, se utilizó oligos específicos para cada caso (panel superior). La grafica de barras muestra la expresión relativa de las isoformas endógenas y del minigen (panel inferior). (media  $\pm$  DS n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo.

### 6.3 Análisis bioinformático

Para poder identificar las posibles regiones en *cis* involucradas en el splicing alternativo del exón 3 de la survivina, se llevó a cabo un análisis bioinformático con los softwares mencionados en el apartado de material y métodos. Se analizaron por separado los dos intrones que se incluyeron en el minigen, así como el exón 3.

Como se puede observar en la figura 27 los elementos regulatorios del splicing mostraron una tendencia a agruparse para formar clusters de secuencias



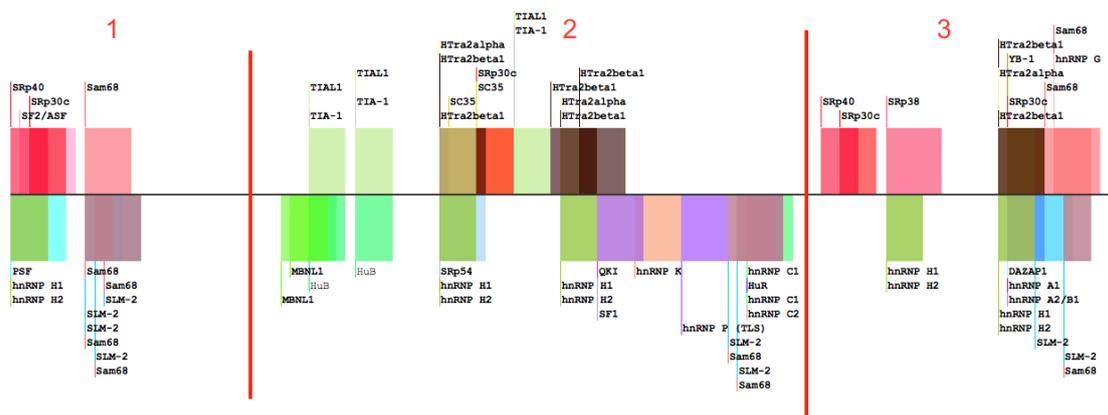


Figura 28. Análisis bioinformático del exón 3. Cada número representa la delección que se realizó en el exón, las líneas rojas delimitan cada zona. Como se puede observar en el esquema los sitios consenso al igual que las factores trans tienden a agruparse en regiones definidas.

Una vez determinadas las regiones, se continuó con la evaluación del efecto de las delecciones en el splicing alternativo del exón 3 del minigen.

#### 6.4 Determinación de los elementos cis intrónicos

Se realizaron 14 deleciones en total, 7 deleciones río arriba y 7 deleciones río abajo del exón 3 cada deleción fue nombrada del  $\Delta I1$  al  $\Delta I14$ . Todas las deleciones se validaron por secuenciación Sanger (Figura 29). Se cuidaron los sitios conservados del splicing, estos se localizan 60pb río arriba del exón 3 y comprenden el tracto de polipirimidinas, el punto de ramificación, y los sitios 5' y 3' del splicing, así como 10pb río abajo del exón 3, ya que se ha reportado que si se alteran estas secuencias el splicing alternativo se ve afectado.

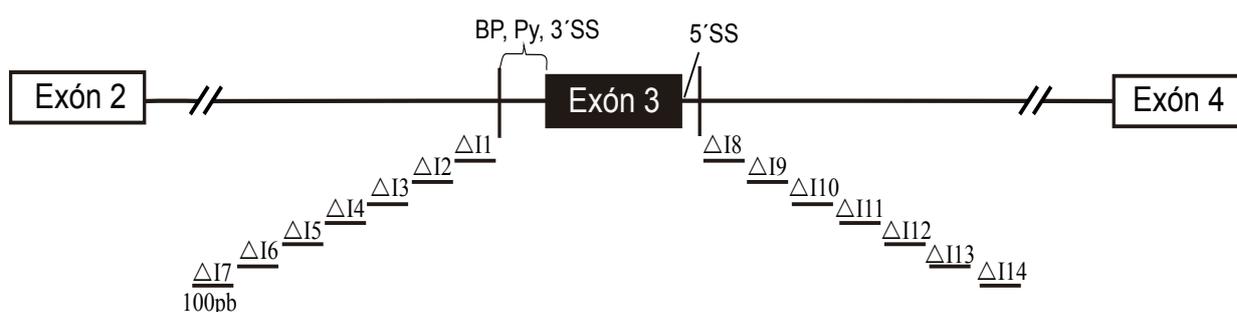


Figura 29. Esquema de las deleciones realizadas en los intrones aledaños al exón 3 del minigen. BP (por sus siglas en inglés Branch point: corresponde al sitio de ramificación, Py: es una región rica en polipirimidinas, 3'SS : sitio de splicing 3', 5'SS: sitio de splicing 5'.

Una vez secuenciadas, cada deleción fue transfectada en células HeLa, y posteriormente se analizó por RT-PCR el efecto que tuvieron en la expresión de las isoformas SurM y SDx3M y por ende en la regulación del splicing alternativo del exón 3.

En el caso de las deleciones  $\Delta I1$  a la  $\Delta I7$  se pudo observar que las deleciones  $\Delta I1$  y  $\Delta I2$  presentaron un cambio significativo en la proporción de la expresión de las dos isoformas, incrementándose la expresión de la isoforma SDx3M, por lo que este resultado sugirió que estas primeras 200pb cercanas al exón 3 tenían un papel importante en la regulación del splicing del exón. Por lo que respecta a la isoforma SurM no se observó un cambio en la expresión de esta isoforma. Esto correlacionó con lo ya reportado de que en las primeras 300 pb se localizan los principales elementos regulatorios del exón que sufre splicing. Para el caso de las deleciones de la  $\Delta I3$  a la  $\Delta I7$  se pudo observar que no hubo cambios significativos, aunque si hubo un ligero aumento en la expresión

de la isoforma SurM, por lo que estas regiones que abarcan alrededor de 300 pb cerca del exón 3 pueden tener secuencias regulatorias que favorecen a la survivina (Figura 30).

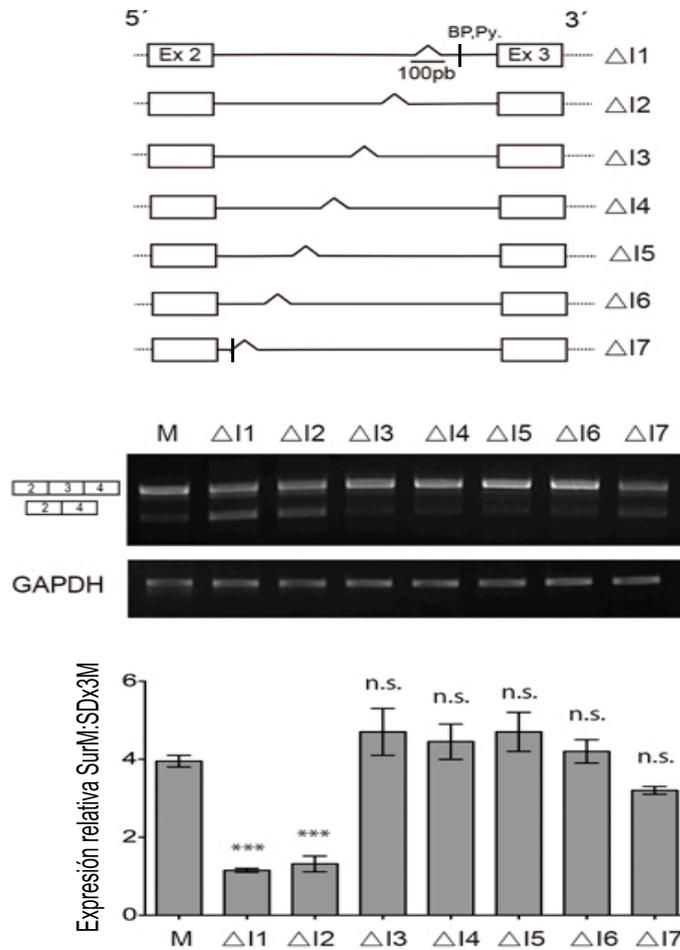


Figura 30. Efecto de las secuencias intrónicas río arriba del exón 3 sobre la expresión de las isoformas del minigen. Esquema de las primeras 7 deleciones en el intrón ( $\Delta 11$  al  $\Delta 17$ ) río arriba del exón 3 (panel superior). RT-PCR representativo de las células HeLa transfectadas con las construcciones  $\Delta 11$  al  $\Delta 17$  (panel intermedio). M (control): minigen. La gráfica de barras representa la expresión relativa de las isoformas SurM:SDx3M, afectada por las deleciones. (media  $\pm$  DS n=3) (panel inferior). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía reportando los valores-p. \* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

En las deleciones río abajo del exón 3 se observó que al eliminar las primeras 100pb río abajo del exón 3 ( $\Delta 18$ ) hubo un cambio significativo en la proporción de las isoformas, favoreciendo la expresión de la isoforma SDx3M, recordemos que esta es la que pierde el exón 3, por lo cual esta región aunada a los primeros 200pb río arriba pueden tener un papel importante en la regulación del exón 3. Algo interesante que podemos observar es que en esta región río abajo del exón 3 la expresión de la SurM tiene un aumento significativo en su

expresión de la delección  $\Delta I9$  a la  $\Delta I14$ , excluyendo la delección  $\Delta I13$  la cual no presenta cambios significativos, por lo que ambos intrones pueden estar regulando la expresión de la isoforma SurM aunque faltarían varios experimentos para poder corroborar esta idea. (Figura 31).

Podemos concluir que las primeras 200pb río arriba y 100pb río abajo del exón 3 juegan un papel específico en la regulación del splicing alternativo de la isoforma SDx3M ya que esta es la única isoforma que se ve afectada de manera significativa en estas regiones.

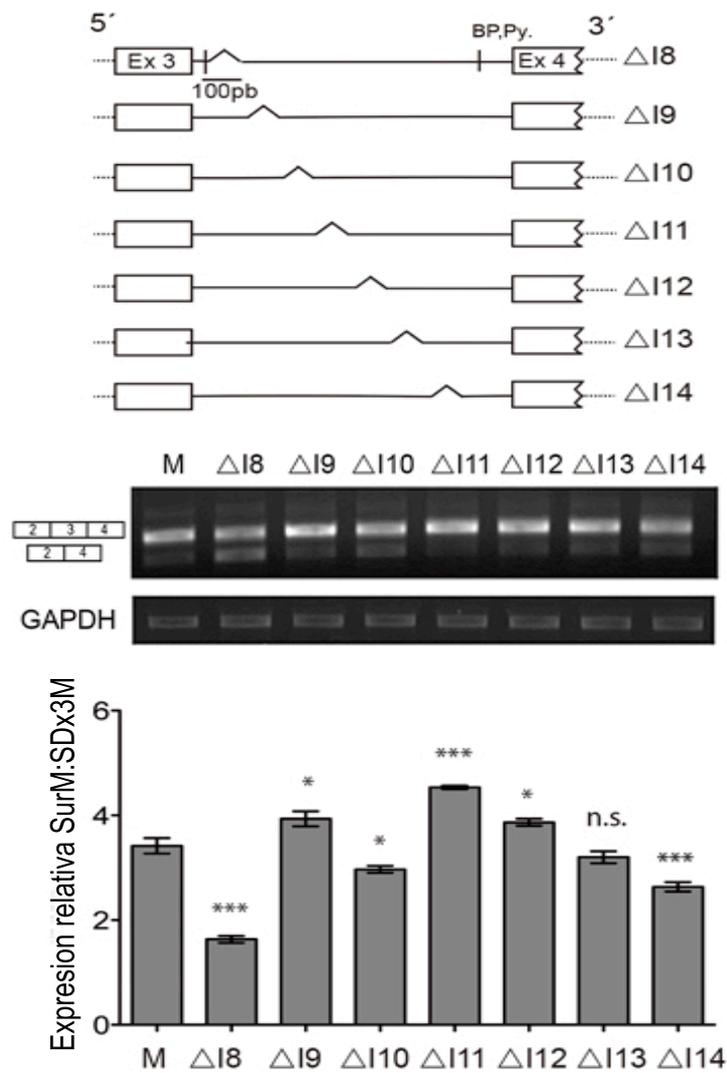


Figura 31. Efecto de las secuencias intrónicas río abajo del exón 3 sobre la expresión de las isoformas del minigen. Esquema de las primeras 7 delecciones en el intrón ( $\Delta I8$  al  $\Delta I14$ ) río arriba del exón 3 (panel superior). RT-PCR representativo de las células HeLa transfectadas con las construcciones  $\Delta I8$  al  $\Delta I14$  (panel intermedio). M (control): minigen. La gráfica de barras representa la expresión relativa de las isoformas SurM:SDx3M, afectada por las delecciones. (media  $\pm$  DS n=3) (panel inferior). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía reportando los valores-p. \* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

## 6.5 Determinación de los elementos *cis* exónicos

Para analizar la participación de los elementos *cis* exónicos en la regulación del splicing del exón 3 de la survivina, se diseñaron 3 deleciones denominadas Ex3 $\Delta$ 1 que pierde de 22pb , Ex3 $\Delta$ 2 que pierde 49pb y Ex3 $\Delta$ 3 que pierde 37pb, esto con base al análisis bioinformático previamente descrito. Se siguió la misma metodología que en la deleciones de los intrones, para el diseño de estas deleciones se tuvo la precaución de dejar 5 pares de bases al inicio y al final del exón 3 con el fin de no alterar los sitios conservados del splicing y con esto tener un sesgo, ya que como se había mencionado antes, una alteración en estos sitios afectara el splicing alternativo del exón. En la figura 32 podemos observar el esquema de las 3 deleciones en el exón 3, cada deleción fue transfectada en células HeLa, posteriormente se realizó RT-PCR con el fin de evaluar el efecto sobre la inclusión o exclusión del exón 3.

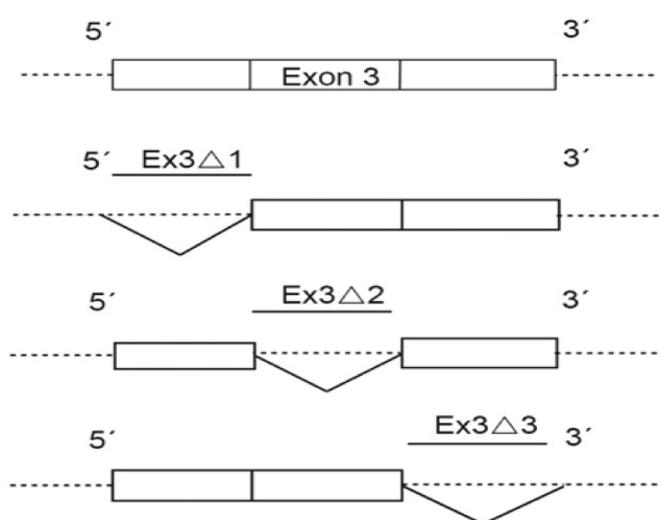


Figura 32. Esquema de las deleciones realizadas en el exón 3 del minigen.

Se observó como las deleciones en el exón tuvieron un efecto en la proporción de las isoformas SurM y SDx3M, aún mayor que el observado con las deleciones en el intrón. Con estas construcciones se notó un incremento en la expresión de la SDx3M aunque en diferente proporción y por lo tanto una modificación en la exclusión del exón 3. En la deleción Ex3 $\Delta$ 3 se observó un aumento de la isoforma SDx3M, aunque la proporción de ambas isoformas fue 1:1, en el caso de la deleción Ex3 $\Delta$ 2 hubo un aumento en la proporción de la

isoforma SDx3M de 2 veces más respecto a la isoforma SurM. La delección Ex3Δ1 mostró el efecto mas grande en cuanto a la modificación de la proporción de ambas isoformas, ya que se observó un aumento en la expresión de casi 10 veces más SDx3M que SurM, por lo cual se seleccionaron estos primeros 22pb, para profundizar el estudio del splicing alternativo del exón 3.

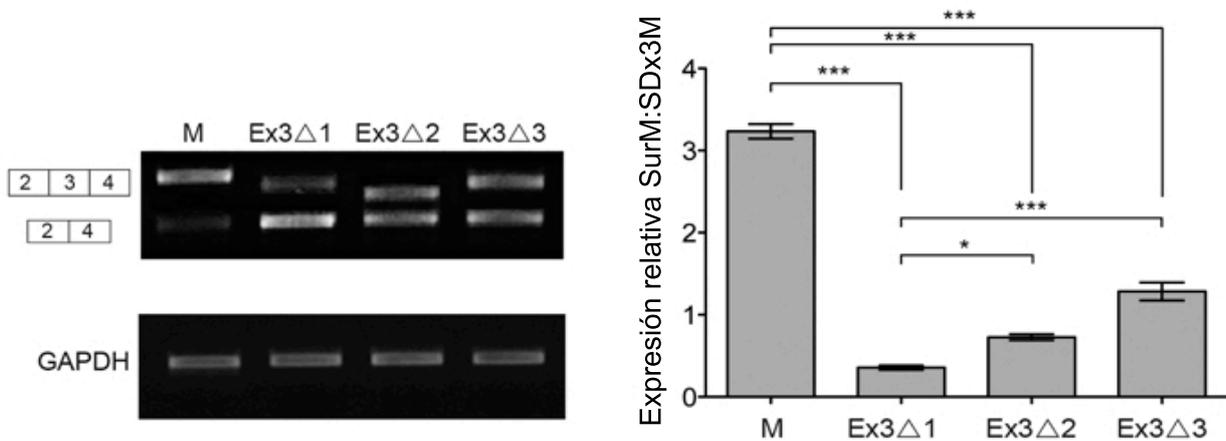


Figura 33. RT-PCR representativo de las células HeLa transfectadas con las construcciones de las delecciones Ex3Δ1, Ex3Δ2, Ex3Δ3 (panel izquierdo) utilizando a M: minigen como control. La gráfica de barras representa la expresión relativa de las isoformas SurM:SDEx3M, afectada por las delecciones realizadas en el exón 3. (media ± DS n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía reportando los valores-p. \*p<0.005, \*\*\*p<0.001, n.s. no significativo.

No se descarta el efecto observado con las delecciones Ex3Δ2, Ex3Δ3, las cuales modificaron la proporción de la expresión de las dos isoformas, ya que estas regiones pudieran estar participando tal vez de una manera accesoria, pero no por eso menos importantes en la regulación del splicing alternativo del exón 3.

Adicional a las delecciones del exón 3, se realizó un alineamiento de las primeras 22pb. Se utilizó la secuencia de 15 especies diferentes, y se analizaron con el software Weblogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>); en donde se observó cómo esta región tiene un alto grado de conservación, por lo que esto sugiere que un cambio en la secuencia podría afectar el

reconocimiento de los factores *trans* hacia su región consenso *cis* y con esto afectar el splicing alternativo del exón. (Figura 34)

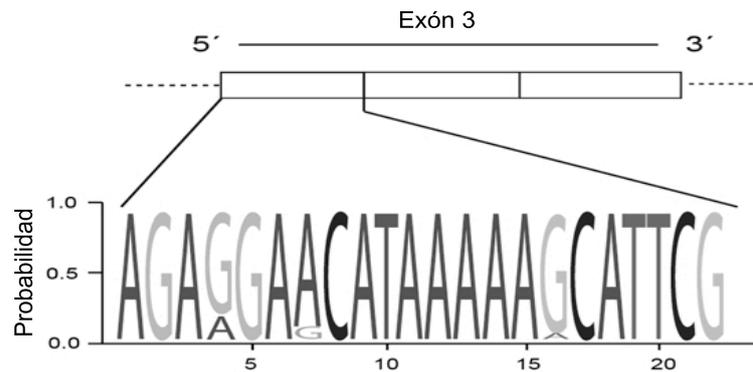


Figura 34. Alineamiento de las primeras 22pb del exón 3, proveniente de 15 especies diferentes utilizando el software WebLogo.

### 6.6 Mutaciones en los elementos *cis* exónicos que afectan el splicing alternativo del exón 3

Debido a los resultados anteriores, en donde se observa que la delección Ex3 $\Delta$ 1 incrementa la expresión de la isoforma SDx3M y por lo tanto incrementa la exclusión del exón 3, se decidió dividir las primeras 22pb del exón en tres regiones denominadas ExR1, EXR2 y ExR3, como se puede observar en la figura 35. Al realizar el análisis *in silico* de cada región se lograron identificar los posibles elementos en *trans* que interactúan con cada región. Se puede observar como los elementos en *trans* tienden a agruparse en cluster, por lo que esto facilitó el diseño de las mutaciones que alteraran sus sitios consenso de reconocimiento.



Figura 35. El diagrama del exón 3 del minigen muestra la posición de las mutaciones diseñadas en las primeras 22pb de bases del exón, así como la división por regiones las cuales se denominaron ExR1, ExR2 y ExR3. Sobre la secuencia del exón 3 se indican las bases que fueron mutadas.

Se plantearon una serie de mutaciones en las primera 22pb, denominadas Mut1Ex3, Mut2Ex3 y Mut3Ex3, cada mutación corresponde a una de las regiones en las cuales se dividieron las 22pb del exón 3 .

Las mutaciones se realizaron alterando el sitio consenso de cada uno de los posibles elementos *trans*, a fin de evitar la unión de cualquiera de estos. Las mutaciones fueron validadas *in silico*, para asegurar que el cambio de las bases no generara algún sitio de reconocimiento nuevo, así como también que las proteínas predichas ya no se unieran más a estas regiones.

Las construcciones con cada una de las mutaciones fueron transfectadas en células HeLa y mediante RT-PCR se observó el efecto que estas mutaciones tuvieron sobre la regulación en la inclusión o exclusión del exón 3. Como se puede observar en el RT-PCR de la figura 36, la construcción Mut1Ex3 y Mut3Ex3 incrementaron ligeramente la expresión basal de la isoforma SDx3M, por lo que estas regiones pudieran tener alguna papel en la regulación de esta isoforma, aunque los cambios no fueron significativos en estas dos mutaciones. La mutación Mut2Ex3 (región ExR2) tuvo un cambio totalmente inesperado ya que indujo un incremento dramático en la expresión de la isoforma SurM y una

disminución de la isoforma SDx3M, casi al grado de inhibir por completo a esta última. Este resultado contrastó lo observado con la delección Ex3Δ1, en donde se vio un aumento de la isoforma SDx3M, por lo que se consideró que la región ExR2 tenía un papel en la exclusión del exón 3. Lo anterior debido a que al estar mutado el sitio no puede unir ninguna proteína accesoria (elementos *trans*) que bloquee el reconocimiento del exón 3 y por lo tanto siempre es reconocido e incluido en la secuencia (Figura 36).

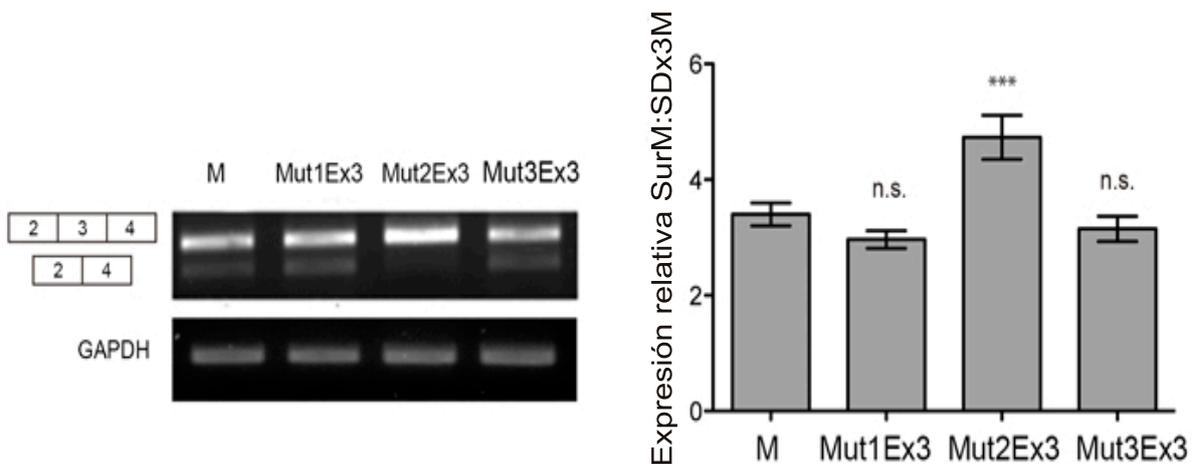


Figura 36. Efecto de las mutaciones en la región de 22pb del exón 3 en la expresión de las isoformas del minigen. RT-PCR representativo de las células HeLa transfectadas con las construcciones que poseen las mutaciones, en donde se puede ver el efecto en la proporción de las isoformas SurM y SDx3M. Se utilizó como control M: minigen (panel izquierdo). La gráfica de barras representa la expresión relativa de las isoformas SurM:SDx3M, evaluada después de la transfección de las construcciones con las mutaciones descritas (panel derecho). (media  $\pm$  DS n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía reportando los valores-p. \*\*\*p<0.001, n.s. no significativo

Al observar el resultado de la Mut2Ex3, se consideró que probablemente las regiones aledañas, ExR1 y ExR3, pudieran participar en la regulación del exón 3 de manera conjunta, ya que cuando se mutaron de manera individual no presentaron un efecto sobre la expresión de las isoformas. Por los motivos anteriores surgió la hipótesis de que si se mutaban las dos regiones, ExR1 y ExR3, al mismo tiempo se podría revertir el efecto, y favorecer la pérdida del exón 3, ya que la región ExR2 quedaría disponible para el factor que regula la exclusión del exón; por lo cual se diseñó una doble mutación denominada MutDobEx como se puede observar en el esquema de la figura 35.

La construcción MutDobEx se transfectó en células HeLa y mediante RT-PCR se evaluó el efecto de la doble mutación. El resultado confirmó que las regiones ExR1 y ExR3 tenían un papel antagonista sobre la región ExR2. Las dos regiones, ExR1 y ExR3, favorecen el reconocimiento del exón 3, ya que al mutar estas dos regiones se observó un incremento en la isoforma SDx3M y una disminución de la isoforma SurM. Por lo tanto la región ExR2 es probablemente la encargada de regular la exclusión del exón 3 de la survivina (figura 37).

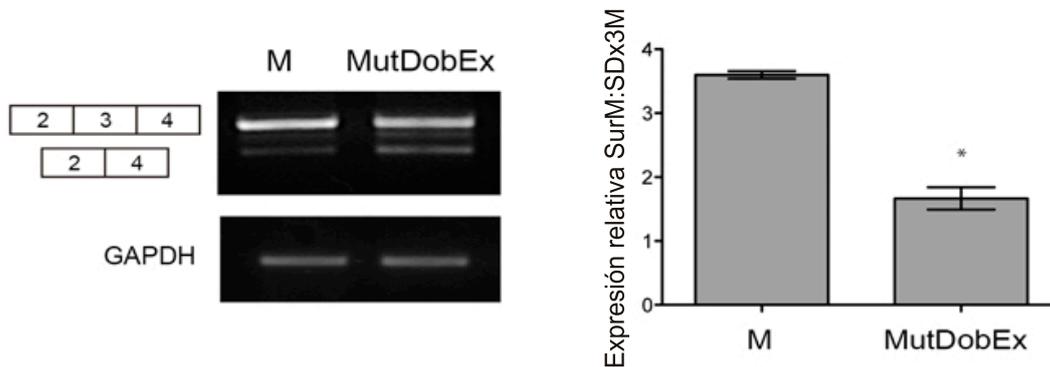


Figura 37. Efecto de la doble mutación realizada en las regiones ExR1 y ExR3, localizadas en los primeros 22pb del exón 3. RT-PCR representativo de las células HeLa transfectadas con la construcción que poseen las doble mutación, donde se puede observar el efecto sobre la expresión de las isoforma SurM y SDx3M. se utilizó como control M: minigen (panel izquierdo). La gráfica de barras representa la expresión relativa de las isoformas SurM:SDx3M, después de la transfección con la construcción MutDobEx (panel derecho). (media  $\pm$  DS, n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística t-student reportando los valores-p. \*p<0.005.

Además de la validación por RT-PCR se optó por un método más cuantitativo, qPCR, en el cual solo se evaluó la expresión de la isoforma SDx3M. Los resultados correlacionaron con lo observado con el PCR semi cuantitativo. Como se puede observar en la gráfica de la figura 38, hubo un incremento en la tasa de cambio de la isoforma SDx3M de 2 veces más respecto al control que fue el minigen (M), por lo que el aumento de la isoforma SDx3M correlacionó con lo observado en el RT-PCR.

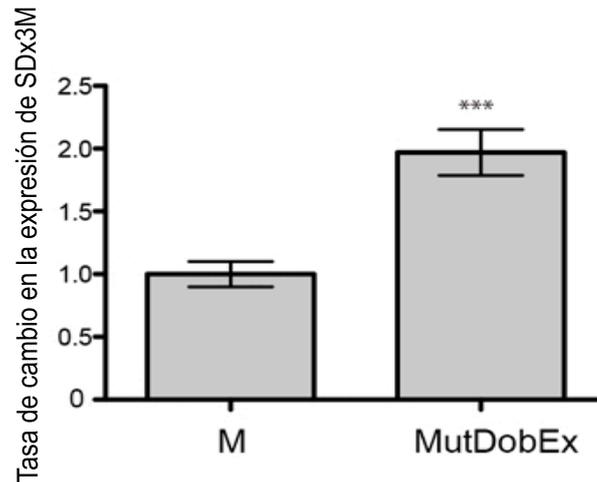


Figura 38. La gráfica de barras muestra la tasa de cambio del ARNm de la isoforma SDx3M, determinada a través de qPCR, después de haber trasfectado a las células HeLa con las construcciones de M: minigen (control) y MutDobEx. GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística t-student reportando los valores-p. \*\*\* $p < 0.001$ .

Con los resultados anteriores, se concluyó que las primeras 22pb del exón 3 juegan un papel importante en la inclusión o exclusión del exón, ahora bien cabe recordar que estos elementos en *cis* tienen una interacción directa con elementos en *trans*, llámense proteínas SR o hnRNPs, por lo que es importante determinar que elementos en *trans* están interactuando con estas primeras 22pb.

### **6.7 Identificación de los elementos *trans* que regulan el *splicing* alternativo del exón 3 de la *survivina*.**

Para la identificación de las proteínas (elementos *trans*) que pudieran estar interactuando en los primeros 22 pb del exón 3, se tomó en cuenta el análisis bioinformático realizado previamente en donde surgieron los posibles candidatos (figura 39).

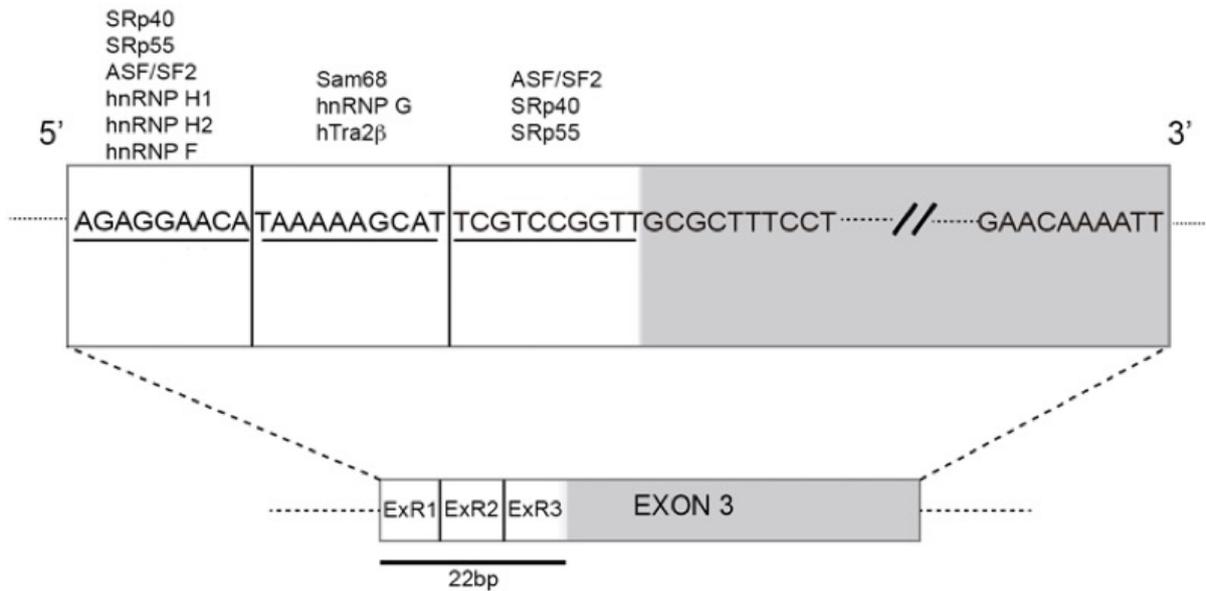


Figura 39. Diagrama del exón 3 del minigen. Se muestra la posición de los potenciales factores *trans* (proteínas SR, hnRNP y proteínas STAR) en las primeras 22pb de bases del exón

De los 9 posibles candidatos, se evaluaron inicialmente las proteínas SRp40, SRp55, hnRNP H1, hnRNP H2 y hnRNP F. Se diseñaron ARNs de interferencia contra las 5 proteínas candidato y estos fueron transfectados en las células HeLa, mediante RT-PCR se analizó la eficiencia del ARN de interferencia para cada candidato. Se observó que todos los ARNs de interferencia tuvieron una inhibición de la expresión del mensajero de más del 50%. (Figura 40)

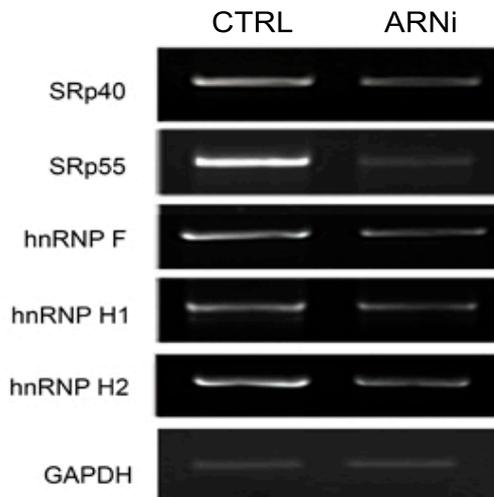


Figura 40. RT-PCR representativo de la inhibición de las ARNm de SRp40,SRp55,hnRNP F, hnRNP H1 y hnRNP H2). Como control (CTRL) se utilizó el vector pSiren con una secuencia clonada de luciferasa. GAPDH se utilizó como gen constitutivo y como control de carga.

Una vez validada la eficiencia de inhibición de los ARNi , se analizó el efecto que esta tenía en la expresión de las isoformas del minigen , por lo que se realizó una línea estable para la expresión de minigen, a esta línea se le transfectaron los ARNi y por RT-PCR se analizó la expresión de las isoformas del minigen. Como se puede observar en la figura 41, solo los ARNi contra las proteínas SRp55 y hnRNP H1 tuvieron un efecto en la expresión de ambas isoformas. El ARNi de SRp55 indujo un aumento significativo en la expresión de la isoforma SurM pero no hubo ningún efecto sobre la isoforma SDx3M, por lo que esta proteína posiblemente esté involucrada en la regulación del splicing de la survivina tipo y no así de la survivina DEx3.

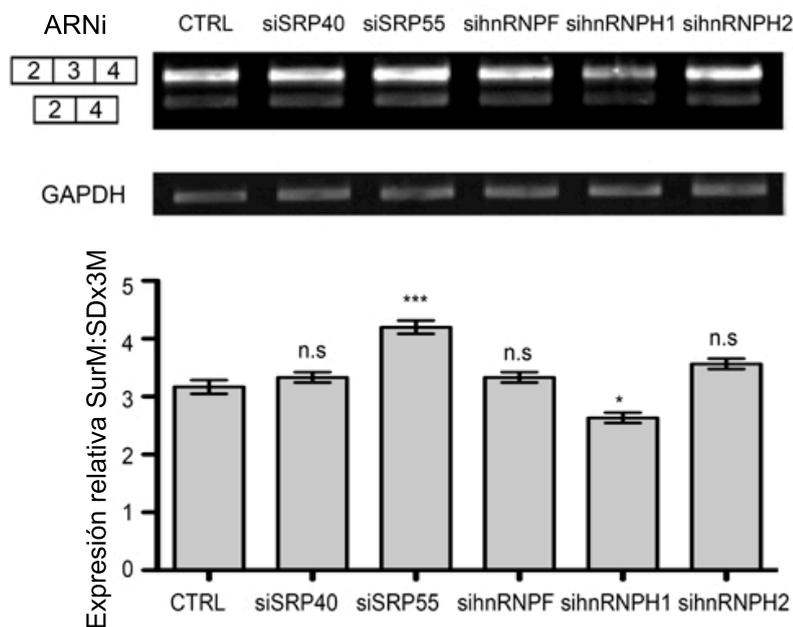


Figura 41. Análisis del efecto de los ARNs de interferencia en la expresión de las isoformas del minigen. RT-PCR del minigen en las células HeLa transfectadas con los ARN de interferencia contra los genes que se indican en la figura 40 (panel superior). La gráfica de barras muestra la expresión relativa de las isoformas SurM y SDx3M (panel inferior). (media  $\pm$  DS n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía reportando los valores-p. \*p<0.005, \*\*\*p<0.001, n.s. no significativo

En el caso de la inhibición de la proteína hnRNP H1, se observó una disminución significativa en la expresión de las isoformas SurM y SDx3M, por lo que es posible que hnRNP H1 no estuviera participando en la regulación del

splicing alternativo, si no en algún otro proceso como puede ser exporte, estabilidad o protección de la degradación del ARNm. Con los resultados obtenidos se descartó la participación de estas 5 proteínas en la regulación del splicing alternativo del exón 3 del minigen y por lo tanto de la survivina

Para validar los candidatos restantes se optó por realizar la técnica de pull down de ARN con el fin de analizar si las proteínas Sam68, ASF/SF2, hTra2B o hnRNP G se unían a esta región. Para este fin se diseñaron dos juegos de sondas de ARN; el primer juego contenía la sonda con la secuencia sin mutar (WT) denominada WTEEx3 y una sonda con la mutación de la región ExR2 denominada M2Ex3 (figura 42). Las sondas fueron incubadas con proteína total de las células HeLa, posteriormente se eluyeron las proteínas unidas a la sonda y por medio de Western blot se identificaron a las proteínas. Como se puede observar en la figura 42, de las proteínas evaluadas solo la proteína Sam68 se unió a la sonda WTEEx3 pero no se unió a la sonda M2Ex3 que es la que tiene mutado el sitio consenso, lo cual sugirió que Sam68 posiblemente era la proteína que se unía a la región ExR2 regulando así la exclusión del exón 3.

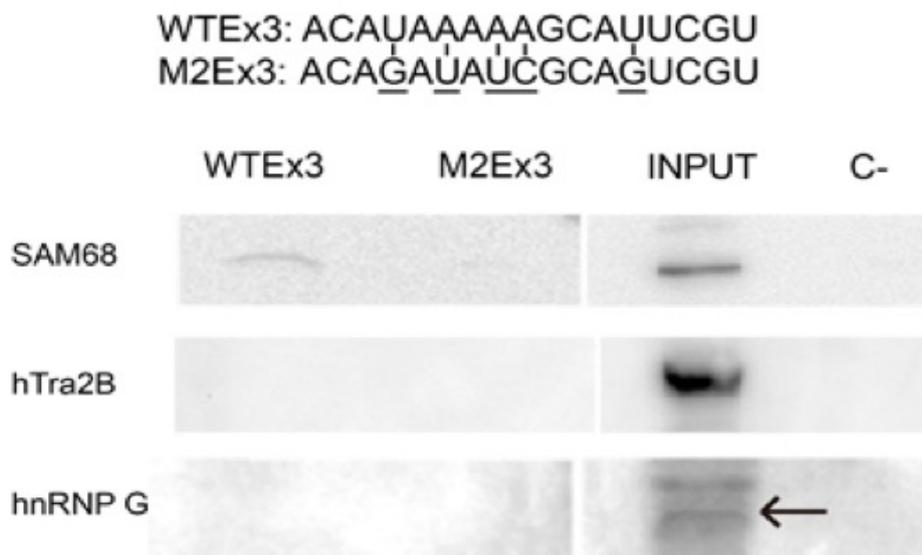


Figura 42. Sam68 se une a las primeras 22pb del exón 3. Secuencia de las sondas de ARN utilizadas para realizar el ensayo de pulldown, WTEEx3: corresponde a la secuencia wt de la región ExR2, M2Ex3: corresponde a la mutación en la región EXR2 que afecta el sitio de unión de los elementos *trans*, las bases mutadas se encuentran subrayadas (panel superior). Western blot del ensayo de pull down, se utilizó un control positivo (INPUT) que fue proteína total y un control negativo C- que fue el último lavado de las sondas utilizadas en el pull down (panel inferior) la flecha indica la posición de la proteína hnRNP G.

Utilizando también el pull down de ARN, se identificaron las proteínas que se unen a la región ExR1 y ExR3, previamente en el análisis bioinformático se observó que la única proteína que se unía a ambas regiones era la proteína ASF/SF2, por lo cual se diseñaron un juego de sondas un poco más largas que abarcaban las 3 regiones ExR1, ExR2 y ExR3. Para la realización de este ensayo se utilizó la sonda con la secuencia sin mutar denominada WTL y la sonda con la doble mutación denominada DobML. Se realizó el pull down siguiendo la metodología previa, y se observó que ASF/SF2 se unía a la sonda WTL pero no así a la DobML, esto correlaciona con el análisis bioinformático previamente realizado. Debido al resultado previo, en donde se observó que la doble mutación restablecía los niveles de la isoforma SDx3M (Figura 37), se sugirió que al unirse ASF/SF2 impediría la unión de Sam68 a la región ExR2, pero al analizar el western blot del pull down para sam68 se pudo observar que esta proteína se unía a la sonda WTL aun estando presente ASF/SF2, por lo que ASF/SF2 no interfirió en la unión de sam68, lo que sugiere que alguna otra proteína podría estar interfiriendo en la unión de sam68 a la región ExR2 y con esto regular la inclusión o exclusión del exón 3. (Figura 43)

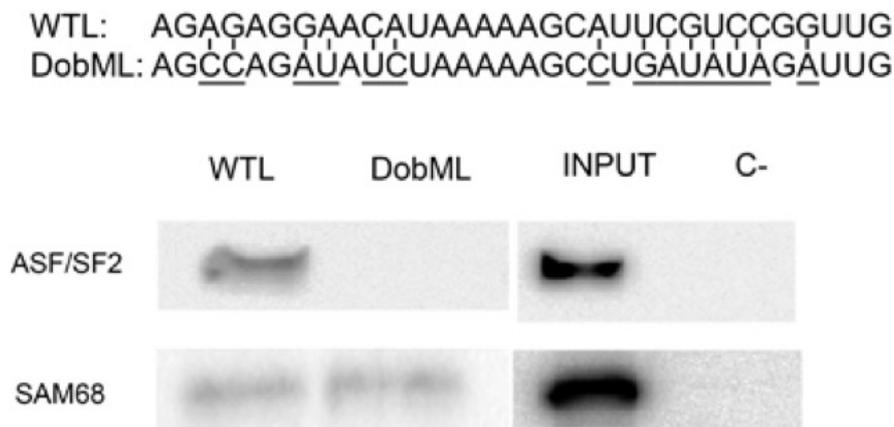


Figura 43. Unión de Sam68 y ASF/SF2 en la as primeras 22pb del exón 3. Secuencia de las sondas de ARN utilizadas para realizar el ensayo de pulldown, WTL: corresponde a la secuencia wt de las regiones ExR1, ExR2 y ExR3, DobML: corresponde a las mutaciones realizadas en las regiones ExR1 y ExR2, el subrayado identifica las bases mutadas (panel superior). Western blot del ensayo de pull down usando las sondas de ARN marcadas con biotina WTL y DobML. Las proteínas obtenidas por el ensayo de pull down fueron detectadas utilizando los anticuerpos para Sam68 y ASF/SF2 (panel inferior).

Además de que en un previo reporte se ha descrito que ASF/SF2 se une a survivina y regula la expresión transcripcional de esta proteína pero no regula el splicing alternativo, por lo cual ASF/SF2 no fue tomado como un posible factor *trans* que pudiera estar regulando el splicing alternativo de la survivina DEx3.

### **6.8 Sam68 como potencial regulador del splicing alternativo de la survivina DEx3 endógena**

Una vez que se identificó a sam68 como potencial regulador del splicing alternativo del exón 3 del minigen, se prosiguió a validar su papel en la regulación del splicing alternativo de la survivina DEx3. Para ello se diseñó un ARN de interferencia que tenía como blanco sam68 denominado siSAM1, el ARNi fue transfectado en células HeLa y se validó por Western blot la eficiencia de la inhibición; como se puede observar en la figura 44 la eficiencia de la inhibición fue de más del 50%.

Una vez validado el potencial de inhibición del ARNi sobre sam68, el siguiente paso fue determinar si sam68 participaba en la regulación de la expresión del ARNm de la survivina DEx3 endógena, por lo cual se realizó qPCR para probar esta hipótesis. Como se puede observar en la figura 44 la inhibición de la expresión de Sam68 indujo una disminución en la expresión de la survivina DEx3 en un 40% estos resultados sugirieron que Sam68 estaba involucrado en la regulación del splicing del exón 3 de la survivina endógena. Adicionalmente se realizó un Western blot de la survivina DEx3, con el fin de observar si el efecto de la disminución del ARNm de survivina DEx3 también se veía reflejado a nivel de proteína. Como se observa en la figura 44 (panel inferior derecho) la expresión de la proteína de la survivina DEx3 también se vio afectada por la inhibición de Sam68 ya que disminuyó en un 35% , esto sugirió fuertemente que sam68 esta regulando el splicing alternativo de la isoforma endógena.

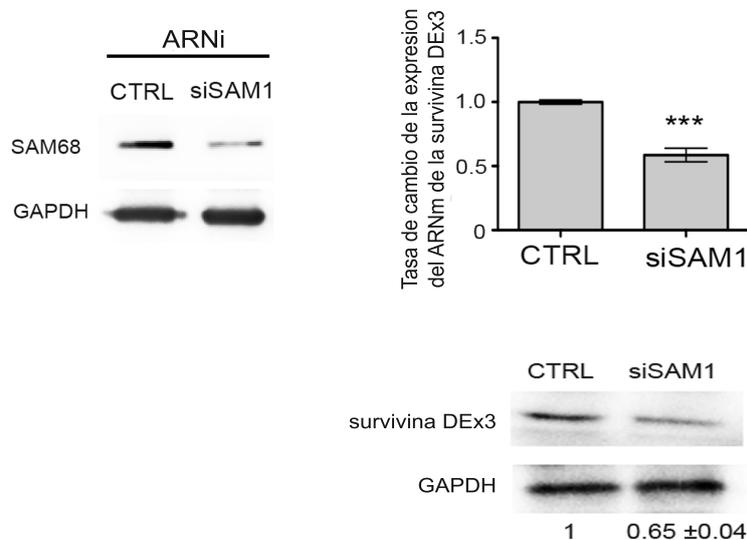


Figura 44. Sam68 regula la expresión de la survivina DEx3 endógena. Análisis por Western blot de la expresión de Sam68 en células HeLa transfectadas con el ARN de interferencia siSAM1, se utilizó la expresión de GAPDH como control interno (panel izquierdo). La gráfica de barras muestra la tasa de cambio de la expresión de la survivina DEx3 endógena determinada por qPCR después de transfectar el ARNi contra sam68 en células HeLa (media  $\pm$  DS  $n=4$ ) (panel derecho). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Western blot de la proteína survivina DEx3 en células HeLa transfectadas con el ARN de interferencia de Sam68. En la parte inferior se muestran los valores de la densitometría de 3 experimentos independientes (media  $\pm$  DS  $n=3$ ) (panel inferior derecho). Se utilizó GAPDH como control de carga. Se realizó la prueba estadística t-student reportando los valores-p. \*\*\* $p < 0.001$ .

Para evaluar el efecto fisiológico de la inhibición de Sam68 en la regulación del splicing alternativo de la survivina DEx3, se optó por la técnica CRISPR/CAS, con la cual se mutó el sitio consenso de sam68 localizado en el exón 3 de la survivina, correspondiente a la región denominada ExR2 en el minigen. Se obtuvieron clones celulares a los cuales se les nombró CrisprRH1 y CrisprRH2, se extrajo ADN genómico de estas clones y se validó por secuenciación Sanger si la mutación se había insertado correctamente (Figura 45).

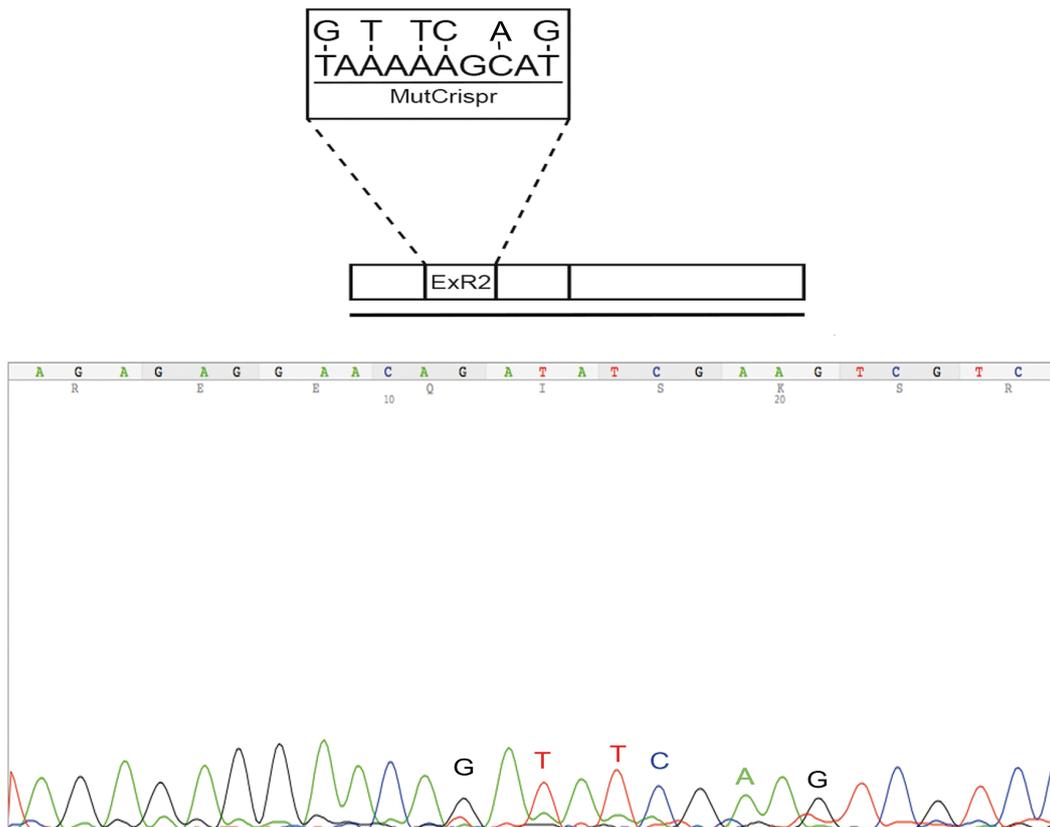


Figura 45. Mutación realizada en la región EXR2 por CRISPR/CAS. Esquema representativo del exón 3 endógeno así como también la posición de los nucleótidos cambiados en la región ExR2 (panel superior). Electroferograma de la secuenciación Sanger en la cual se muestran las bases mutadas en el exón 3 de la survivina endógena después de realizar la técnica de CRISPr/CAS en las células HeLa. La combinación de picos en cada posición de las bases que fueron mutadas muestra que se obtuvo una población heterogénea para la mutación. Las bases que fueron mutadas se muestran sobre cada pico del electroferograma (panel inferior).

Como se puede observar en el esquema de la secuenciación Sanger, la mutación estaba en el sitio correcto, aunque aparecen dos picos por cada base mutada, esto quería decir que había una población heterogénea para la mutación del sitio consenso de sam68.

Una vez validada la mutación, el siguiente paso fue verificar si la mutación afectaba la expresión de la survivina DEx3, por lo que se realizó qPCR para validarlo. Como se puede observar en la figura 46, la expresión de la survivina DEx3 disminuyó 40% en las células CrisprRH (incluye ambas clonas) respecto a las células HeLa cas9 (CTRL), por lo que se pudo concluir que el sitio de

sam68 es importante para la regulación del splicing alternativo del exón 3. Además se validó si esta disminución del ARNm también afectaba la expresión de la proteína de la survivina DEx3. Como se puede observar en la figura 46 también disminuyó la expresión de la proteína.

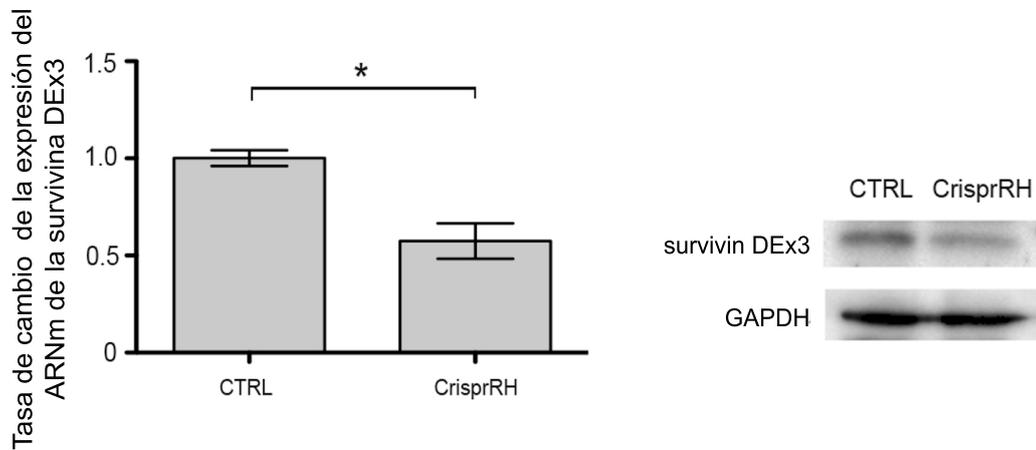


Figura 46. Efecto de la mutación del exón 3 en la expresión de la survivina DEx3 endógena. La gráfica de barras muestra la tasa de cambio de la expresión de la survivina DEx3 endógena determinada por qPCR en células HeLa Cas9 (CTRL) y HeLa CrisprRH (media  $\pm$  DS n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo (panel izquierdo). Western blot de proteínas totales de células HeLa Cas9 (CTRL) y HeLa CrisprRH (panel derecho). Se utilizó GAPDH como control de carga. Se realizó la prueba estadística t-student reportando los valores-p. \*p<0.05.

Posteriormente se evaluó si la inhibición de Sam68 con el ARNi siSAM1 tenía un efecto sobre la expresión de la survivina DEx3 en las células CrisprRH, y con esto confirmar que el sitio era el responsable de la exclusión del exón 3 y por ende de la disminución de la expresión de la survivina DEx3; por lo que las células CrisprRH fueron transfectadas con el ARNi siSAM1, se midió por qPCR la expresión de la survivina DEx3. Como se pudo observar, no hubo cambios significativos en la expresión de la survivina DEx3 al comparar las células Hela wt transfectadas con el ARN de interferencia siSAM1 y las células Hela CrisprRH-siSAM1, esto sugirió que el sitio consenso de Sam68 es importante para la regulación del splicing alternativo de la survivina DEx3 (Figura 47).

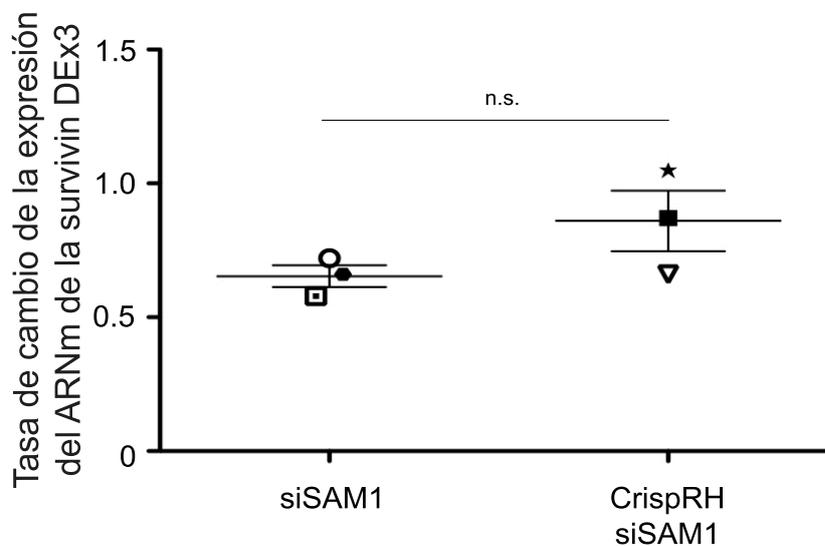


Figura 47. Efecto de la inhibición de sam68 en la expresión de la survivina Dex3 en células HeLa CrisprRH. La gráfica de dispersión muestra la tasa de cambio de la expresión de la survivina DEX3 determinada por qPCR en células HeLa y HeLa CrisprRH transfectadas con el ARN de interferencia SiSAM1 (media  $\pm$  DS n=3). GAPDH fue utilizado como control. Se realizó la prueba estadística t-student reportando los valores-p. n.s. no significativo.

Para validar este resultado se siguió la estrategia inversa, se sobreexpresó el mensajero de sam68 en células HeLa, y lo que se esperaba es que este aumento de sam68 incrementara la expresión de la survivina DEX3, ya que se favorecería la exclusión del exón 3.

En la figura 48 se muestra como la sobreexpresión de Sam68 indujo un incremento en la expresión de la survivina DEX3 de alrededor del 50%, Este resultado correspondió con los datos obtenidos al inhibir sam68 o mutar el sitio consenso. La sobre expresión de sam68 fue validada por Western blot.

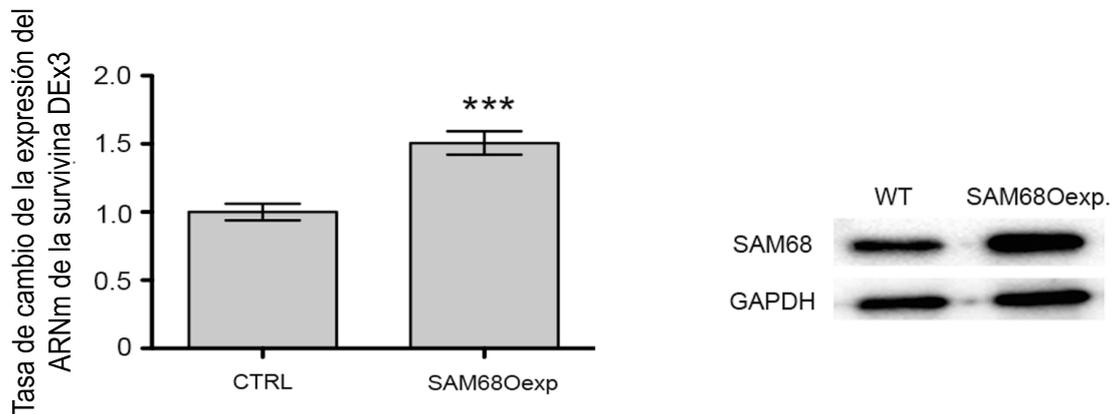


Figura 48. Efecto de la sobreexpresión de Sam68 en la expresión de la survivinaDEX3 endógena. La gráfica de barras (panel izquierdo) muestra la tasa de cambio en la expresión de la survivina DEX3 endógena determinada por qPCR después de transfectar células HeLa con la construcción que sobre expresa la proteína sam68 (Sam68Oexp) (media  $\pm$  DS n=3). GAPDH fue utilizado como gen constitutivo. Western blot (panel derecho) de proteínas totales de células HeLa transfectadas con la construcción sam68Oexp. GAPDH fue utilizado como control de carga. Se realizó la prueba estadística t-student reportando los valores-p. \*\*\*p<0.001.

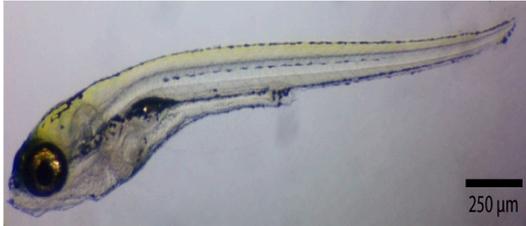
Cabe mencionar que tanto la sobreexpresión como la mutación del sitio afectaron también a la survivina tipo, aunque en mucho menor medida. Aunque en este caso son aun necesarios un mayor número de experimentos para analizar el papel que juega sam68 en la regulación de la survivina tipo y si este papel también es a través de la regulación del splicing alternativo o a través de algún otro mecanismo.

### 6.9 Efecto fisiológico de la mutación del sitio consenso de Sam68

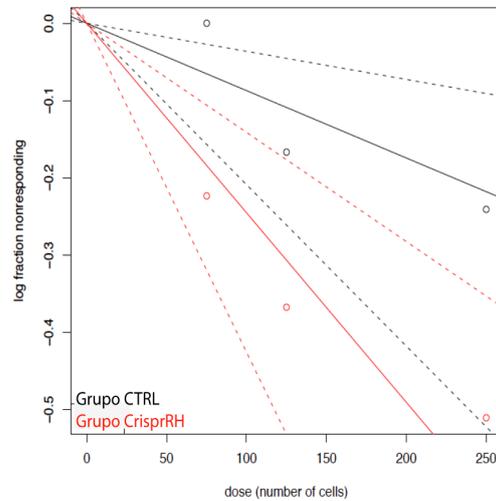
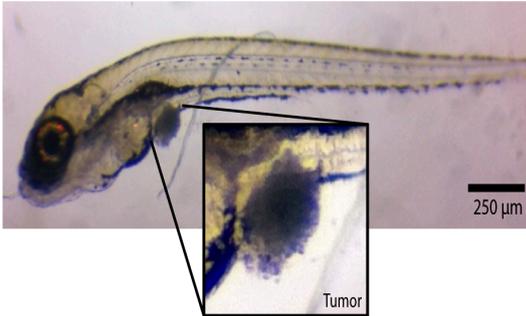
Finalmente para explorar el efecto fisiológico del sitio de unión de Sam68, se realizó una colaboración con la Dra. Cecilia Zampedri del INMEGEN. Se realizaron xenotransplantes en peces cebra. Los xenotransplantes consistieron en inyectar en los peces cebra, 3 diluciones diferentes de células CrisprRH y compararlas con las células control HeLa Cas9 (CTRL); las diluciones se muestran en la tabla de la figura 49. Se observó que 3 días post inyección

(Dpi) los peces que fueron inyectados con las células CrisprRH formaron una mayor cantidad de tumores respecto a los peces que tenían las células CTRL, esto concuerda con el trabajo previo realizado en el laboratorio, en el cual al sobreexpresar a la survivina DEx3 las células presentaron un menor potencial a formar esferoides celulares, así como una baja proliferación.

3 Dpi embriones de pez cebra xenotransplantados con células HeLa Cas9 (CTRL)



3 Dpi embriones de pez cebra xenotransplantados con células HeLa CrisprRH



P. value= 0.0378

Tratamiento	Dilución (#células)	Tumor
CrisprRH	75	3/15= 20%
	125	4/13= 31%
	250	6/15= 40%
Ctrl	75	0/15= 0%
	125	2/13= 15%
	250	3/14= 21%

Figura 49. Efecto fisiológico de la mutación en la región ExR2 del exón 3 de la survivina. Ensayo de Xenotransplantes por dilución usando un modelo de pez cebra. Desarrollo tumoral en embriones de peces cebra después de 3 días post inyección (3 dpi) con células HeLa CrisprRH y HeLa Cas9 (CTRL) (panel izquierdo). Análisis de dilución limitada obtenido con el software Extreme limiting dilution assay (ELDA), el grafico muestra el porcentaje de embriones que contienen tumores abdominales después de ser inyectados con las células CrisprRH y HeLa Cas9 (CTRL). (Panel derecho). La tabla muestra las diferentes diluciones celulares utilizadas, así como también el número de peces totales y el numero de peces con tumor.

Por lo tanto la mutación del sitio así como la de inhibición de Sam68 juegan un papel importante en la regulación del splicing alternativo de la survivina DEx3 y por consiguiente un efecto en la formación tumor.

## **7. Discusión y Conclusiones**

La generación y desregulación de diversos transcritos debido al splicing alternativo, juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer y la supervivencia del paciente, esto debido a su participación en diversos procesos carcinogénicos, tales como son la proliferación, apoptosis y metástasis.

Debido a esto, la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan el splicing alternativo abrirá nuevas caminos para entender y desarrollar nuevas estrategias de modulación de splicing y con esto revertir los efectos adversos de la enfermedad.

En el caso particular de la survivina, la expresión *de novo* de esta proteína anti-apoptótica es una característica casi universal en cáncer, ya que se ha reportado que presenta una expresión elevada en diversos tipos de cáncer como cáncer de mama, colon, pulmón, páncreas, gástrico y de vejiga, teniendo un papel muy activo en el desarrollo de las distintas enfermedades. Por lo cual esta proteína ha sido implicada en varios procesos asociados con la progresión tumoral, metástasis y angiogénesis.

La survivina además de ser una proteína clave en el proceso de apoptosis, también se ha reportado que está implicada en el proceso de mitosis, formando parte del complejo pasajero cromosomal ,ya que se ha observado que regula la correcta segregación cromosómica, así como también la citocinesis, asimismo la ausencia de esta proteína resulta en una alteración de la formación de los microtúbulos así como una aberrante citocinesis. Por lo que entender los mecanismos por los cuales se sobre expresa *de novo* es fundamental para desarrollar nuevas terapias contra la enfermedad

Además de la survivina, se han identificado cinco isoformas más, todas estas generadas por splicing alternativo, y cada una con funciones similares o antagónicas a la survivina en cuanto a su función antiapoptótica. Las isoformas

reportadas son las siguientes: survivina DEx3, survivina 2B, survivina 2 $\alpha$ , survivina 3B y la recién descrita survivina 2B + 32.

Estas isoformas presentan una expresión diferencial y esto depende del tipo y etapa del cáncer, por consiguiente, algunas isoformas son mejores marcadores diagnósticos o pronósticos que la survivina, dado que poseen una regulación así como roles más específicos dependiendo de cada tipo de cáncer.

Un claro ejemplo es la survivina DEx3, esta isoforma se crea por la pérdida del exón 3, lo que genera un nuevo carboxilo terminal en el cual se ha reportado radica su función antiapoptótica, además de que se localizan dos dominios nuevos, uno de localización nuclear y el segundo de localización mitocondrial, estos dominios no se observan en las otras isoformas. Se han reportado niveles elevados de esta isoforma en diversos tipos de cáncer como lo son: cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario y glioblastoma. Debido a que se expresa solo en algunas etapas en el desarrollo de la enfermedad, se ha propuesto que esta isoforma es un mejor marcador diagnóstico o pronóstico que la survivina en estos tipos de cáncer.

En el presente trabajo, se identificaron varias regiones importantes que regularon el splicing alternativo de la survivina DEx3. Para la identificación de estas regiones, se realizó la construcción de un minigen que contenía los elementos mínimos necesarios para llevar a cabo el splicing alternativo del exón 3. El minigen sufrió los mismo eventos de splicing que la survivina endógena, y por splicing alternativo generó 2 isoformas SurM que contiene el exón 3 y SDx3M que carece del exón 3, por lo que esta construcción tenía los elementos necesarios para llevar a cabo el splicing.

Debido a que la secuencia de los intrones era muy grande, se planteó diseñar una serie de deleciones con el fin de delimitar e identificar los posibles elementos *cis* implicados en el splicing alternativo.

Como se mencionó en los resultados, las deleciones de las regiones intrónicas ubicadas en los primeros 200pb río arriba así como los 100pb río abajo del exón 3 tuvieron un aumento en la exclusión exón 3, esto mostró concordancia con lo reportado en la literatura, en donde indican que los primeros 300pb

alrededor del exón que sufre splicing se encuentran localizados los elementos regulatorios para su reconocimiento.

Utilizando el mismo enfoque, se analizaron los posibles elementos reguladores presentes en el exón 3. Por lo que se diseñaron 3 delecciones; la delección de los primeros 22 pb del exón 3 (región Ex3 $\Delta$ 1) tuvo un efecto significativo sobre la proporción de las dos isoformas, favoreciendo la exclusión del exón 3 y como consecuencia un aumento en la expresión de la isoforma SDx3M y una disminución de la isoforma SurM, por lo que se consideró que en los primeros 22pb se encuentran elementos importantes para la regulación del exón 3. La segunda y tercera delección también aumentaron la expresión de la isoforma SDx3M, pero en ambos casos, la expresión de la isoforma SurM permaneció similar al control, probablemente este efecto se debe a que estas regiones poseen un papel auxiliar en el reconocimiento del exón 3.

Como el cambio más notable en la proporción de las 2 isoformas fue debido a la pérdida de las primeras 22pb del exón 3 (Ex3 $\Delta$ 1), se analizó esta pérdida de función de la región utilizando una estrategia diferente, se diseñaron una serie de mutaciones en los sitios potenciales de unión de los factores *trans*. Para este propósito, se dividió la región que corresponde a la delección Ex3 $\Delta$ 1 en tres subregiones o clusters de unión, esto en base al análisis bioinformático de esta región y a sus posibles elementos que pudieran estar uniéndose, las 3 subregiones se designaron como ExR1, ExR2 y ExR3. Dado al tamaño de las subregiones y la posible unión de factores *trans*, se esperaba que las mutaciones en cada subregión evitaran la unión de varios factores *trans* putativos. Inesperadamente, encontramos que la mutación en la subregión ExR2 tuvo un efecto significativo en la proporción de las dos isoformas, aumentando considerablemente la expresión de SurM y disminuyendo drásticamente la isoforma SDx3M, contrario a lo que se había encontrado con la delección de toda la región de 22pb en donde se observó un incremento de la isoforma SDx3M. Estos resultados sugirieron que esta región ExR2 pudiera tener un efecto directo en la exclusión del exón 3. Por otra parte, con la mutaciones en las regiones ExR1 y ExR3 no se encontraron cambios en la expresión de las isoformas, comportándose estas como en el control.

Debido a lo anterior se planteó una hipótesis, en la cual las regiones ExR1 y ExR3 pudieran trabajar juntas y por ende contener uno o más elementos *trans* que pudieran inhibir la exclusión del exón 3, y por consecuencia ser antagonistas de la región ExR2. Para probar esta hipótesis se generó una construcción DobMutEx que contiene una doble mutación (regiones ExR1 y ExR3 mutadas).

Como era de esperar, la mutación DobMutEx afectó la proporción de las dos isoformas, aumentando significativamente la exclusión del exón 3 y por consecuencia el aumento de la expresión SDx3M, este resultado fue similar a lo que se observó con la delección Ex3 $\Delta$ 1. Los resultados permitieron identificar a un nuevo elemento potenciador del splicing en los primeros 22pb del exón 3 de la survivina.

El siguiente paso fue la identificación de los posibles factores *trans* que pudieran estar interactuando en los primeros 22pb del exón 3 y así regulando el splicing alternativo del ARNm de la survivin DEx3. En base al análisis que se realizó con los diferentes software se identificaron 9 posibles factores que pudieran estar regulando el splicing de la survivin DEx3, dentro de los cuales se encontraron SRp40, SRp55, hnRNPH1, hnRNPH2, hnRNPF, Sam68, hnRNPG, hTra2 $\beta$  y ASF / SF2. Realizando una búsqueda de su posible participación en el splicing de otros genes se encontró que estos factores estaban involucrados en la regulación del splicing alternativo de una variedad de genes implicados en cáncer.

Se comenzó validando un grupo de 5 posibles factores *trans*: SRp40, SRp55, hnRNPH1, hnRNPH2, hnRNPF, por lo que se diseñaron ARNs de interferencia contra estas proteínas. Sin embargo ninguno de estos factores participó en la regulación del splicing del minigen de la survivina. Posiblemente muchos de estos factores tienen sus función dependiendo del tejido donde se localicen.

Para evaluar los restantes factores potenciales: Sam68, hnRNPG, hTra2 $\beta$  y ASF / SF2, se realizó un ensayo de pulldown para identificar cuáles de estos

factores estaban involucrados en la regulación del splicing alternativo de survivina.

Se utilizaron sondas de ARN que contenían mutaciones en los sitios de unión para los potenciales factores. Este ensayo permitió la identificación de Sam68 como un posible regulador del splicing alternativo del ARNm de la survivina DEx3.

Se ha reportado que Sam68 presenta importantes funciones oncogénicas a través de la modulación del splicing de una gran variedad de genes involucrados en cáncer. Sam68, es el miembro mejor caracterizado de la familia de proteínas STAR, se ha reportado que está implicado en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la tumorigénesis. Sam68 juega un papel importante en la regulación del splicing alternativo de ARNm específicos, actuando como un represor o potenciador del splicing. Se ha caracterizado a Sam68 como un regulador del splicing alternativo de CD44 ya que promueve la inclusión del exón 5, a través de la fosforilación y la señalización de ERK1/2 en células T de linfoma en ratón (36).

Además, Sam68 se requiere para el splicing alternativo del virus del papiloma humano (VPH), promoviendo la inclusión del exón E6.

Por otro lado, la proteína Sam68 también está implicada en la transición epitelio mesénquima durante el proceso de metástasis, ya que en este proceso se ha observado que sam68 regula el splicing de ASF/SF2 involucrado en el proceso metastásico .

Además, se ha descrito en reportes previos que la sobreexpresión de Sam68 favorece en el proceso de apoptosis, ya que modula el splicing alternativo de las isoforma de BCL-X (BCL-X<sub>L</sub> y BCL-X<sub>S</sub>), esto lo lleva a cabo en cooperación con la proteína hnRNP A1, esto descrito para cáncer de próstata y cáncer de mamá.

Como podemos observar sam68 es una proteína involucrada con diversos genes que participan en el proceso carcinogénico, a través de regular su splicing, Por lo cual esto muestra una consistencia con los resultados obtenidos y mostrados en esta tesis.

En los resultados anteriores, en los cuales se diseñaron mutaciones, en particular la mutación Mut2Ex3 que modificó el sitio de unión de Sam68 y, en consecuencia, alteró la proporción de las isoformas para favorecer la isoforma SurM (disminución de la exclusión del exón 3), demostró como el sitio consenso localizado en la región ExR2 es de suma importancia para el reconocimiento del exón 3, por lo que podría ser un sitio nuevo con características de represión del splicing ya que al no ser reconocido el exón este se perderá con los intrones aledaños, por lo cual podemos concluir que una mínima alteración en los elementos *cis* puede modular de manera drástica el splicing alternativo de cualquier gen.

Otros factores tales como hnRNP G y hTra2 $\beta$  no se unieron a ninguna de las sondas, por lo que podemos excluir su participación en la regulación del splicing alternativo del ARNm de la survivina DEx3. Aunque no se descarta su participación en la regulación del splicing de alguna otra isoforma de la survivina ya que los análisis bioinformáticos mostraron que la secuencia del gen de la survivina posee una gran cantidad de sitios consenso para estas proteínas.

Por otra parte, para apoyar aún más el papel de Sam68 en la regulación del splicing de la survivina DEx3, se diseñó un ARN de interferencia (siSAM1) para inhibir la expresión de Sam68 y analizar su efecto sobre la expresión del ARNm endógeno de la survivina DEx3. Como era de esperar, los niveles reducidos de Sam68 indujeron una disminución de alrededor del 50% en la expresión del ARNm de la survivina DEx3 endógena. Para demostrar que la disminución de la expresión del ARNm de la Survivina DEx3 era debida a la unión de Sam68 en el sitio identificado en el exón 3, se decidió explorar la participación del sitio consenso para Sam68 y su importancia en la regulación del splicing alternativo del exón 3 de la survivina endógena.

Se diseñaron dos clones celulares utilizando la técnica de CRISPr/Cas9. Los resultados obtenidos mostraron que la inhabilitación del sitio de unión de sam68 afectó de manera considerable la expresión de la survivina DEx3 y por lo tanto modulaba el splicing de esa isoforma.

A continuación se evaluó si la alteración del sitio de unión tenía algún efecto fisiológicamente relevante. Para ello en colaboración con la Dra. Cecilia Zampedri se realizaron ensayos de dilución de Xenotrasplantes. Se observó un aumento en la tumorigenicidad en las células que tenían la mutación del sitio de sam68 (HeLa CrisprRH). Por lo tanto, estos resultados sugirieron que una disminución en la expresión de la survivina DEx3 aumentaba la formación de tumores. Este resultado se correlacionó con un reporte previo obtenido en nuestro laboratorio (75) en el que se observó que la sobreexpresión de la survivina DEx3, disminuía la capacidad de las células HeLa para formar colonias, así como la capacidad de formar esferoides tumorales. Aunque no se exploró la participación de las células iniciadoras tumorales, estas podrían estar detrás de este efecto, como se ha reportado anteriormente.(76)

En lo que respecta a la participación de ASF/SF2 en la regulación del splicing del exón 3 de a survivina, previamente se demostró que ASF/SF2 puede unirse al ARNm de la survivina sin interferir con el splicing, pero sí puede afectar la traducción del ARNm (77). En el presente trabajo también se encontró que ASF/SF2 estaba vinculado al exón 3 de la survivina debido a la presencia de dos regiones con sitios de unión para esta proteína que rodeaban el sitio de unión de Sam68. Aunque se demostró la unión de ASF/SF2 a estos sitios, esta interacción no impidió la unión de Sam68 a su secuencia consenso dentro del exón 3. Por lo que estos resultados sugirieron que otro factor o factores podrían estar compitiendo con Sam68 para el reconocimiento del exón 3, dando como resultado un equilibrio de la expresión de las dos isoformas.

Por lo cual proponemos un posible modelo para tratar de explicar nuestros datos, en donde la unión de Sam68 al exón 3 de la survivina determina si la maquinaria de splicing reconoce o no el exón 3 para que sea incluido en el ARNm. Por lo que si Sam68 está ausente en este sitio, probablemente algún otro factor desconocido pueda unirse en las regiones adyacentes, y así los sitios consenso del splicing del exón 3 son reconocidos para poder incluir el exón al transcrito maduro de la survivina. Por el contrario, si Sam68 está presente, los sitios consenso del splicing del exón 3 son bloqueados, y por lo

tanto el exón 3 no es reconocido, por lo que se excluirá del transcrito final favoreciendo la expresión de la isoforma survivina DEx3, la cual carece del exón 3 (Figura 50).

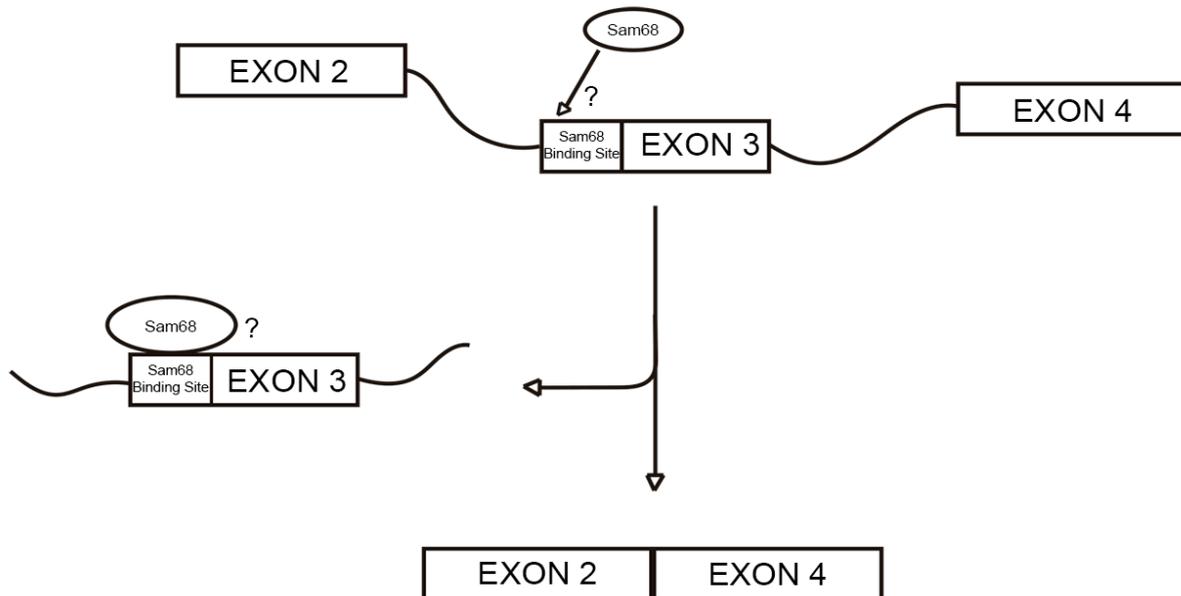


Figura 50. Esquema del posible mecanismo de acción de sam68 en la regulación de splicing del exón 3. Se propone que sam68 se une a su sitio consenso localizado en los primeros 22pb de exón 3, esta unión bloqueará el reconocimiento del exón, causando que sea excluido del transcrito maduro, favoreciendo así la expresión de la isoforma survivina DEx3.

En conclusión, este es el primer trabajo que proporciona evidencia de que la inhibición de sam68 o la alteración de sus elementos *cis* modulan el splicing alternativo de la survivina DEx3. Investigar el mecanismo por el cual se regula la survivina DEx3 es crucial, debido a la importancia de esta isoforma durante la progresión del cáncer, así como también por su papel como un posible marcador diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

## 8. Bibliografía.

1. Spencer, S. L., and Sorger, P. K. (2011) Measuring and modeling apoptosis in single cells. *Cell* **144**, 926-939
2. Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C. J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A. J., and Los, M. (2009) Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics* **46**, 497-510
3. Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S., and Livingston, E. H. (2007) Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Research* **139**, 143-156
4. Pop, C., and Salvesen, G. S. (2009) Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 21777-21781
5. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., and Rishi, A. K. (2011) Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**, 1978-1986
6. Ivanov, S. M., Huber, R. G., Warwicker, J., and Bond, P. J. (2016) Energetics and Dynamics Across the Bcl-2-Regulated Apoptotic Pathway Reveal Distinct Evolutionary Determinants of Specificity and Affinity. *Structure* **24**, 2024-2033
7. Cerella, C., Gaigneaux, A., Mazumder, A., Lee, J. Y., Saland, E., Radogna, F., Farge, T., Vergez, F., Recher, C., Sarry, J. E., Kim, K. W., Shin, H. Y., Dicato, M., and Diederich, M. (2016) Bcl-2 protein family expression pattern determines synergistic pro-apoptotic effects of BH3 mimetics with hemisynthetic cardiac glycoside UNBS1450 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*
8. Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., and Altieri, D. C. (2004) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 34087-34090
9. Mehrotra, S., Languino, L. R., Raskett, C. M., Mercurio, A. M., Dohi, T., and Altieri, D. C. (2010) IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* **17**, 53-64
10. Signore, M., Ricci-Vitiani, L., and De Maria, R. (2013) Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Letters* **332**, 374-382
11. Sharma, S., Kaufmann, T., and Biswas, S. (2017) Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation. *Immunology & Cell Biology* **95**, 236-243

12. Budhidarmo, R., and Day, C. L. (2015) IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **39**, 80-90
13. Verhagen, A. M., Coulson, E. J., and Vaux, D. L. (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology* **2**, REVIEWS3009
14. Herrera, B., Fernandez, M., Benito, M., and Fabregat, I. (2002) cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes. *FEBS Letters* **520**, 93-96
15. Wheatley, S. P., and McNeish, I. A. (2005) Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *International Review of Cytology* **247**, 35-88
16. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine* **3**, 917-921
17. Chantalat, L., Skoufias, D. A., Kleman, J. P., Jung, B., Dideberg, O., and Margolis, R. L. (2000) Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Molecular cell* **6**, 183-189
18. Rodel, F., Hoffmann, J., Grabenbauer, G. G., Papadopoulos, T., Weiss, C., Gunther, K., Schick, C., Sauer, R., and Rodel, C. (2002) High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlentherapie und Onkologie* **178**, 426-435
19. Grossman, D., Kim, P. J., Blanc-Brude, O. P., Brash, D. E., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (2001) Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 991-999
20. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research* **58**, 5315-5320
21. Marusawa, H., Matsuzawa, S., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I., and Reed, J. C. (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO Journal* **22**, 2729-2740
22. Song, Z., Yao, X., and Wu, M. (2003) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23130-23140
23. Chandele, A., Prasad, V., Jagtap, J. C., Shukla, R., and Shastry, P. R. (2004) Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* **6**, 29-40

24. Vader, G., Kauw, J. J., Medema, R. H., and Lens, S. M. (2006) Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Reports* **7**, 85-92
25. Kitagawa, M., and Lee, S. H. (2015) The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **3**, 14
26. Huang, J., Lyu, H., Wang, J., and Liu, B. (2015) MicroRNA regulation and therapeutic targeting of survivin in cancer. *American Journal of Cancer Research* **5**, 20-31
27. Asanuma, H., Torigoe, T., Kamiguchi, K., Hirohashi, Y., Ohmura, T., Hirata, K., Sato, M., and Sato, N. (2005) Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Research* **65**, 11018-11025
28. Zhu, H., Zhang, G., Wang, Y., Xu, N., He, S., Zhang, W., Chen, M., Liu, M., Quan, L., Bai, J., and Xu, N. (2010) Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Science* **101**, 1156-1162
29. Vaira, V., Lee, C. W., Goel, H. L., Bosari, S., Languino, L. R., and Altieri, D. C. (2007) Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* **26**, 2678-2684
30. Karar, J., and Maity, A. (2011) PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **4**, 51
31. Fujino, K., Ueda, M., Takehara, M., Futakuchi, H., Kanda, K., Yamashita, Y., Terai, Y., and Ueki, M. (2006) Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis. *Molecular Human Reproduction* **12**, 383-388
32. Yamamoto, H., Ngan, C. Y., and Monden, M. (2008) Cancer cells survive with survivin. *Cancer Science* **99**, 1709-1714
33. Necochea-Campion, R., Chen, C. S., Mirshahidi, S., Howard, F. D., and Wall, N. R. (2013) Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Letters* **339**, 167-174
34. Caldas, H., Jiang, Y., Holloway, M. P., Fangusaro, J., Mahotka, C., Conway, E. M., and Altura, R. A. (2005) Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* **24**, 1994-2007
35. Sampath, J., and Pelus, L. M. (2007) Alternative splice variants of survivin as potential targets in cancer. *Current Drug Discovery Technologies* **4**, 174-191
36. Pavlidou, A., Kroupis, C., and Dimas, K. (2014) Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* **5**, 883-894

37. Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. (1999) Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Research* **59**, 6097-6102
38. Malcles, M. H., Wang, H. W., Koumi, A., Tsai, Y. H., Yu, M., Godfrey, A., and Boshoff, C. (2007) Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin-DeltaEx3 during TNFalpha-mediated cell death. *British Journal of Cancer* **96**, 1659-1666
39. Ryan, B., O'Donovan, N., Browne, B., O'Shea, C., Crown, J., Hill, A. D., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M. J. (2005) Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer. *British Journal of Cancer* **92**, 120-124
40. Lopergolo, A., Tavecchio, M., Lisanti, S., Ghosh, J. C., Dohi, T., Favarsani, A., Vaira, V., Bosari, S., Tanigawa, N., Delia, D., Kossenkov, A. V., Showe, L. C., and Altieri, D. C. (2012) Chk2 phosphorylation of survivin-DeltaEx3 contributes to a DNA damage-sensing checkpoint in cancer. *Cancer Research* **72**, 3251-3259
41. Caldas, H., Fangusaro, J. R., Boue, D. R., Holloway, M. P., and Altura, R. A. (2007) Dissecting the role of endothelial SURVIVIN DeltaEx3 in angiogenesis. *Blood* **109**, 1479-1489
42. Modrek, B., and Lee, C. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* **30**, 13-19
43. Valdivia, H. H. (2007) One gene, many proteins: alternative splicing of the ryanodine receptor gene adds novel functions to an already complex channel protein. *Circulation Research* **100**, 761-763
44. Merkin, J., Russell, C., Chen, P., and Burge, C. B. (2012) Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in Mammalian tissues. *Science* **338**, 1593-1599
45. Barbosa-Morais, N. L., Irimia, M., Pan, Q., Xiong, H. Y., Gueroussov, S., Lee, L. J., Slobodeniuc, V., Kutter, C., Watt, S., Colak, R., Kim, T., Misquitta-Ali, C. M., Wilson, M. D., Kim, P. M., Odom, D. T., Frey, B. J., and Blencowe, B. J. (2012) The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* **338**, 1587-1593
46. Fedor, M. J. (2008) Alternative splicing minireview series: combinatorial control facilitates splicing regulation of gene expression and enhances genome diversity. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1209-1210
47. Wahl, M. C., Will, C. L., and Luhrmann, R. (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718
48. Will, C. L., and Luhrmann, R. (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**
49. Fica, S. M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N. S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J. P., and Piccirilli, J. A. (2013) RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature* **503**, 229-234

50. Grabowski, P. (2002) Alternative splicing in parallel. *Nature Biotechnology* **20**, 346-347
51. Blencowe, B. J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37-47
52. Wang, Z., and Burge, C. B. (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* **14**, 802-813
53. Wang, Z., Xiao, X., Van Nostrand, E., and Burge, C. B. (2006) General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control. *Molecular cell* **23**, 61-70
54. Liu, W., Zhou, Y., Hu, Z., Sun, T., Denise, A., Fu, X. D., and Zhang, Y. (2010) Regulation of splicing enhancer activities by RNA secondary structures. *FEBS Letters* **584**, 4401-4407
55. Zhang, J., and Manley, J. L. (2013) Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discovery* **3**, 1228-1237
56. Shkreta, L., Bell, B., Revil, T., Venables, J. P., Prinos, P., Elela, S. A., and Chabot, B. (2013) Cancer-Associated Perturbations in Alternative Pre-messenger RNA Splicing. *Cancer Treatment and Research* **158**, 41-94
57. Pal, S., Gupta, R., and Davuluri, R. V. (2012) Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* **136**, 283-294
58. Long, J. C., and Caceres, J. F. (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal* **417**, 15-27
59. Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M. A., and Manley, J. L. (1994) Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119-124
60. Ip, J. Y., Schmidt, D., Pan, Q., Ramani, A. K., Fraser, A. G., Odom, D. T., and Blencowe, B. J. (2011) Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Research* **21**, 390-401
61. Zhu, J., Mayeda, A., and Krainer, A. R. (2001) Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Molecular cell* **8**, 1351-1361
62. Stickeler, E., Kittrell, F., Medina, D., and Berget, S. M. (1999) Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* **18**, 3574-3582
63. Han, S. P., Tang, Y. H., and Smith, R. (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochemical Journal* **430**, 379-392
64. Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS Journal* **275**, 2712-2726

65. Revil, T., Pelletier, J., Toutant, J., Cloutier, A., and Chabot, B. (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 21458-21467
66. Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O., and Bradley, R. K. (2016) RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nature Reviews Cancer* **16**, 413-430
67. Busch, A., and Hertel, K. J. (2012) Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **3**, 1-12
68. Matter, N., Herrlich, P., and Konig, H. (2002) Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420**, 691-695
69. Taylor, S. J., Anafi, M., Pawson, T., and Shalloway, D. (1995) Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 10120-10124
70. Frisone, P., Pradella, D., Di Matteo, A., Belloni, E., Ghigna, C., and Paronetto, M. P. (2015) SAM68: Signal Transduction and RNA Metabolism in Human Cancer. *BioMed Research International* **2015**, 528954
71. Lin, Q., Taylor, S. J., and Shalloway, D. (1997) Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 27274-27280
72. Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C. E., and Sette, C. (2007) The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *Journal of Cell Biology* **176**, 929-939
73. Sanchez-Jimenez, F., and Sanchez-Margalet, V. (2013) Role of Sam68 in post-transcriptional gene regulation. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 23402-23419
74. Yeo, G., Hoon, S., Venkatesh, B., and Burge, C. B. (2004) Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15700-15705
75. Espinosa, M., Ceballos-Cancino, G., Callaghan, R., Maldonado, V., Patino, N., Ruiz, V., and Melendez-Zajgla, J. (2012) Survivin isoform Delta Ex3 regulates tumor spheroid formation. *Cancer Letters* **318**, 61-67
76. Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., and Dubey, S. (2016) Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International* **16**, 49
77. Ezponda, T., Pajares, M. J., Agorreta, J., Echeveste, J. I., Lopez-Picazo, J. M., Torre, W., Pio, R., and Montuenga, L. M. (2010) The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clinical Cancer Research* **16**, 4113-4125

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Abreviaturas

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**RT-PCR:** Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa

**SFB:** Suero fetal bovino

**PBS:** Solucion amortiguadora de fosfatos

**siRNA:** ARN pequeño interferente

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**dntp:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**ul:**  $1 \times 10^{-6}$  litros

**ug:**  $1 \times 10^{-6}$  gramos

**ml:**  $1 \times 10^{-3}$  litros

**uM:**  $1 \times 10^{-6}$  Molar

**TBS:** Solución salina-Tris

**crRNA:** Secuencia especifica Crispr ARN

**TracrRNA:** Transactivador crRNA

**Crispr:** Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas con regularidad interespaciadas

**Cas9:** Proteína asociada CRISPR 9

**WT:** Fenotipo silvestre

## Anexo 2. Oligos utilizados en el proyecto.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Oligos para las deleciones del Exón 3	
Ex3Δ1Fw	TTT TGA TTT TTC TAG AGA GGT TGC GCT TTC CTT TCT GTC A
Ex3Δ1Re	TGA CAG AAA GGA AAG CGC AAC CTC TCT AGA AAA ATC AAA A
Ex3Δ2Fw	CAT AAA AAG CAT TCG TCC GGA AAC TGG ACA GAG AAA GAG C
Ex3Δ2Re	GCT CTT TCT CTG TCC AGT TTC CGG ACG AAT GCT TTT TAT G
Ex3Δ3Fw	AAT AAC CCT TGG TGA ATT TTT GAA ATT GTA TGT ATT GGG AAT AA
Ex3Δ3Re	TTA TTC CCA ATA CAT ACA ATT TCA AAA ATT CAC CAA GGG TTA AT
Oligos para las deleciones del los intrones	
Δ1Fw	ATG GGA ATG TGG CTT GGG CAA ACC GCT TTA ATC C
Δ1Re	GGA TTA AAG CGG TTT GCC CAA GCC ACA TTC CCA T
Δ2Fw	CTA ATT GCT AAG GAA GTC CGC ACT GAT GCC ATC AAC TT
Δ2Re	AAG TTG ATG GCA TCA GTG CGG ACT TCC TTA GCA ATT AG
Δ3Fw	CAA TTC CAG TGA AAT GAA ATA GAT AAA ATA GAT ACA TTA GCC
Δ3Re	GGC TAA TGT ATC TAT TTT ATC TAT TTC ATT TCA CTG GAA TTG
Δ4Fw	GAG ATT GCA CCA CTG CTA CTT CAA ACA GTT CCT T
Δ4Re	AAG GAA CTG TTT GAA GTA GCA GTG GTG CAA TCT C
Δ5Fw	CAA AAA ATT AGC CGG GCG TGG ACT CCA GCC TGG GCG ACA G
Δ5Re	CTG TCG CCC AGG CTG GAG TCC ACG CCC GGC TAA TTT TTT G
Δ6Fw	ACC AGC ACT TTG GGA GGT GGT GGG CGC CTG
Δ6Re	CAG GCG CCC ACC ACC TCC CAA AGT GCT GGT
Δ7Fw	GTT TAA TTG AAA TAT AAC CTC CGA GGC GGG CGG
Δ7Re	CCG CCC GCC TCG GAG GTT ATA TTT CAA TTA AAC
Δ8Fw	GTA TGT ATT GGG AAT AAG ATA GAG TTT CAC TCT TGT TGC CC
Δ8Re	GGG CAA CAA GAG TGA AAC TCT ATC TTA TTC CCA ATA CAT AC
Δ9Fw	AAG CAT TTT TTT TTT TTT TCT GAG ATC CCA AGT AAC TGG GA
Δ9Re	TCC CAG TTA CTT GGG ATC TCA GAA AAA AAA AAA AAA TGC TT
Δ10Fw	TGA TTC TCC TGC CTC AGC CAA CTC CTG ACC TCG TGA TT
Δ10Re	AAT CAC GAG GTC AGG AGT TGG CTG AGG CAG GAG AAT CA
Δ11Fw	TGG TCT TGA ACT CCT GAC AGT TTC ACT CTG TTA CC
Δ11Re	GGG TAA CAG AGT GAA ACT GTC AGG AGT TCA AGA CCA
Δ12Fw	TTT TGT TCT GAG ACA CAA GTA GCC GAG ATT ACA GGC AT
Δ12Re	ATG CCT GTA ATC TCG GCT ACT TGT GTC TCA GAA CAA AA
Δ13Fw	TGC CTG CTT CAG CCT CCC CCT GAC CTC AGG TGA TCC
Δ13Re	TGC CTG CTT CAG CCT CCC CCT GAC CTC AGG TGA TCC
Δ14Fw	GGC CAG GCT GGT CTT GAA CTA GGA TCA CTG TGA ACA TAA A
Δ14Re	TTT ATG TTC ACA GTG ATC CTA GTT CAA GAC CAG CCT GGC C
Oligos para las Mutaciones del Exón 3	
Mut1Ex3Fw	TTT GAT TTT TCT AGA GAG ATA ATCT AAA AAG CAT TCG TCC GGT TGC
Mut1Ex3Re	GCA ACC GGA CGA ATG CTT TTT AGAT TAT CTC TCT AGA AAA ATC AAA
Mut2Ex3Fw	TTG TTT TGA TTT TTC TAG AGA GGA ACA GAT ATC GCA GTC GTC CGG TTG C
Mut2Ex3Re	GCA ACC GGA CGA CGT CGA TAT CTG TTC CTC TCT AGA AAA

	ATC AAA ACA A
Mut3Ex3Fw	GAG GAA CAT AAA AAG CAT GAT ATC GAT TGC GCT TTC CTT TCT GTC
Mut3Ex3Re	GAC AGA AAG GAA AGC GCA ATC GAT ATC ATG CTT TTT ATG TTC CTC
MutDobExFw	TTTCTAGCCAGATATCTAAAAAGCCTGATATAGATTGCGC
MutDobExRe	GCGCAATCTATATCAGGCTTTTTAGATATCTGGCTAGAAA



# Protein Sam68 regulates the alternative splicing of survivin DEx3

Received for publication, June 2, 2017. Published, Papers in Press, June 27, 2017. DOI 10.1074/jbc.M117.800318

Javier Gaytan-Cervantes<sup>†1</sup>, Carolina Gonzalez-Torres<sup>§</sup>, Vilma Maldonado<sup>§</sup>, Cecilia Zampedri<sup>‡</sup>, Gisela Ceballos-Cancino<sup>‡2</sup>, and Jorge Melendez-Zajgla<sup>‡3</sup>

From the Laboratories of <sup>†</sup>Functional Genomics and <sup>§</sup>Epigenetics, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), 14610 Mexico City, Mexico

Edited by Eric R. Fearon

Messenger RNA alternative splicing (AS) regulates the expression of a variety of genes involved in both physiological and pathological processes. AS of the anti-apoptotic and proliferation-associated survivin (*BIRC5*) gene generates six isoforms, which regulate key aspects of cancer initiation and progression. One of the isoforms is *survivin* DEx3, in which the exclusion of exon 3 generates a unique carboxyl terminus with specific anti-apoptotic functions. This isoform is highly expressed in advanced stages of breast and cervical tumors. Therefore, understanding the mechanisms that regulate *survivin* DEx3 mRNA AS is clearly important. To this end, we designed a minigene (M), and in combination with a series of deletions and site-directed mutations, we determined that the first 22 bp of exon 3 contain *cis*-acting elements that enhance the exclusion of exon 3 to generate the *survivin* DEx3 mRNA isoform. Furthermore, using pulldown assays, we discovered that Sam68 is a possible *trans*-acting factor that binds to this region and regulates exon 3 splicing. This result was corroborated using a cell line in which the Sam68 binding site in the *survivin* gene was mutated with the CRISPR/Cas system. This work provides the first clues regarding the regulation of *survivin* DEx3 mRNA splicing.

Alternative splicing (AS)<sup>4</sup> is a fundamental mechanism for differential gene expression that generates distinct mRNAs from the same pre-mRNA sequence, yielding different protein isoforms with different cellular functions (1). Approximately 95% of all human genes are regulated by this mechanism (2). AS depends on the recognition of *cis*-acting splicing elements known as exonic splicing enhancers and silencers or intronic splicing enhancers and silencers (3). Serine/arginine-rich proteins (SR) and heterogeneous nuclear

ribonucleoproteins (hnRNPs) are two well-characterized types of *trans*-acting splicing factors that interact with exonic and intronic enhancers or silencers to assist the spliceosome in exon recognition (4, 5).

The importance of accurate AS is demonstrated by the fact that alterations in *cis*-acting elements and the deregulation of *trans*-acting factors are involved in several human diseases (6). For example, ~15 to 50% of human disease mutations affect splice site selection; therefore, elucidating the AS code is clearly important (7, 8). In cancer, many reports have demonstrated a relationship between disease progression and deregulated AS for several genes implicated in apoptosis, cell cycle control, invasion, metastasis, and angiogenesis (9). One example is the *BIRC5* gene, which encodes survivin, a protein involved in inhibiting apoptosis and regulating the cell cycle (10). AS of the *BIRC5* gene produces six isoforms with similar or antagonistic functions as follows: anti-apoptotic survivin; anti-apoptotic *survivin* DEx3, which lacks exon 3; *survivin* 2B+32, which is subjected to nonsense-mediated decay; pro-apoptotic *survivin* 2B, which retains part of intron 2; anti-apoptotic *survivin* 3B, which retains part of intron 3; and pro-apoptotic *survivin* 2 $\alpha$ , which arises from the loss of exons 3 and 4 and the insertion of the 3' UTR, which generates a premature stop codon (11). However, the mechanism by which splice variants of *survivin* regulate apoptosis is not fully understood.

One of the most important characteristics of *survivin* and its splice variants is that they are almost universally up-regulated in cancer, whereas they are scarcely detectable in normal cells (12). In addition, overexpression of *survivin* and its isoforms correlates with cancer progression and treatment outcomes in many types of cancer (13). Interestingly, whereas *survivin* shows constant high expression in diverse types and stages of cancer, the expression of *survivin* isoforms is variable and depends on the specific type and stage of cancer, pointing to a cancer-associated AS regulation mechanism (10, 14). Because of these expression differences, some isoforms are considered to be better prognostic or diagnostic markers than *survivin* itself. For example, *survivin* DEx3 shows differential overexpression compared with other *survivin* variants in breast cancer, bladder cancer, and sarcomas. In addition, *survivin* DEx3 has been proposed as a useful diagnostic marker in breast cancer, papillary thyroid carcinoma, and lung cancer (15–19). The overexpression of this isoform is also associated with poor

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 132931. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains supplemental Figs. S1–S3 and supplemental Table S1.

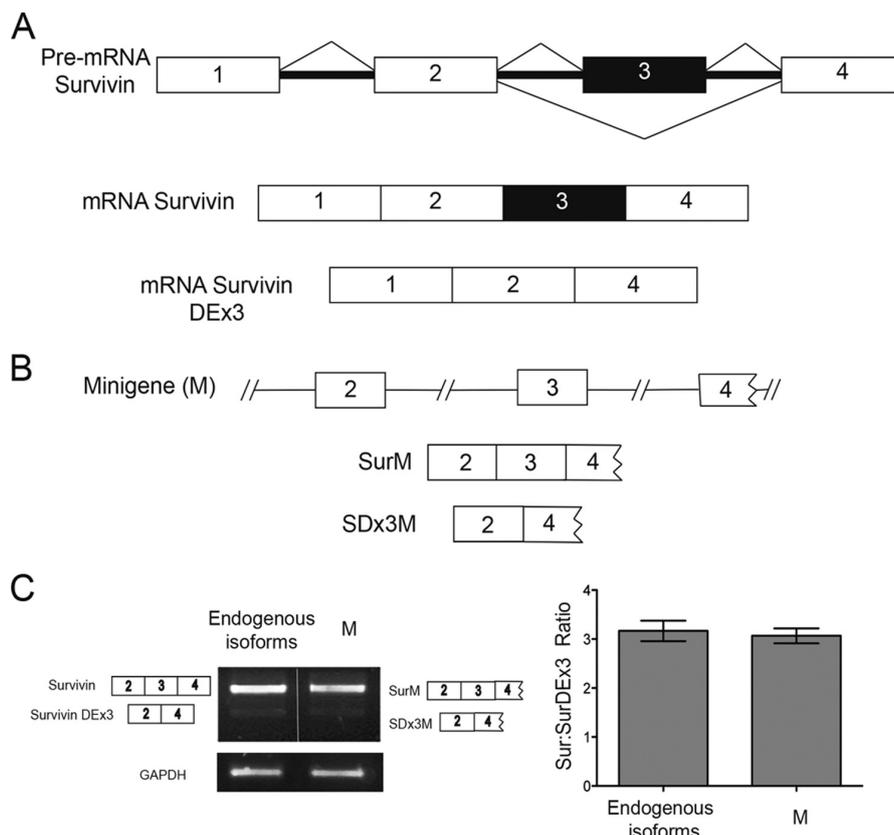
<sup>1</sup> A doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) who received fellowship 293958 from CONACYT.

<sup>2</sup> To whom correspondence may be addressed. E-mail: gceballos@inmegen.gob.mx.

<sup>3</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 52-55 53501967; E-mail: jmelendez@inmegen.gob.mx.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: AS, alternative splicing; M, minigene; hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; qPCR, quantitative PCR; dpi, days post injection.

## Survivin DEx3 alternative splicing regulation



**Figure 1. Expression of the minigene in HeLa cells.** *A*, structure of the survivin pre-mRNA and spliced mRNA isoforms. Exons 2 and 4 are represented by white boxes, exon 3 by a black box, and introns with black lines. *B*, schematic representation of the minigene and the two isoforms generated through alternative splicing: SurM, which includes exon 3, and SDx3M, which excludes exon 3. Both isoforms include exons 2 and 4. *C*, RT-PCR analysis of the expression of the minigene (M) and endogenously spliced mRNA isoforms using specific primers for each case. GAPDH was used as a constitutive gene. Bar graph showing the relative expression of endogenous and M isoforms (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ).

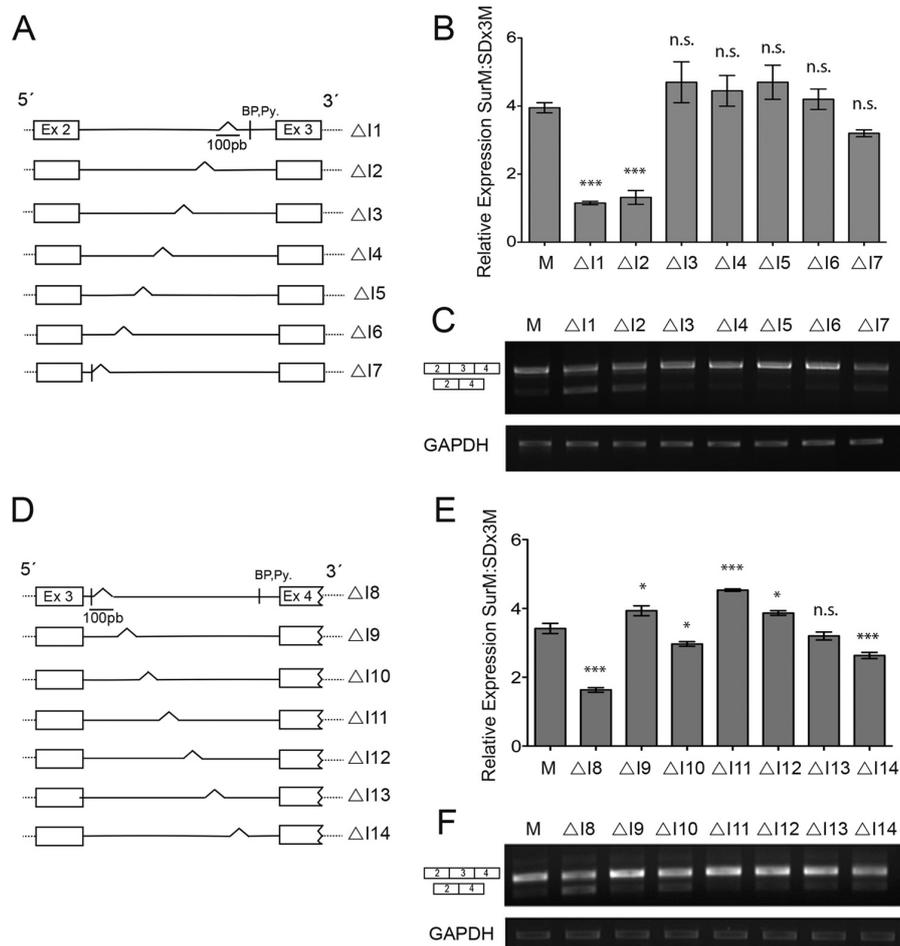
responses to chemotherapy and low patient survival in cases of soft tissue sarcoma, glioma, astrocytoma, and gastric cancer (16, 20, 21). The differences in the cellular effects of survivin DEx3 and survivin have been attributed to their alternative C termini. In addition to its apoptosis-regulating activity, the survivin DEx3 carboxy-terminal region has domains that are not present in other isoforms, including a mitochondrial localization domain, a nuclear localization domain, and a BH2 domain. This last domain is characteristic of another protein family involved in apoptosis regulation, the Bcl-2 family (22). The association of survivin DEx3 with Bcl-2 through the BH2 domain confers greater stability in the interaction of survivin DEx3 with caspase 3, leading to inhibition of apoptosis (22). To date, no reports have explored the *cis*-acting elements or *trans*-acting factors that regulate survivin DEx3 splicing. Because of the relevance of this isoform in cancer progression, studying the mechanisms through which survivin DEx3 is generated not only is relevant for advancing our understanding of cancer but will also potentially contribute to the development of new markers or therapeutic alternatives. In the present study, we evaluated the role of *cis* elements and *trans* factors that control the exclusion of survivin exon 3 using a minigene (M) construct

model. In addition, we identified Sam68 as a *trans*-acting factor that regulates this process.

## Results

### Minigene expression

The *survivin* gene contains 4 exons and 3 introns, which generate six isoforms, including survivin DEx3, which lacks exon 3 (Fig. 1A). To determine the elements that regulate exon 3 skipping, we designed an M that contains the necessary elements to carry out splicing of this exon (Fig. 1B). Because several reports (23) suggest that most of the splicing regulatory elements are contained within the 300 bp that surround an exon, we focused on the 700 bp upstream and downstream of exon 3. The survivin M was expressed in HeLa cells under the control of the minimal cytomegalovirus promoter. Two transcripts were expressed from the M as follows: SurM, which contains exons 2, 3, and 4, and SDx3M, which contains only exons 2 and 4 (Fig. 1B). Similar to endogenous survivin mRNA, the expression of the SurM isoform was predominant over that of the SDx3M isoform, at a 3:1 ratio (SurM:SDx3M) (Fig. 1C). We concluded that the M undergoes the same process as the endogenous isoforms. Therefore, our model can be used to identify *trans*- and



**Figure 2. Effect of intron deletions on the inclusion or exclusion of exon 3 in a minigene assay is shown.** A–D, schematic diagram of the minigene (M) intronic deletions of 100 bp in each intron. Exons are represented by white boxes and introns by black lines; consensus regions such as branch points (BP) and polypyrimidine tracts (Py) are indicated. B, bar graphs showing the ratio of SurM and SDx3M isoform expression (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ) as affected by each deletion introduced into the intron upstream of exon 3. C, representative RT-PCR analyses of HeLa cells transfected with constructs containing the  $\Delta$ I1 to  $\Delta$ I7 deletions. E, bar graph showing the relative expression of SurM:SDx3M (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ) affected by each deletion introduced into the intron downstream of exon 3. F, representative RT-PCR analysis of HeLa cells transfected with  $\Delta$ I8 to  $\Delta$ I14. GAPDH was used as a constitutive gene. The  $p$  values from one-way ANOVA are reported. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; n.s., not significant.

*cis*-regulatory elements that are necessary to modulate exon 3 exclusion.

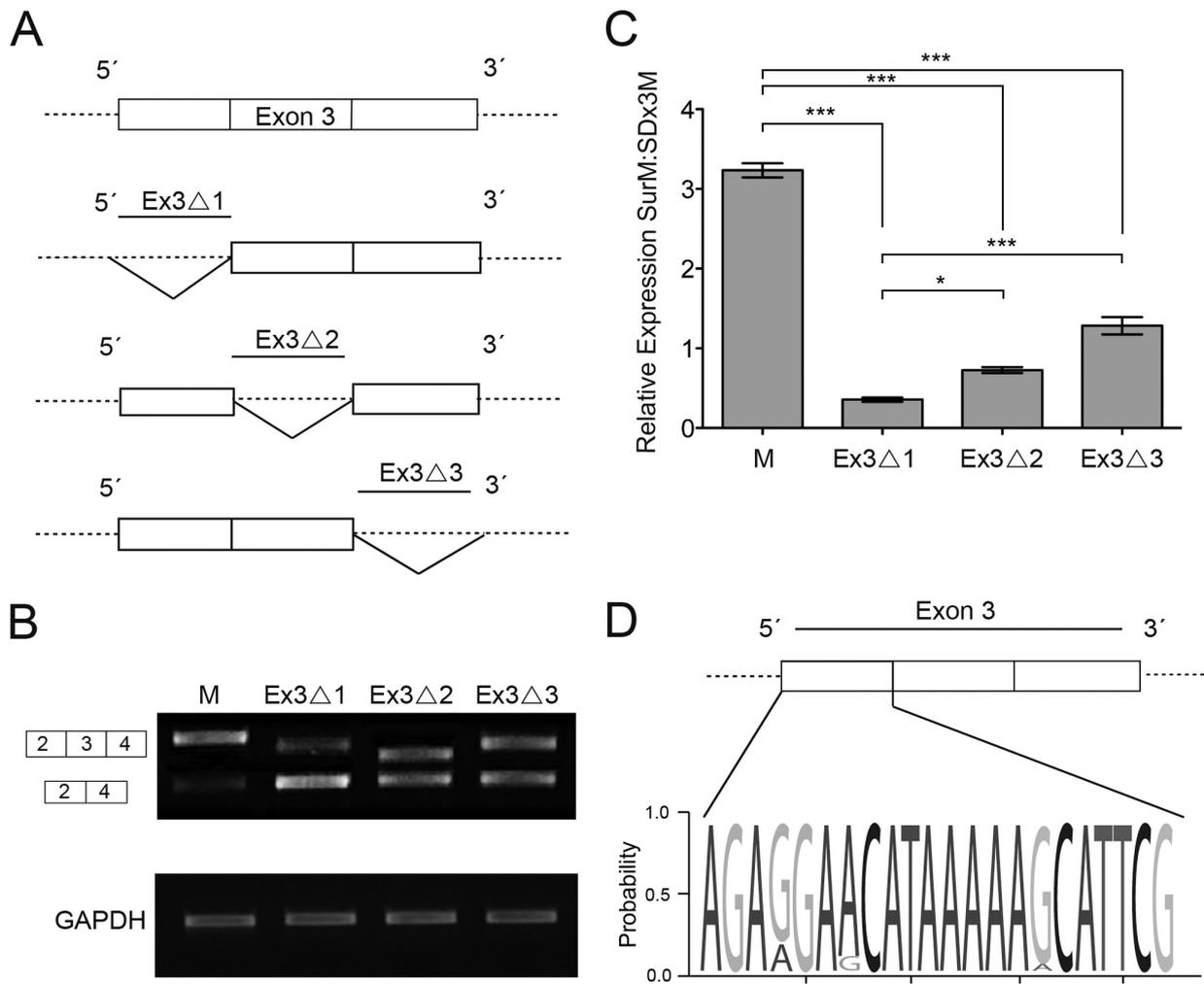
#### Identification of intronic and exonic *cis* elements that regulate survivin AS

To identify intronic *cis*-acting elements, we designed 14 deletions in the two introns surrounding exon 3, including seven 100-bp deletions per intron (Fig. 2, A and D). To avoid deleting the regulatory splicing consensus sequences, 60 bp were left in the 5' region, and 10 bp were left in the 3' region of the exon 3 (24). Constructs containing all of these deletions were transfected into HeLa cells, followed by RT-PCR analyses. Even when SurM continued to be the main isoform expressed, we observed that each deletion had a different effect on exon 3 exclusion, as reflected by the ratio of the two isoforms. Specifically, the  $\Delta$ I1 and  $\Delta$ I2 deletions, located upstream of exon 3, had a significant effect on the expression ratio of the two isoforms (Fig. 2B), with an increase in SDx3M isoform expression

(exon 3 exclusion) and a slight decrease in the SurM isoform (Fig. 2C) compared with the M. Therefore, these deletions affect the splicing of the SDx3M isoform and to a lesser extent the SurM isoform. We also found that the  $\Delta$ I3,  $\Delta$ I4,  $\Delta$ I5, and  $\Delta$ I6 deletions tended to favor the SurM isoform, although no significant differences were observed. In the case of deletions downstream of exon 3 (Fig. 2D), removing the first 100 bp (deletion  $\Delta$ I8) (Fig. 2, E and F) induced an increase in the expression of the SDx3M isoform (an increase in the exclusion of exon 3). The  $\Delta$ I9,  $\Delta$ I10,  $\Delta$ I11,  $\Delta$ I12, and  $\Delta$ I14 deletions (Fig. 2E) also resulted in significant differences in the ratio of the two M isoforms, although not to the extent of  $\Delta$ I8. Hence, these results suggest that the 200 bp upstream and 100 bp downstream of exon 3 contain important elements that control the exclusion/inclusion of exon 3 and therefore modulate splicing of the SDx3M isoform.

We next sought to identify the most relevant exonic *cis*-acting elements. For this purpose, we designed three deletions in exon 3. The first deletion, Ex3 $\Delta$ 1, lacks 22 bp; the second dele-

## Survivin DEx3 alternative splicing regulation



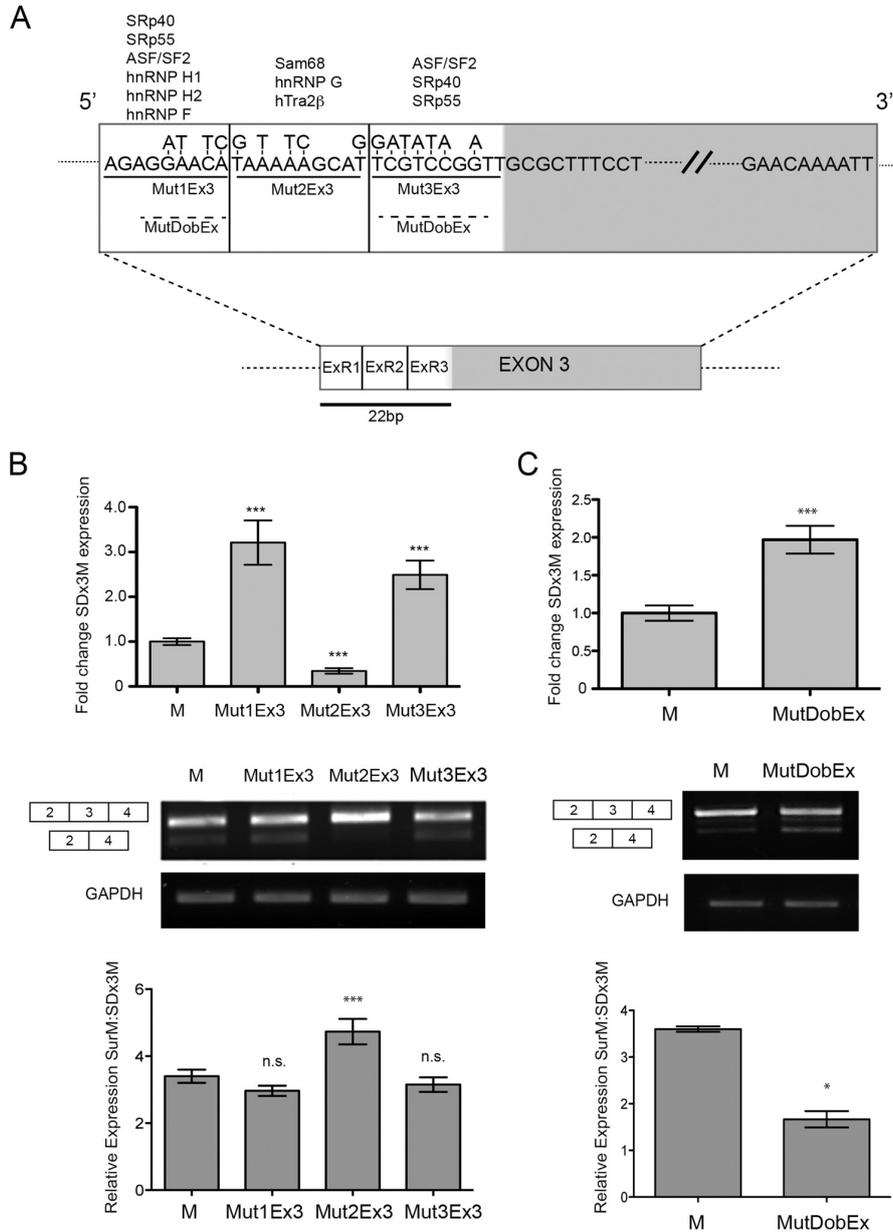
**Figure 3.** Effect of exon deletions on the inclusion or exclusion of exon 3 in a minigene assay is shown. *A*, schematic diagram of the minigene (M) deletions in exon 3. Exons are represented by white boxes, and the positions of the deletions are indicated with an underlined Ex3Δ# (# indicates the number of the deletion). *B* and *C*, the splicing patterns were analyzed via RT-PCR of HeLa cells transfected with constructs containing the deletions indicated in *A*: M (control), Ex3Δ1, Ex3Δ2, and Ex3Δ3. The bar graph shows the ratio of SurM:SDx3M expression (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ) (upper panel). *D*, sequence alignment of the first 22 bp of exon 3 from 15 different species with WebLogo software (47). GAPDH was used as a constitutive gene. The  $p$  values from one-way ANOVA are reported. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; n.s., not significant.

tion, Ex3Δ2, lacks 49 bp; and the third deletion, Ex3Δ3, lacks 37 bp (Fig. 3A). Minigenes containing the three deletions were transfected into HeLa cells followed by RT-PCR analyses. We observed that each deletion induced an increase in the SDx3M isoform with respect to the M-transfected cells. The Ex3Δ1 deletion resulted in the greatest change in expression regarding exon 3 exclusion, shifting the isoform ratio from 3:1 SurM:SDx3M in M to 1:10. Both the Ex3Δ2 and the Ex3Δ3 deletions induced a significant increase in the SDx3M isoform, shifting the ratio from 3:1 to 1:1.3 and 1:1, respectively (Fig. 3, *B* and *C*). These changes suggested that the most important splicing regulatory elements are present within the first 22 bp of the exon, although we do not exclude the possibility that elements present in the other two deletions examined also play a role. Accordingly, alignment of the 22-bp region among 15 different species revealed a high degree of conser-

vation (Fig. 3D). Because of these results, we focused on this 22-bp region.

### Cis-exonic mutations affecting exon 3 exclusion

We next performed an *in silico* analysis of the 22-bp exonic region with three different tools that predict potential binding *trans* factors (Fig. 4A). These analyses revealed the presence of three regions, ExR1, ExR2, and ExR3. To assess the relevance of the putative binding sites, we generated constructs with point mutations in each region (Mut1Ex3, Mut2Ex3, and Mut3Ex3) (Fig. 4A). Minigenes containing these mutations were transfected into HeLa cells, and the effect of each construct was measured via RT-PCR. As shown in Fig. 4B, upper panel, the Mut1Ex3 and Mut3Ex3 constructs increased basal expression of the SDx3M isoform, whereas mutation of the ExR2 region (Mut2Ex3) dramatically increased the SurM isoform and

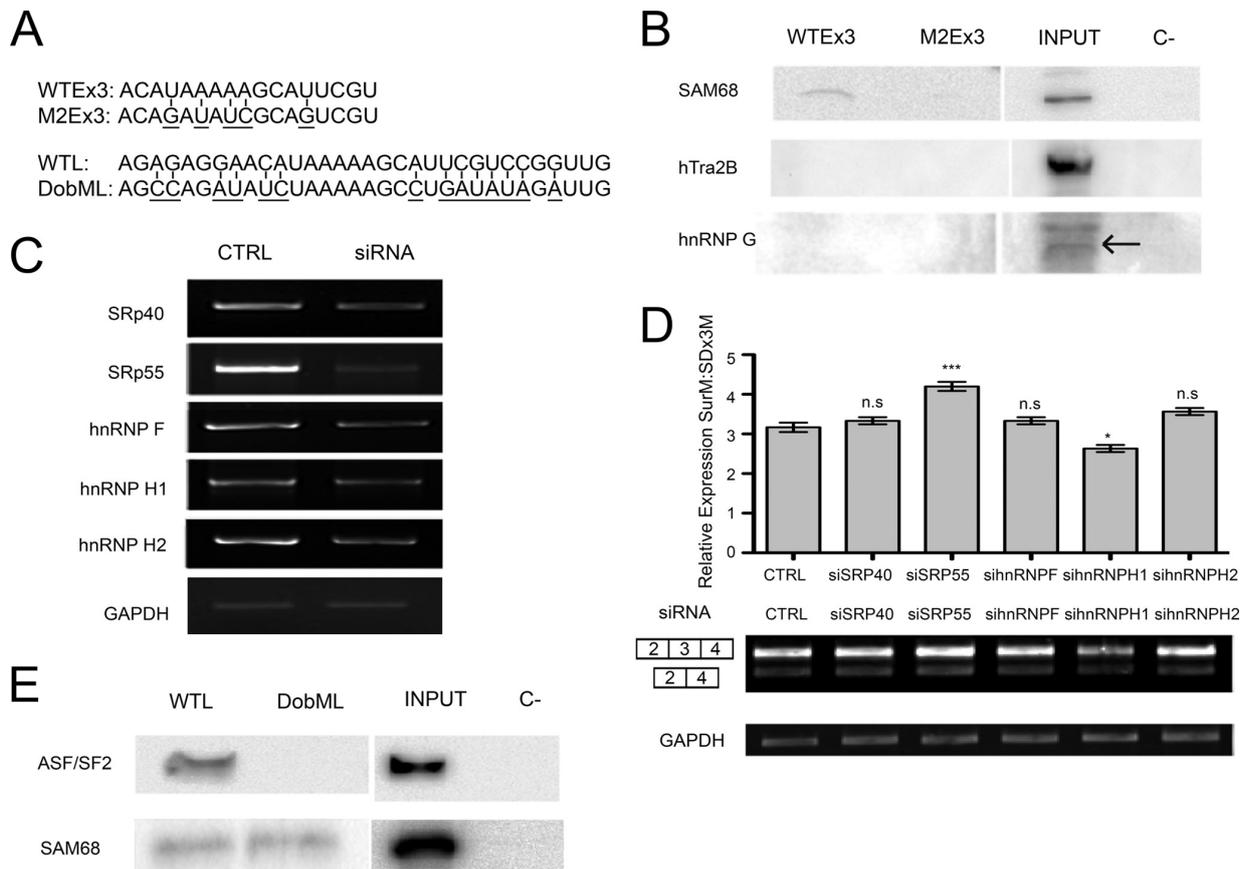


**Figure 4. Mutations in the first 22 nucleotides of exon 3 alter the ratio of the SurM:SDx3M minigene isoforms.** *A*, schematic diagram of exon 3 of the minigene (M), as well as the positions of the mutations in exon 3 and the positions of the putative *trans*-acting factors. *B*, bar graph (*upper panel*) showing the relative fold-change in SDx3M isoform mRNA expression determined via qPCR after M, Mut1Ex3, Mut2Ex3, and Mut3Ex3 were transfected into HeLa cells (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ). RT-PCR analyses (*middle panel*) of HeLa cells transfected with M (control), Mut1Ex3, Mut2Ex3, and Mut3Ex3 showing the ratio of the two minigene isoforms. Bar graph (*lower panel*) showing the relative expression of SurM:SDx3M (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ). *C*, bar graph (*upper panel*) showing the relative fold-change in SDx3M isoform mRNA expression determined via qPCR after M and MutDobEx were transfected into HeLa cells (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ). RT-PCR analyses (*middle panel*) of HeLa cells transfected with M (control) and MutDobEx. Bar graph (*lower panel*) showing the relative expression of SurM:SDx3M (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ). GAPDH was used as a constitutive gene for all assays. The  $p$  values from one-way ANOVA (*B*) and Student's  $t$  test (*B* and *C*) are reported. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; n.s., not significant.

diminished the SDx3M isoform (thus increasing exon 3 inclusion). Nevertheless, only the Mut2Ex3 isoform ratio was significantly modified, as shown in Fig. 4*B*, *lower panel*. This result clearly contrasted with the effect observed for the Ex3 $\Delta$ 1 deletion, which corresponds to the complete 22-bp region, where we observed a 10-fold increase in the expression of the SDx3M isoform. This difference could be because of a possible inhibitory effect of the ExR1 and ExR3 regions on ExR2.

To test this hypothesis, we produced a double mutant (MutDobEx) of the ExR1 and ExR3 regions (Fig. 4*A*), which was expected to reverse the effect of the Mut2Ex3 construct (Fig. 4*B*) and increase the expression of the SDx3M isoform. Indeed, as shown in Fig. 4*C*, *upper panel*, we observed that, even when SurM remained as the main isoform expressed, MutDobEx increased the expression of the SDx3M isoform, enhancing the exclusion of exon 3. Therefore, MutDobEx mainly

## Survivin DEx3 alternative splicing regulation



**Figure 5. Sam68 binds to exon 3 of survivin.** *A*, sequences of the RNA probes used for RNA pulldown assays. *WTEx3*, wild-type sequence of the ExR2 region; *WTL*, wild-type sequence covering the first 22 bp of exon 3; *M2Ex3*, mutation in the ExR2 region affecting the binding site of Sam68; *DobML*, mutation affecting the ExR1 and ExR3 regions. The positions of the mutated bases in the M2Ex3 and DobML probes are *underlined*. *B*, Western blot analyses of pulldown assays using WTEx3 and M2Ex3 biotin-labeled RNA probes; the probes were incubated with total HeLa protein; the input was total protein from HeLa cells (*INPUT*), and C-lane was the last wash. The pulled down proteins were detected using specific antibodies against Sam68, hnRNP G, and hTra2 $\beta$ . *C*, effect of the inhibiting *trans*-acting factors on the AS of the minigene. RT-PCR analysis of HeLa cells transfected with plasmids expressing shRNAs against *trans*-acting factors SRp40, SRp55, hnRNP F, hnRNP H1, and hnRNP H2. Equal amounts of cDNA were used for each amplification (as assessed by GAPDH RT-PCR). *D*, bar graph (*upper panel*) showing the relative expression of SurM:SDx3M (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ). GAPDH was used as a constitutive gene. RT-PCR analysis (*lower panel*) of M isoforms in HeLa cells transfected with CTRL and different siRNAs targeting SRp40, SRp55, hnRNP F, hnRNP H1, and hnRNP H2. *E*, Western blot analyses of pulldown assays using WTL and DobML biotin-labeled RNA probes under non-saturating conditions; the probes were incubated with total HeLa protein; the input was total protein from HeLa cells (*INPUT*), and C-lane was the last wash. The pulled down proteins were detected using specific antibodies against Sam68 and ASF/SF2. The  $p$  values from one-way ANOVA (*D*) are reported. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; n.s. not significant.

affected the splicing of the SDx3M isoform, thus decreasing the relative ratio of both isoforms (Fig. 4C, *lower panel*). Thus, ExR1 and ExR3 could be antagonistic regulators of the ExR2 region.

### Effect of *trans* elements on the regulation of M isoforms and endogenous survivin DEx3

To identify potential *trans* factors that bind to the *cis*-acting elements in exon 3, we took advantage of the previously performed *in silico* analyses. As the greatest expressional change was induced through the ExR2 mutation, we first focused on this region, which presents three potential binding candidates, Sam68 (also called KHDRBS1), hTra2 $\beta$ , and hnRNP G (Fig. 4A). To ascertain if any of these proteins are *bona fide* regulators, we carried out pulldown assays using two 17-bp RNA probes containing a wild-type or a mutated version of this region (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, Sam68 bound to the wild-

type probe but not to the mutated version, indicating that this mutation affects the binding of Sam68 to this region; hTra2 $\beta$  and hnRNP G did not show affinity for any of the tested RNA probes. These results confirm that Sam68 specifically binds to the UAAAAAGCAU sequence within the ExR2 region of exon 3, suggesting its involvement in regulating AS of the survivin DEX3 gene.

Because we previously found that mutation of the surrounding ExR1 and ExR3 regions produced an inhibitory effect on the expression of the SDx3M isoform and a possible antagonistic effect on the ExR2 region, we designed a double mutant RNA probe covering both regions. We reasoned that a mutation in the ExR1 and ExR3 regions would prevent the binding of any *trans*-acting factor, allowing Sam68 to freely bind to the ExR2 region, as it would not compete with another factor. Our previous *in silico* analyses showed that the SRp40, SRp55, hnRNP F, hnRNP H1, and hnRNP H2 factors were most likely to bind in

these two regions. To determine whether any of these factors mediates the observed effects of ExR2, we designed different siRNAs targeting these *trans* factors (Fig. 5C), which were then co-transfected with the M into HeLa cells. The siRNAs had little or no effect on the ratio of the two isoforms; therefore, these proteins probably do not regulate survivin AS (Fig. 5D).

The *in silico* analyses of the ExR1 and ExR3 regions showed that the ASF/SF2 factor presents one of the highest probabilities of binding in these regions. A previous report showed that this factor is able to bind to survivin mRNA, inducing its protein overexpression by affecting its mRNA translation (25). Thus, we performed a pulldown assay to determine whether ASF/SF2 binds to these regions. For this purpose, we designed two RNA probes, WTL and DobML. The first included the first 32 bp of exon 3, whereas the DobML probe contained the double mutation described above (Fig. 5A), which should prevent the binding of ASF/SF2. Western blotting showed that ASF/SF2 bound to the WTL probe but not to the DobML probe (Fig. 5E), indicating that ASF/SF2 binds to the ExR1 and ExR3 regions. We also tested whether the binding of ASF/SF2 to the ExR1 and ExR3 regions affects the binding of Sam68 to the ExR2 region, thereby altering the ratio of SurM and SDx3M. Pulldown and Western blot analyses demonstrated that the binding of ASF/SF2 to these regions did not affect the binding of Sam68 (Fig. 5E), excluding its possible participation in exon 3 skipping and survivin AS. Therefore, additional factor(s) are expected to be involved in the antagonistic actions of ExR1 and ExR3.

Finally, to further support the participation of Sam68 in the AS of survivin DEx3 mRNA, an siRNA (siSAM1) that targets Sam68 was transfected into HeLa cells (Fig. 6A). TaqMan and Western blot assays revealed that Sam68 depletion significantly altered the AS of the endogenous survivin DEx3 mRNA, decreasing the expression of this isoform (Fig. 6B). This result is consistent with the effect of the Mut2Ex3 construct, which affected the Sam68 splicing site and decreased the expression of the SDx3M isoform.

To further support our results in a more physiological model, exon 3 in endogenous survivin was mutated using the CRISPR/Cas9 technique (26, 27) (Fig. 6C). Two clones (CRISPRRH1 and CRISPRRH2) were created by mutating exon 3 in the same position as in the Mut2Ex3 construction mentioned above (Fig. 6D). This mutation affects the Sam68 binding site, which in previous experiments increased the inclusion of exon 3 and therefore decreased the expression of the SDx3M isoform (Fig. 4B). As expected, CRISPRRH1 and CRISPRRH2 cells presented a higher exclusion of exon 3, with a concomitant decrease in the expression of endogenous survivin DEx3 (Fig. 6E, *upper* and *lower panels*). We next evaluated whether siSAM1 had an effect on survivin DEx3 expression in a mutated ExR2 background using the CRISPRRH1 and CRISPRRH2 cells. **Supplemental Fig. S1A** shows no significant differences between the CRISPRRH1/2 cells and the CRISPRRH1/2 cells transfected with the siSAM1 siRNA. These results suggest that the Sam68 binding site is indeed responsible for survivin AS after Sam68 experimental modulation.

We also evaluated whether Sam68 overexpression affects the expression of survivin DEx3. Fig. 6F shows a reproducible

increase in survivin DEx3 mRNA following Sam68 overexpression (*lower panel*), as opposed to a very small change in expression of the main survivin isoform (not shown). As expected, Sam68 overexpression modulated AS of the *bclx* gene, as reported previously, but not Smac alternative splicing, a negative control (**supplemental Fig. S2, A and B**).

Finally, to explore the possible physiological impact of the putative Sam68 binding site, we performed xenotransplant dilution assays, in which we observed increased tumorigenicity in zebrafish embryos injected with CRISPRRH cells *versus* control (*Ctrl*) cells. (Fig. 6G). Similar results were found using colony formation assays (**supplemental Fig. S3A**) and soft agar colony assays (**supplemental Fig. S3B**) in cells transfected with siSAM1, further supporting our data.

In conclusion, our results suggest that Sam68 specifically binds to a 22-bp region within exon 3 to promote its exclusion, thereby increasing the expression of survivin DEx3 mRNA.

## Discussion

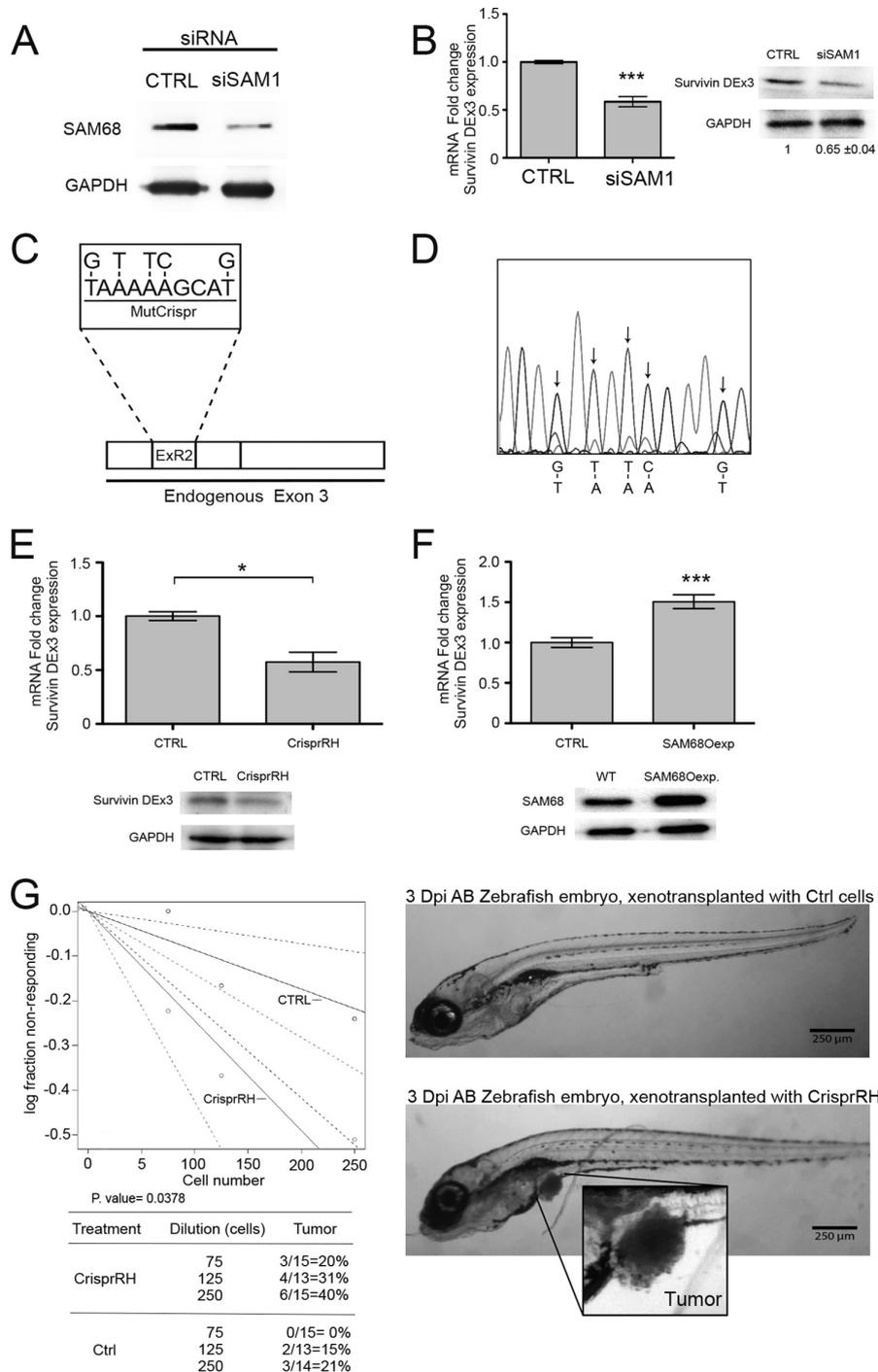
The appearance and deregulation of new transcripts because of AS play a crucial role in tumor development and patient survival because of their involvement in various carcinogenic processes, such as proliferation, apoptosis, and metastasis (28). Thus, understanding the molecular mechanisms that regulate AS will open new avenues for the development of novel splicing modulation strategies (29). Notably, *de novo* expression of anti-apoptotic survivin is a nearly universal feature in cancer, including breast, colon, lung, pancreatic, gastric, and bladder cancers, supporting a role in cancer development. Overexpression of this protein has been implicated in various processes associated with tumor progression, metastasis, and angiogenesis. Survivin is a key anti-apoptotic protein and is involved in mitosis, especially as part of the chromosomal passenger complex, which regulates chromosome segregation and cytokinesis (10, 30). In addition to survivin, five other isoforms generated through alternative splicing have been identified as follows: survivin DEx3, survivin 2B, survivin 2 $\alpha$ , survivin 3B, and the recently described survivin 2B+32 (13). These isoforms present differential expression that depends on the type and stage of cancer. As a consequence, some isoforms are better diagnostic or prognostic markers than survivin, pointing toward specific regulation and roles in each type of tumor. A clear example is survivin DEx3. This isoform is generated by the loss of exon 3 and possesses a new carboxyl terminus, and it exhibits nuclear and mitochondrial localization that is not observed for other isoforms. Its anti-apoptotic features and specific overexpression in thyroid cancer, breast cancer, ovarian cancer, and glioblastoma make survivin DEx3 a better diagnostic marker than survivin in these tumors.

In the present work, we identified several important regions that regulate survivin AS. For this purpose, we constructed an M that contains the minimum elements required to undergo exon 3 splicing. We then generated a series of deletions to identify possible *cis*-elements involved in AS. Deleting 200 bp upstream or 100 bp downstream of exon 3 increased exon exclusion, as reported for other genes (23). Using a similar approach, we then analyzed possible regulatory elements present in exon 3. Deleting the first 22 bp of exon 3 (Ex3 $\Delta$ 1 region)

## Survivin DEx3 alternative splicing regulation

had a dramatic effect on the ratio of the two isoforms, favoring the exclusion of exon 3 and, consequently, increased expression of the SDx3M isoform at the expense of the SurM isoform. The second and third deletions also increased the expression of the SDx3M isoform, but in this case, SurM expression remained similar to the control, possibly because of the presence of a site or sites with an auxiliary role in exon 3 recognition. Because the

most remarkable shift in the ratio of the two isoforms was caused by the Ex3 $\Delta$ 1 deletion, we analyzed the loss of function of recognition elements by introducing mutations in the potential binding sites of *trans* factors. For this purpose, we divided these 22 bp into the three subregions or binding clusters, designated ExR1, ExR2, and ExR3, based on the potential factors that bind these sequences. Because of the size of the subregions



and factor clustering, mutations in each subregion were expected to prevent the binding of several putative *trans* factors. Unexpectedly, we found that a mutation in the second cluster (ExR2) had a significant effect on the ratio of the two isoforms, increasing the expression of SurM. As we did not detect an effect when either of the surrounding regions (ExR1 and ExR3) were mutated, we hypothesized that these regions in combination have an antagonistic effect on the middle region, perhaps via steric hindrance of an unknown factor. Hence, we generated a double mutant construct (DobMutEx). As expected, DobMutEx affected the ratio of the two isoforms, thus increasing the exclusion of the exon and increasing SDx3M expression, similar to what we observed for the Ex3Δ1 deletion. Therefore, we identified a possible new exonic splicing silencer *cis*-acting element in the first 22 bp of survivin exon 3. The next step was to identify the possible *trans*-acting factor(s) that may interact with this region to regulate the AS of survivin DEx3 mRNA.

Binding prediction programs identified SRp40, SRp55, hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F, Sam68, hnRNP G, hTra2β, and ASF/SF2 as potential regulators. Interestingly, these factors are involved in regulating the AS of a variety of genes involved in cancer (4, 31–33). We performed pulldown and siRNA assays to identify which of these factors were involved in regulating survivin AS. We also used RNA probes that contained mutations in the binding sites for specific RNA binding proteins (RBPs), such as Sam68, hnRNP G, hTra2β, and ASF/SF2, for pulldown analyses. Through these analyses, we identified Sam68 as a *bona fide* regulator of survivin DEx3 mRNA AS. Several reports have shown that Sam68 exhibits important oncogenic functions through splicing modulation of cancer genes. Sam68, the best-characterized member of the STAR proteins, is implicated in cell cycle progression, apoptosis, and tumorigenesis (34). Sam68 plays an important role in regulating the AS of specific mRNAs, acting as a splicing repressor or enhancer. Sam68 regulates the AS of CD44 (35) and promotes the inclusion of exon 5 through phosphorylation and ERK1/2 signaling in mouse T lymphoma cells (36). In addition, Sam68 is required for the AS of human papillomavirus (HPV), promoting exon E6 inclusion (37). Moreover, the Sam68 protein is involved in the epithelial to mesenchymal transition during tumor metastasis by means of regulating the AS of ASF/SF2 (38). Furthermore, Sam68 overexpression plays a role in apoptosis by modulating the AS of BCL-X isoforms in cooperation with hnRNP A1 in prostate and breast carcinoma (39). This finding was consistent with our previous results based on the

Mut2Ex3 mutation, which modified the Sam68 binding site and consequently altered the proportion of the isoforms to favor the SurM isoform (decreasing exon 3 exclusion). Other factors such as hnRNP G and hTra2β did not bind to any of the probes, excluding their involvement in the regulation of survivin DEx3 mRNA AS.

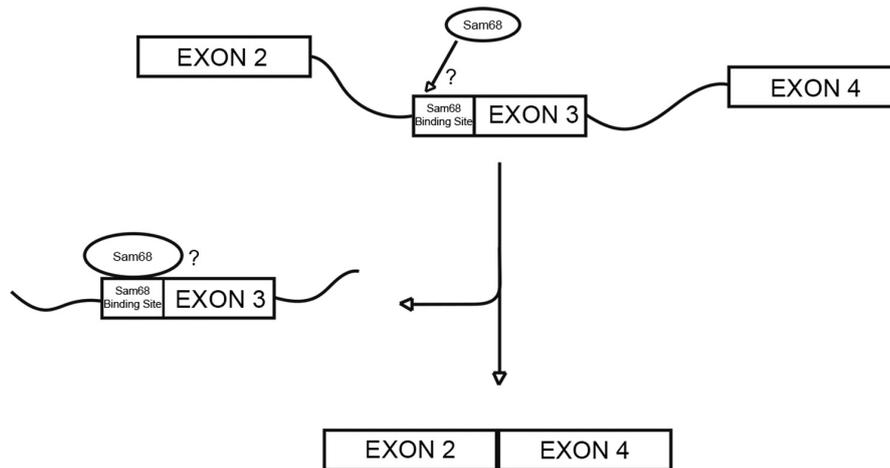
To further support the role of Sam68 in survivin AS, an siRNA (siSAM1) was designed to inhibit Sam68 expression and analyze its effect on endogenous survivin DEx3 mRNA. As expected, we observed a reproducible decrease in the expression of endogenous survivin DEx3.

To explore if the Sam68 binding site is important for regulating the AS of endogenous survivin exon 3, we designed two mutant cell lines using a CRISPR/Cas9 approach. Our results showed that mutating the Sam68 binding site resulted in a decreased survivin DEx3. We then evaluated if the alteration of the binding site or the inhibition of Sam68 were physiologically relevant. For this, we performed xenotransplant dilution assays and colony formation assays. As expected, we observed an increase in tumorigenicity and in colony-forming ability. Therefore, these results suggest that decreased survivin DEx3 expression increases tumor formation. This result correlates with our previous report (15) in which the overexpression of survivin DEx3 decreased the ability of HeLa cells to form colonies, as well as the capacity to form tumor spheroids. Although not explored, an increase in the number of tumor-initiating cells may underlie these effects, as has been reported previously (40, 41).

One possible model to explain our data is that the binding of Sam68 at survivin exon 3 determines whether the splicing machinery recognizes exon 3. If Sam68 is absent at this site, perhaps because of the binding of a putative unknown factor to the adjacent regions, then the 5' splice site of exon 3 will be recognized and included. Conversely, if Sam68 is present, the 5' site of exon 3 will be blocked, and the exon will not be recognized and will not be included in the transcript (Fig. 7). A previous study showed that ASF/SF2 can bind to survivin mRNA without interfering with its splicing but does affect mRNA translation (25). Interestingly, we also found that ASF/SF2 bound to exon 3 of survivin in two regions surrounding the Sam68 binding site. We hypothesized that ASF/SF2 binding may exclude Sam68 from its consensus site, but we were unable to identify interference among these factors. These results suggest that another factor or factors compete with Sam68 for the recognition of exon 3, resulting in a balance of the expression of the two isoforms.

**Figure 6. Sam68 regulates the alternative splicing of endogenous survivin DEx3 mRNA.** *A*, Western blot analyses of HeLa cells transfected with an siRNA against Sam68, showing the resulting knockdown efficiency. GAPDH expression was used as an internal control. *B*, bar graph (*left panel*) showing the relative fold-change in endogenous survivin DEx3 mRNA expression determined via qPCR after siRNA targeting Sam68 was transfected into HeLa cells (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 4$ ). GAPDH was used as a constitutive gene. Western blot analyses (*right panel*) of survivin DEx3 in HeLa cells transfected with a siRNA against Sam68. A representative image is shown, and the densitometry values (mean  $\pm$  S.D.) from three replicates appear under the image. *C*, schematic diagram of the endogenous exon 3, as well as the position of the mutation in the ExR2 region. *D*, electropherogram showing the mutated bases in endogenous survivin exon 3 after CRISPR/Cas9 mutation. The arrows indicate the position of the mutated bases. The combined peaks in each position show a heterozygous locus and lower allele fraction in the cultivated cells. *E*, bar graph (*upper panel*) showing the relative expression of endogenous survivin DEx3 mRNA expression determined by qPCR in HeLa Cas9 cells and CRISPRRH cells ( $n = 3$ ). GAPDH was used as a constitutive gene. Western blot analyses (*lower panel*) of survivin DEx3 in CRISPRRH cells. *F*, bar graph (*upper panel*) showing the relative expression of endogenous survivin DEx3 mRNA determined by qPCR after Sam68 overexpression (Sam68Oexp) in HeLa cells. Mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ . Western blot analyses (*lower panel*) of Sam68 overexpression. *G*, xenotransplant dilution assays using a zebrafish model. *Right panel*, tumors developed in zebrafish embryos at 3 dpi with HeLa CRISPRRH cells or HeLa Cas9 control (*Ctrl*) cells. *Left panel*, limiting dilution analysis obtained with the extreme limiting dilution assays (ELDA) software. Plot shows the percentage of embryos injected with CRISPRRH1 or *Ctrl* cells with abdominal tumors at 4 dpi. The  $p$  values from Student's  $t$  test (*B*, *E*, and *F*) are reported. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; n.s., not significant.

## Survivin DEx3 alternative splicing regulation



**Figure 7. A possible model of the regulation of exon 3 skipping by Sam68 is shown.** When Sam68 is expressed and bound to exon 3 in the first 22 bp, it blocks the recognition of exon 3, causing skipping of exon 3. When Sam68 is down-regulated, posttranslationally modified, or excluded through steric hindrance by an unknown factor, exon 3 is recognized and included in the mRNA.

In conclusion, this is the first work that provides evidence that inhibiting Sam68 or disrupting its *cis*-acting elements modulates survivin DEx3 splicing. Delving into the mechanism of survivin DEx3 AS is crucial because of the importance of this isoform in cancer progression and as a possible diagnostic and prognostic marker.

### Experimental procedures

#### Minigene construction

We constructed an M via PCR. As a template, we used human genomic DNA obtained from peripheral blood that was purified with the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Valencia, CA). The M was amplified in three separate reactions. The first reaction amplified 550 bp of the *survivin* gene, including exon 2 and part of intron 2. The following primers were used: (forward) 5'-CGGGCTGCCAAGCTTACTCACGAGCTG-3' and (reverse) 5'-AGCCTCCGGATCCGTGAAGTGCACACTT-3', which contained HindIII and BamHI sites. The second round of PCR amplified 1,551 bp of the *survivin* gene, including exon 3 and parts of introns 2 and 3, using the primers (forward) 5'-TTCTCTGCCCTGGATCCTTACAGTGGGC-3' and (reverse) 5'-AATAAAAAGAATTCCCTGAGGCCAGGTGTG-3', which contained BamHI and EcoRI sites. Finally, the third round of PCR amplified a 470-bp region of the *survivin* gene, including part of intron 3 and part of exon 4, with the primers (forward) 5'-AGTAGGAATTCGGGAGCACCCAGCGC-3' and (reverse) 5'-GAATACTCGAGGGAAGTGGTGCAGCCACTC-3'; these primers contained EcoRI and XhoI sites. The M was cloned into the plasmid pcDNA 3.1(+) (Invitrogen) in three steps. All fragments were verified by sequencing. All oligonucleotides were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

#### Deletions

M deletions were performed using the QuikChange Lightning Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as indicated in a previously published procedure (42), with minor modifications. The PCR program was modified to 18 cycles (95 °C for 20 s, 54 °C for 10 s, and 68 °C for 4 min 30 s) for exon deletions

and 18 cycles (95 °C for 20 s, 55 °C for 10 s, and 68 °C for 4 min 30 s) for intron deletions. Fourteen deletions were introduced into the introns via PCR, including seven deletions upstream of exon 3 ( $\Delta$ I1,  $\Delta$ I2,  $\Delta$ I3,  $\Delta$ I4,  $\Delta$ I5,  $\Delta$ I6, and  $\Delta$ I7) and seven deletions downstream of exon 3 ( $\Delta$ I8,  $\Delta$ I9,  $\Delta$ I10,  $\Delta$ I11,  $\Delta$ I12,  $\Delta$ I13, and  $\Delta$ I14). Each deletion was 100 bp long, covering 700 bp on both sides of exon 3. The regions 60 bp upstream of exon 3 and 10 bp downstream of exon 3 were conserved to retain the splicing consensus sites. In exon 3, three deletions were generated with the same methodology. We divided exon 3 into three sections as follows: the first 22 bp from the 5' side were deleted in the Ex3 $\Delta$ 1 construct, whereas the next 49 bp were deleted in Ex3 $\Delta$ 2 and finally 37 bp in Ex3 $\Delta$ 3. These sections were selected following *in silico* analysis of splicing elements (see "Identification of intronic and exonic *cis* elements that regulate survivin AS"). The splicing consensus sites of the exon 3'-GA and 5'-TG were conserved, in addition to 5 bp on each side of exon 3. All of the primers used in this procedure are described in supplemental Table S1. All deletions were verified by Sanger sequence analysis.

#### Mutations

Three site-directed mutations were generated in exon 3, which were designated Mut1Ex3, Mut2Ex3, and Mut3Ex3. The mutations were generated via PCR using the QuikChange Lightning Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. The PCR program was modified to 18 cycles (95 °C for 20 s, 55 °C for 10 s, and 68 °C for 4 min 30 s). All mutations were verified by Sanger sequencing. For the generation of MutDobEx, which is a double mutation of the putative *cis*-acting elements, we used the template of the Mut1Ex3 construct and inserted the mutation into the Mut3Ex3 construct through PCR, using the aforementioned PCR program. All of the primers used in this procedure are listed in supplemental Table S1.

#### Cell culture and transfection

Cervical adenocarcinoma (HeLa) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% FBS (ATCC, Manassas, VA). HeLa cells ( $6.8 \times 10^4$ ) were

cultured in 24-well plates and transfected with 800 ng of plasmid DNA from each of the constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Then, 48 h after transfection, RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and TRIzol (Invitrogen). Three biological replicates were performed for each condition.

#### Soft agar colony assay

HeLa cells transiently transfected with Sam68 siRNA (siSAM1) or control siRNA (CTRL) were suspended in 0.33% agar with DMEM containing 5% fetal bovine serum. Then,  $5.5 \times 10^3$  cells were seeded in triplicate in a 6-well plate onto a 0.5% agar base. Cultures were maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 13 days. Colonies were stained with 0.005% crystal violet and photographed on a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) using Image Lab software. Images were quantified using the ColonyArea plugin of ImageJ. Two independent experiments were performed.

#### Colony formation assay

HeLa cells transiently transfected with Sam68 and control siRNAs were seeded at 100 cells per well in a 6-well plate in triplicate. Cultures were followed for 12 days. Colonies were fixed with 70% ethanol and stained with 0.1% crystal violet as described (43, 44). Stained plates were photographed on a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) using Image Lab software. For colony quantification, the ColonyArea plugin of ImageJ was used. Two independent assays were performed.

#### RT-PCR

PCR was performed to measure the relative abundance and expression of the M transcripts. T7 and BGH primers were used, as both recognize regions in the pcDNA 3.1 vector, avoiding endogenous survivin mRNA and its isoforms. One microgram of RNA was used for the reverse transcription (RT) reaction with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). For PCR, each reaction contained 200 μM dNTP, 0.2 μM primers, and 1.25 units of Taq Gold DNA Polymerase (Roche), and the PCR program consisted of 35 cycles of 95 °C for 30 s, 47 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. The PCR products were analyzed via 2% agarose gel electrophoresis.

For RT-PCR analyses of endogenous survivin, the following primers were used: (forward) 5'-GCCATGAATTCATGGGT-GCCCCGACGTTGC-3' and (reverse) 5'-AGCTCTCT-AGAGAGGCCTCAATCCATGGCA-3' (Integrated DNA Technologies). The PCR conditions consisted of a pre-step of 3 cycles of 95 °C for 30 s, 68 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Quantitative PCR (qPCR) assays for endogenous survivin and survivin DEx3 mRNA were performed using TaqMan Universal PCR Master Mix and TaqMan probes for survivin mRNA (Hs00977612\_mH), survivin DEx3 mRNA (Hs03043576\_m1), and GAPDH mRNA (Hs00266705\_g1) (Applied Biosystems) under the recommended PCR conditions (95 °C for 10 m, 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, for 40 cycles). Amplification of the SDx3M isoform was performed using SYBR Select Master Mix, and the following primers were used: (forward) 5'-GAC-

CCCATGCAAAGGAAAC-3' and BGH primer, and the PCR program consisted of 40 cycles (95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s). All assays were carried out on a QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems); three biological replicates were performed for each condition. The Sam68 overexpression plasmid was obtained from OriGene Technologies Inc. (Rockville, MD) and transfected using Lipofectamine 2000. For the RT-PCR analyses of endogenous BCL-X, the following primers were used: (forward) 5'-ATG-TCTCAGAGCAACCGGGAGCTG-3' and (reverse) 5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGAAGCC-3' (Integrated DNA Technologies). The PCR conditions consisted of 40 cycles of 95 °C for 30 s, 63 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. For endogenous SMAC the following primers were used: (forward) 5'-GCGCG-GATCCATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCT-3' and (reverse) 5'-AGCTCTCTAGACTCAGGCCCTCAATCCTCACGC-3' (Integrated DNA Technologies). The PCR conditions consisted of a pre-step of 3 cycles of 95 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 68 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min.

#### siRNA transfection

The sequences used for siRNA are described in supplemental Table S1. We designed five siRNAs (Integrated DNA Technologies) to inhibit the expression of the SRp55, SRp40, hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F, and Sam68 genes, as well as an siRNA targeting the Luciferase gene as a control (CTRL). Each siRNA was cloned into the pSIREN-retroQ vector (Clontech), and cells were transfected using the FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. After 72 h, RNA and protein were extracted for downstream analysis.

#### Computational analysis of cis and trans elements

Three different programs were used to predict putative cis and trans AS elements: splicing Rainbow (discontinued in 2012), ESEfinder 3.0 (45), and SpliceAid 2 (46). WebLogo was employed to align the first 22 bp of exon 3 from 15 different species (47).

#### Whole-cell lysate and Western blot analyses

Cells were lysed with the M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) and supplemented with a protease inhibitor mixture (Sigma), and total proteins were resolved via 12% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (EMD Millipore, Billerica, MA). The primary antibodies used in these assays were anti-Sam68 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), anti-SF2/ASF (96) (Santa Cruz Biotechnology), anti-RBMX (hnRNP G) (H-80) (Santa Cruz Biotechnology), anti-TRA2B (Abcam, Cambridge, UK), anti-survivin DEx3 (Abcam), and anti-GAPDH (FL-335) (Santa Cruz Biotechnology).

#### RNA pulldown assays

RNA probes were purchased from Integrated DNA Technologies, and HeLa protein was used for the assays. A Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-down Kit (Thermo Scientific) was used according to an established protocol, with slight modifications.

## Survivin DEx3 alternative splicing regulation

For the ligation of desthiobiotinylated cytidine bisphosphate to the 3' end of the RNA probe, 60 pmol of the RNA probe was used. Protein and RNA were incubated for 2 h under orbital rotation. The RNA-binding protein complex was washed four times with 100 mM KCl (48) and then four times with 1× wash buffer. The sequences of the RNA probes were as follows: (WTE<sub>x3</sub>) ACAUAAAAAGCAUUCGU, (M2Ex<sub>3</sub>) ACA-GAUUUCGAAGUCGU, (WTL) AGAGAGGAACAUA-AAAGCAUUCGUCCGGUUG, and (DoBML) AGCCA-GAUUUCUAAAAAGCCUGAUUAGAUUG. All RNA probes were obtained from Integrated DNA Technologies.

### Mutation of the endogenous survivin exon 3 by CRISPR/Cas9

To mutate exon 3 of endogenous survivin, the Alt-R CRISPR/Cas9 System (Integrated DNA Technologies) was used, with some modifications. A guide RNA (crRNA) was designed using the CRISPR Design software (<http://crispr.mit.edu>).<sup>5</sup> The sequence used in the experiments was GAACAUA-AAAGCAUTC; the tracrRNA and crRNA oligonucleotides were obtained from Integrated DNA Technologies. The lenti-Cas9-Blast was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid no. 52962). The RNA oligonucleotides were mixed in an equimolar concentration to create a final complex concentration of 3 μM. For the homologous recombination (HR) process required to create the mutant, an ssDNA oligo targeting exon 3 of the survivin gene at 100 nM concentration was used. This oligonucleotide contained a mutation to affect the binding of Sam68. The sequence used was TTGTTTGTATTTTCTAGAGAGG-AACAGATATCGCAGTCGTCGGTTGC.

HeLa cells were stably transfected with the Cas9 plasmid using the Lipofectamine 2000 transfection reagent according to manufacturer's protocol (Invitrogen) and selected using 6 μg/ml of blasticidin. RNAiMAX (Invitrogen) was used to transfect the complexed tracrRNA:crRNA and the ssDNA oligonucleotide according to the manufacturer's protocol. The cells used to form single-cell colonies were named CRISPRRH1 and CRISPRRH2. These clones were validated by Sanger sequencing to verify the presence of the mutations.

### Xenotransplant assays

The zebrafish AB wild-type strain was kindly donated by Dr Hilda Lomely from IBT-UNAM. Adult zebrafish were maintained at 28 °C in standard conditions (pH 7.2–7.4; 14 h on and 10 h off light cycle). Fish embryos were obtained by natural crosses and then maintained at 28 °C in embryo medium (49, 50). Cell xenotransplants were carried out in the embryonic yolk sacs of embryos 2 days post fertilization (dpf) that were previously dechorionated and anesthetized with tricaine (MS-222; Sigma). Both CRISPRRH1 cells and control cells were resuspended at a concentration of 4 × 10<sup>6</sup> cells/100 μl, and 75, 125, or 250 cells were microinjected for each group. To study tumorigenic capacity, ~15 embryos were microinjected with each group of cells and monitored for 4 days post injection (dpi) for tumor formation. *In vivo* limiting dilution assays were analyzed using the extreme limiting dilution assays (ELDA) soft-

ware (51) which employs a generalized linear model used to compare active cell frequencies in cell populations.

### Statistical analysis

Student's *t* test was used to compare two conditions. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test was used to analyze three or more conditions. Standard deviation bars are shown in all graphs, and *p* < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

*Author contributions*—J. G.-C. conducted most of the experiments, analyzed the results, and wrote the article. C. G.-T. conducted replicates and independent experiments. V. M. coordinated and analyzed the replicated data and independent experiments. G. C.-C. analyzed the data and wrote the paper. C. Z. performed zebrafish *in vivo* experiments. J. M.-Z. coordinated the study, analyzed the data, and wrote the paper with J. G.-C. and G. C.-C.

*Acknowledgments*—We thank Dr. Hilda Lomely from IBT-UNAM for donating the zebrafish AB wild-type strain.

### References

1. Sanchez, S. E., Petrillo, E., Kornblihtt, A. R., and Yanovsky, M. J. (2011) Alternative splicing at the right time. *RNA Biol.* **8**, 954–959
2. Nilsen, T. W., and Graveley, B. R. (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* **463**, 457–463
3. Wang, Z., and Burge, C. B. (2008) Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* **14**, 802–813
4. Han, S. P., Tang, Y. H., and Smith, R. (2010) Functional diversity of the hnRNPs: Past, present and perspectives. *Biochem. J.* **430**, 379–392
5. Zhong, X. Y., Ding, J. H., Adams, J. A., Ghosh, G., and Fu, X. D. (2009) Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev.* **23**, 482–495
6. Tazi, J., Bakkour, N., and Stamm, S. (2009) Alternative splicing and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 14–26
7. Barash, Y., Calarco, J. A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B. J., and Frey, B. J. (2010) Deciphering the splicing code. *Nature* **465**, 53–59
8. Douglas, A. G., and Wood, M. J. (2011) RNA splicing: Disease and therapy. *Brief. Funct. Genomics* **10**, 151–164
9. Bonomi, S., Gallo, S., Catillo, M., Pignataro, D., Biamonti, G., and Ghigna, C. (2013) Oncogenic alternative splicing switches: Role in cancer progression and prospects for therapy. *Int. J. Cell Biol.* **2013**, 962038
10. Mita, A. C., Mita, M. M., Nawrocki, S. T., and Giles, F. J. (2008) Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5000–5005
11. Pavlidou, A., Dalamaga, M., Kroupis, C., Konstantoudakis, G., Belimezi, M., Athanasas, G., and Dimas, K. (2011) Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR. *World J. Gastroenterol.* **17**, 1614–1621
12. Pavlidou, A., Kroupis, C., and Dimas, K. (2014) Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 883–894
13. de Necochea-Campion, R., Chen, C.-S., Mirshahidi, S., Howard, F. D., and Wall, N. R. (2013) Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Lett.* **339**, 167–174
14. Fukuda, S., and Pelus, L. M. (2006) Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1087–1098
15. Espinosa, M., Ceballos-Cancino, G., Callaghan, R., Maldonado, V., Patiño, N., Ruíz, V., and Meléndez-Zajgla, J. (2012) Survivin isoform Delta Ex3 regulates tumor spheroid formation. *Cancer Lett.* **318**, 61–67

<sup>5</sup> Please note that the JBC is not responsible for the long-term archiving and maintenance of this site or any other third party hosted site.

16. Huang, Y., Chen, X., Chen, N., Nie, L., Xu, M., and Zhou, Q. (2011) Expression and prognostic significance of survivin splice variants in diffusely infiltrating astrocytoma. *J. Clin. Pathol.* **64**, 953–959
17. Waligórska-Stachura, J., Andrusiewicz, M., Sawicka-Gutaj, N., Biczysko, M., Jankowska, A., Kubiczak, M., Czarnywojtek, A., Wrotkowska, E., and Ruchała, M. (2014) Survivin delta Ex3 overexpression in thyroid malignancies. *PLoS One* **9**, e100534
18. Taubert, H., Kappler, M., Bache, M., Bartel, F., Köhler, T., Lautenschläger, C., Blümke, K., Würfl, P., Schmidt, H., Meye, A., and Hauptmann, S. (2005) Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. *Oncogene* **24**, 5258–5261
19. Nouraei, N., Mowla, S. J., Ozhand, A., Parvin, M., Ziaee, S. A. M., and Hatefi, N. (2009) Expression of survivin and its spliced variants in bladder tumors as a potential prognostic marker. *Urol. J.* **6**, 101–108
20. Loperigolo, A., Tavecchio, M., Lisanti, S., Ghosh, J. C., Dohi, T., Favarsani, A., Vaira, V., Bosari, S., Tanigawa, N., Delia, D., Kossenkov, A. V., Showe, L. C., and Altieri, D. C. (2012) Chk2 phosphorylation of survivin-ΔEx3 contributes to a DNA damage-sensing checkpoint in cancer. *Cancer Res.* **72**, 3251–3259
21. Krieg, A., Mahotka, C., Krieg, T., Grabsch, H., Müller, W., Takeno, S., Suschek, C. V., Heydthausen, M., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. (2002) Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: First clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br. J. Cancer* **86**, 737–743
22. Malces, M. H., Wang, H. W., Koumi, A., Tsai, Y. H., Yu, M., Godfrey, A., and Boshoff, C. (2007) Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin-ΔEx3 during TNFα-mediated cell death. *Br. J. Cancer* **96**, 1659–1666
23. Cooper, T. A. (2005) Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods* **37**, 331–340
24. Kechris, K., Yang, Y. H., and Yeh, R. F. (2008) Prediction of alternatively skipped exons and splicing enhancers from exon junction arrays. *BMC Genomics* **9**, 551
25. Ezponda, T., Pajares, M. J., Agorreta, J., Echeveste, J. I., López-Picazo, J. M., Torre, W., Pio, R., and Montuenga, L. M. (2010) The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4113–4125
26. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., and Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832
27. Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., and Joung, J. K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279–284
28. Bielli, P., Bordi, M., Di Biasio, V., and Sette, C. (2014) Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* **42**, 12070–12081
29. Spitali, P., and Aartsma-Rus, A. (2012) Splice modulating therapies for human disease. *Cell* **148**, 1085–1088
30. Altieri, D. C. (2008) New wirings in the survivin networks. *Oncogene* **27**, 6276–6284
31. Fredericks, A. M., Cygan, K. J., Brown, B. A., and Fairbrother, W. G. (2015) RNA-binding proteins: Splicing factors and disease. *Biomolecules* **5**, 893–909
32. Long, J. C., and Caceres, J. F. (2009) The SR protein family of splicing factors: Master regulators of gene expression. *Biochem. J.* **417**, 15–27
33. Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J. F., Revil, T., and Chabot, B. (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv. Exp. Med. Biol.* **623**, 123–147
34. Frisone, P., Pradella, D., Di Matteo, A., Belloni, E., Ghigna, C., and Paronetto, M. P. (2015) SAM68: Signal transduction and RNA metabolism in human cancer. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 528954
35. Matter, N., Herrlich, P., and König, H. (2002) Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420**, 691–695
36. Cheng, C., and Sharp, P. A. (2006) Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 362–370
37. Rosenberger, S., De-Castro Arce, J., Langbein, L., Steenbergen, R. D., and Rösl, F. (2010) Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6\* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7006–7011
38. Valacca, C., Bonomi, S., Buratti, E., Pedrotti, S., Baralle, F. E., Sette, C., Ghigna, C., and Biamonti, G. (2010) Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *J. Cell Biol.* **191**, 87–99
39. Bielli, P., Busà, R., Di Stasi, S. M., Muñoz, M. J., Botti, F., Kornblihtt, A. R., and Sette, C. (2014) The transcription factor FBI-1 inhibits SAM68-mediated BCL-X alternative splicing and apoptosis. *EMBO Rep.* **15**, 419–427
40. Siddharth, S., Das, S., Nayak, A., and Kundu, C. N. (2016) SURVIVIN as a marker for quiescent-breast cancer stem cells—an intermediate, adherent, pre-requisite phase of breast cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **33**, 661–675
41. Carter, B. Z., Qiu, Y., Huang, X., Diao, L., Zhang, N., Coombes, K. R., Mak, D. H., Konopleva, M., Cortes, J., Kantarjian, H. M., Mills, G. B., Andreeff, M., and Kornblau, S. M. (2012) Survivin is highly expressed in CD34(+)-38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML. *Blood* **120**, 173–180
42. Hansson, M. D., Rzeznicka, K., Rosenbäck, M., Hansson, M., and Sirijovski, N. (2008) PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Anal. Biochem.* **375**, 373–375
43. Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K. (1996) A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1518–1520
44. Guzmán, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J., and Abankwa, D. (2014) ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One* **9**, e92444
45. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q., and Krainer, A. R. (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3568–3571
46. Piva, F., Giulietti, M., Burini, A. B., and Principato, G. (2012) SpliceAid 2: A database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum. Mutat.* **33**, 81–85
47. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190
48. Talukdar, I., Sen, S., Urbano, R., Thompson, J., Yates, J. R., 3rd, Webster, N. J. (2011) hnRNP A1 and hnRNP F modulate the alternative splicing of exon 11 of the insulin receptor gene. *PLoS One* **6**, e27869
49. Westerfield, M. (2000) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th ed., University of Oregon Press, Eugene, OR
50. Westerfield, M. (1993) *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Brachydanio rerio)*, M. Westerfield, Eugene, OR
51. Hu, Y., and Smyth, G. K. (2009) ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **347**, 70–78

**Protein Sam68 regulates the alternative splicing of survivin DEx3**  
Javier Gaytan-Cervantes, Carolina Gonzalez-Torres, Vilma Maldonado, Cecilia Zampedri, Gisela Ceballos-Cancino and Jorge Melendez-Zajgla

*J. Biol. Chem.* 2017, 292:13745-13757.

doi: 10.1074/jbc.M117.800318 originally published online June 27, 2017

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M117.800318](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800318)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2017/06/27/M117.800318.DC1>

This article cites 49 references, 15 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/292/33/13745.full.html#ref-list-1>