



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas-Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

**NUAK1 y cáncer: Elucidando los mecanismos
moleculares involucrados en la regulación y función de la
quinasa NUAK1.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Mario Palma Alarcón
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Dr. Ariel Castro
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr.
Ariel Castro
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra.
Violeta Morín
Facultad de Ciencias Biológicas



Dra.
María de los Angeles García
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr.
Luís Sobrevía
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr.
Juan Pablo Henríquez
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Resumen

NUAK1 es una serina/treonina quinasa miembro de la familia de AMPK- α . NUAK1 regula varios procesos involucrados en tumorigénesis, sin embargo, su regulación y blancos moleculares asociados a estos procesos son aún desconocidos. En este estudio se identificaron nuevos mecanismos moleculares involucrados en la regulación y función de NUAK1 que son dependientes de su localización sub-celular. Utilizando diversos análisis bioinformáticos y mutantes de NUAK1 identificamos una SLN-bipartita funcional conservada entre NUAK1 humano y murino que se localiza hacia la región N-terminal. Realizando análisis de espectrometría de masas y su respectiva validación determinamos que NUAK1 interacciona con la importina- β 1, IPO7 y IPO9. Utilizando inhibidores para la importina- β 1 y *shRNAs* para IPO7 y IPO9 validamos que todas ellas son requeridas para el transporte nuclear de NUAK1. Adicionalmente, determinamos que el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y privación de glucosa inducen la acumulación citoplasmática de NUAK1. Estos resultados determinaron un nuevo mecanismo de regulación de NUAK1 y además sugirieron que existen funciones dependientes de su localización sub-celular. Para evaluar esta idea, realizamos análisis de espectrometría de masas (*MudPIT*) de la fracción nuclear y citoplasmática de células iMEF expresando FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA, una mutante principalmente citoplasmática. Utilizando diferentes aproximaciones bioinformáticas identificamos potenciales funciones nucleares y citoplasmáticas de NUAK1 asociadas al procesamiento del ARN y al metabolismo de la glucosa. En esta área, se validó que hnRNPK es un nuevo interactor nuclear y potencial blanco de NUAK1 que regula el procesamiento del ARN. Por otro lado, la fosfoglicerato quinasa-1 (PGK1) y las tres isoformas (PFKP, PFKM y PFKL) de la Fosfofructoquinasa-1 (PFK1) son nuevos interactores y potenciales blancos citoplasmáticos de NUAK1 que regulan el metabolismo de la glucosa. La interacción de NUAK1 y PFKP fue modulada por la privación de glucosa y factores de crecimiento que afectaron la localización sub-celular de NUAK1, sugiriendo que el contexto celular es crucial para promover esta interacción. Con estos datos, evaluamos el efecto de NUAK1 sobre la actividad y/o función de PFK1, determinando que NUAK1 inhibe a la PFK, aumenta los niveles de NADPH y disminuye el estrés oxidativo. Por lo tanto, proponemos que la quinasa NUAK1 regula el metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo, ya que conecta la glicólisis y la vía de las pentosas a través de la regulación de PFK1. Complementario a lo anterior, los péptidos de dos enzimas de la vía de las pentosas; 6PGL (*Pgls*) y TKT también fueron detectados en los datos de la espectrometría de masas. En resumen, debido a la relevancia de la regulación del metabolismo celular y el estrés oxidativo en la adaptación de las células cancerosas y su supervivencia, los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de NUAK1 tiene una potencial aplicación terapéutica dependiendo del tipo de cáncer.

Summary

NUAK1 is a serine/threonine kinase member of the AMPK- α family. NUAK1 regulates several processes in tumorigenesis; however, its regulation and molecular targets associated to these processes are still poorly understood. Our results determined the molecular mechanism involved in the regulation and function of NUAK1 depending on its subcellular localization. Through bioinformatic analysis and studies comparing subcellular localization of wild-type and NUAK1 mutants, we identified a conserved bipartite nuclear localization signal (NLS) at the N-terminal region of NUAK1. Based on mass spectrometry analysis, we found that NUAK1 interacts with importin- β members including importin- β 1 (KPNB1), importin-7 (IPO7), and importin-9 (IPO9). We confirmed that importin- β members are responsible for NUAK1 nuclear import through the inhibition of importin- β 1 by importazole and the knockdown of either IPO7 or IPO9. Additionally, we found that oxidative stress induces NUAK1 cytoplasmic accumulation, indicating that oxidative stress affects NUAK1 nuclear transport. Thus, our study is the first evidence of an active nuclear transport mechanism regulating NUAK1 subcellular localization. These data suggested specific functions of NUAK1 according its subcellular distribution. To test this idea, we performed MudPIT analysis of the nuclear and cytoplasmic fractions of iMEF cells expressing FLAG-mNUAK1 WT or a nuclear localization-deficient mutant of NUAK1, FLAG-mNUAK1 KR44/71AA. Using different bioinformatic approaches, we identified potential new nuclear and cytoplasmic functions of NUAK1 associated to RNA processing and glucose metabolism. We validated that hnRNPK is a new nuclear binding partner and potential target of NUAK1 that regulates RNA processing. On the other hand, we found that PGK1, PFKP, PFKM and PFKL are new cytoplasmic binding partners and potential targets of NUAK1 that regulate the glucose metabolism. NUAK1 and PFKP interaction was modulated by glucose deprivation and growth factors, which affected NUAK1 subcellular localization. In addition, we found that NUAK1 inhibited PFK activity, increased NAPDH levels and regulated ROS levels. Therefore, we proposed that NUAK1 is a new regulator of the glucose metabolism that links glycolysis and Pentose phosphate pathway (PPP) through PFK1 regulation. Complementary, in the mass spectrometry analyses we identified the peptides from two enzymes of the PPP; 6PGL (*Pgls*) and TKT. In summary, due to the relevance of the metabolism and ROS regulation in cancer adaptation and survival, we suggest that NUAK1 inhibition has a potential therapeutic application according to the cancer type.

Tabla de contenidos

1. Introducción	1
1.1.- Cáncer y el estrés celular.....	1
1.2.- Cáncer y metabolismo: LKB1/AMPK y las quinasas relacionadas con AMPK.....	1
1.3.- NUA1.....	4
1.4.- Transporte de proteínas entre el núcleo – citosol.....	6
2 Hipótesis y objetivos	14
2.1.- Hipótesis.....	14
2.2.- Objetivo general.....	14
2.3.-Objetivos específicos.....	14
3 Materiales y métodos	15
3.1.- Materiales.....	15
3.1.1.- Reactivos.....	15
3.1.2.- Cultivo Celular.....	15
3.1.3.- Plásmidos.....	16
3.2.- Métodos.....	19
3.2.1.- Fraccionamiento sub-celular.....	19
3.2.2.- <i>Western Blots</i>	19
3.2.3.- Inmunoprecipitación.....	20
3.2.4.- Inmunofluorescencia.....	20
3.2.5.- Purificación de proteínas recombinantes.....	21
3.2.6.- Generación de modelos celulares estables.....	21
3.2.7.- Ensayo de cierre de herida.....	24
3.2.8.- Ensayo de <i>transwell</i>	24
3.2.9.- Análisis de espectrometría de masas, <i>MudPIT</i>	25
3.2.10.- Medición de la actividad de la Fosfofructoquinasa (PFK).....	26
3.2.11.- Medición de los niveles de NADPH.....	26
3.2.12.- Medición de los niveles de estrés oxidativo.....	26
3.2.13.- Análisis bioinformáticos.....	27
3.2.14.- Cuantificación y análisis estadísticos.....	27
4 Resultados	28

4.1.- Objetivo 1: Determinar el mecanismo molecular que media el importe al núcleo de NUAk1.....	28
4.1.1.- Objetivo 1.1: Determinar la(s) secuencia(s) de localización nuclear funcionales para NUAk1.....	30
4.1.1.1.- La región N-terminal de NUAk1 es requerida para su localización nuclear.....	30
4.1.1.2.- NUAk1 tiene una SLN-bipartita conservada hacia la región N-terminal.....	33
4.1.2.- Objetivo 1.2. Determinar la(s) proteína(s) responsable(s) de mediar el importe al núcleo de NUAk1.....	40
4.1.3.- Resumen de los principales logros obtenidos en el Objetivo 1.....	46
4.1.4.- Experimentos adicionales del objetivo 1: Determinar el/los contextos celulares que afectan la localización sub-celular de NUAk1.....	47
4.1.4.1.- El estrés oxidativo induce la acumulación citoplasmática de NUAk1.....	48
4.1.4.2.- Correlación entre la expresión de NUAk1/IPO7 y NUAk1/IPO9 dependiendo del tipo de cáncer, posibles implicancias en la localización sub-celular de NUAk1.....	52
4.1.4.3.- Experimentos adicionales del objetivo 1: NUAk1 citoplasmático promueve la migración celular.....	55
4.1.4.4.- Resumen de los principales logros obtenidos en los experimentos adicionales del objetivo 1.....	57
4.2.- Objetivo 2: Determinar nuevos interactores nucleares y citoplasmáticos de NUAk1 que estén asociados a promover la progresión tumoral.....	59
4.2.1.- Objetivo 2.1: Determinar nuevos interactores de NUAk1 a través de la técnica de <i>MudPIT</i>	59
4.2.2.- Objetivo 2.2: Identificar y clasificar los potenciales interactores y/o blancos de NUAk1 asociados a la progresión tumoral.....	63
4.2.3.- Objetivo 2.3: Validar los nuevos interactores de NUAk1.....	70
4.2.3.1.- NUAk1 interacciona con hnRNPK.....	70
4.2.3.2.- NUAk1 interacciona con PFK1 y PGK1.....	73
4.2.3.3.- La interacción de NUAk1 – PFKP depende del contexto celular y la localización sub-celular de NUAk1.....	79
4.2.4.- Resumen del objetivo 2.....	86
4.2.5.- Experimentos adicionales del objetivo 2: Determinar si NUAk1 fosforila a la Fosfofructoquinasa-1.....	88

4.3.- Objetivo 3: Evaluar el efecto de NUAK1 en la actividad y/o función de los interactores asociados a promover la progresión tumoral.....	91
4.3.1.- NUAK1 inhibe la actividad de la Fosfofructoquinasa.....	91
4.3.2.- NUAK1 afecta los niveles de NADPH.....	93
4.3.3.- NUAK1 regula el estrés oxidativo.....	94
4.4.- Resumen del objetivo 3.....	95
5.- Discusión.....	96
6.- Conclusiones generales.....	110
7.- Agradecimientos.....	111
8.- Bibliografía.....	112
9.- Anexo.....	122



Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Esquema de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK.....	3
Figura 2. Predicciones bioinformáticas de la localización sub-celular de NUA1.....	6
Figura 3. Esquema de los mecanismos moleculares involucrados en el importe y/o exporte de proteínas entre núcleo-citoplasma.....	8
Figura 4. Putativas SLN del tipo monopartita y bipartita en NUA1 murino.....	9
Figura 5. Alineamiento de la putativa SLN-bipartita de NUA1 y la SLN-monopartita de NUA2.....	10
Figura 6. Funciones canónicas y no-canónicas de algunas enzimas glicolíticas dependientes de su localización sub-celular.....	12
Figura 7. Modelo de investigación propuesto.....	13
Figura 8. NUA1 es localizada en el núcleo y/o citosol dependiendo del tipo celular y el tejido analizado.....	30
Figura 9. La región N-terminal de NUA1 es requerida para su localización nuclear.....	33
Figura 10. NUA1 murino contiene una SLN-bipartita funcional en la región N-terminal.....	35
Figura 11. La putativa SLN-monopartita no afecta la localización nuclear de NUA1.....	36
Figura 12. La SLN-bipartita es conservada en NUA1 humano.....	39
Figura 13. Validación de la SLN-bipartita en MDA-MB-231.....	39
Figura 14. La Importina- β 1, IPO7 y IPO9 son nuevos interactores de NUA1.....	43
Figura 15. La Importina- β 1, IPO7 y IPO9 median el importe nuclear de NUA1.....	46
Figura 16. Modelo del mecanismo molecular que media el importe nuclear de la quinasas NUA1.....	47
Figura 17. El estrés oxidativo induce la acumulación citoplasmática de NUA1.....	49
Figura 18. La privación de glucosa promueve la acumulación citoplasmática de NUA1.....	51
Figura 19. Correlación entre la expresión de NUA1-IPO7 y NUA1-IPO9 en cáncer.....	54
Figura 20. NUA1 citoplasmático induce la migración celular.....	57
Figura 21. El contexto celular determina la localización sub-celular de NUA1.....	58
Figura 22. Diseño experimental y purificación de FLAG-mNUA1 WT y FLAG-mNUA1 KR44/71AA en condiciones normales y en estrés.....	62
Figura 23. Resumen de los resultados obtenidos en los análisis de MudPIT.....	63
Figura 24. Análisis ontológicos derivados de los análisis de espectrometría de masas.....	66

Figura 25. Resultados de los potenciales interactores involucrados en la unión del ARN y el metabolismo de la glucosa.....	67
Figura 26. Predicciones de sitios de fosforilación para NUA1 en los potenciales interactores nucleares y citoplasmáticos asociados a unir el ARN y al metabolismo de la glucosa.....	69
Figura 27. NUA1 interacciona con hnRNPK.....	72
Figura 28. NUA1 interacciona con PGK1, PFKP, PFKL y PFKM.....	75
Figura 29. NUA1 y PFKP se localizan principalmente en el citoplasma.....	77
Figura 30. PFKP endógena interacciona con NUA1 endógeno en células de cáncer de mama.....	78
Figura 31. Esquema de la regulación de la Fosfofructoquinasa-1 (PFK1).....	80
Figura 32. La interacción de NUA1 y PFKP depende del contexto celular.....	81
Figura 33. El estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno y la privación de glucosa induce la acumulación citoplasmática de NUA1 en MDA-MB-231.....	83
Figura 34 El tratamiento con insulina induce la acumulación nuclear de NUA1.....	85
Figura 35. Esquema resumen de los nuevos interactores de NUA1 determinados en el objetivo 2.....	87
Figura 36. PFK1 es un potencial blanco de la quinasa NUA1.....	90
Figura 37. NUA1 inhibe la actividad de la Fosfofructoquinasa (PFK).....	92
Figura 38. NUA1 afecta los niveles de NADPH.....	93
Figura 39. NUA1 regula los niveles de estrés oxidativo.....	94
Figura 40. Esquema resumen del efecto de NUA1 en el metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo a través de la PFK1.....	95
Figura 41. 6PGL (<i>Pgls</i>) y TKT son nuevos potenciales interactores y blancos de NUA1 asociados a la vía de las pentosas.....	106
Figura 42. Análisis de la expresión de NUA1 y CDK6 en diferentes líneas celulares de cáncer.....	109
Anexo figura 1. Predicción de la estructura secundaria de NUA1 murino	122
Anexo figura 2. Generación y validación de las deleciones de NUA1 murino.....	124
Anexo figura 3. Validación de la expresión de las mutantes de las putativas SLN de NUA1 murino.....	124
Anexo figura 4. Validación de la purificación de FLAG-mNUA1 WT frente a la ausencia de suero.....	125

Anexo figura 5. Análisis de los residuos que presentan modificaciones post-traduccionales identificadas en la PFKP.....	125
Anexo figura 6. Validación de los modelos inducibles estable en células MCF7.....	126
Anexo figura 7. Estandarización de la purificación de GST-PFKP y 6xHis-NUAK1.....	127
Anexo figura 8. NUAK1 y su potencial efecto en la vía de las pentosas.....	128
Anexo figura 9. Alineamiento de la región N-terminal de los miembros de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK.....	128



Abreviaturas

AMPK: AMPK activated kinases.

ARK5: AMPK related kinase member 5

HDAC1: Histone deacetylase

HIF1 α : Hipoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha

iMEFs: immortalized Mouse embryonic fibroblasts

IPO7: Importin-7

IPO9: Importin-9

LDHA: Lactato dehidrogenasa A

LKB1: Liver kinase B1

MYPT1: myosin phosphatase targeting-1

NRF2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PBS: Phosphate buffered saline

PFK1: Phosphofructokinase-1

PGK1: Phosphoglicerato kinase 1

PKM: Piruvate kinase muscle

SEN: Secuencia de exporte nuclear

SLN: Secuencia de localización nuclear

TEM: Transición epitelio mesenquimal

SIK1: Salt Inducible Kinase 1

UBA: ubiquitin-associated



1.- Introducción

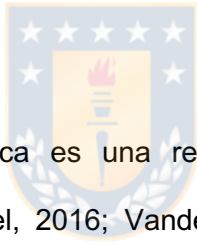
1.1.- Cáncer y el estrés celular

Cáncer es un término utilizado para aquellas enfermedades donde las células se dividen sin control formando una masa celular anormal que puede afectar la función de diversos órganos y además invadir otros tejidos (Raymond W., 2007). Con respecto a la formación y desarrollo de un tumor es importante destacar que no sólo depende de mutaciones que llevan a un crecimiento desregulado, sino que también requiere tolerar distintos **tipos de estrés** que son determinados por el **contexto genético y por el microambiente tumoral** (Cairns, Harris, & Mak, 2011). En condiciones de estrés, las células tumorales pueden adaptarse y sobrevivir **o bien activar la muerte celular programada** (Apoptosis) (Jones & Thompson, 2009). La capacidad de las células para tolerar estas condiciones ha cobrado gran importancia en la comunidad científica ya que favorecerá la supervivencia de las células tumorales y por ende la progresión tumoral (Jones & Thompson, 2009). Enfocándose en el **estrés metabólico** que se genera por la disminución de los nutrientes disponibles para el tumor, es importante destacar que identificar el/los mecanismos moleculares involucrados permitirá determinar nuevos marcadores y/o blancos terapéuticos contra el cáncer.

1.2.- Cáncer y metabolismo: LKB1/AMPK y las quinasas relacionadas con AMPK.

Actualmente, existe evidencia que gran parte de los mecanismos moleculares que promueven la homeostasis celular en condiciones de estrés metabólico afectan el **metabolismo celular** debido a cambios en la activación de **las rutas anabólicas/catabólicas, la bioenergética y el balance redox en la célula** (Hanahan y col., 2011). El estudio del metabolismo celular y su relación con el cáncer fue descrito por *Otto Warburg* alrededor de los años 1920 (DeBerardinis & Chandel, 2016). Posterior a ello, diversos estudios caracterizaron la función y regulación de varias enzimas metabólicas, sin

embargo, la investigación en torno a la relación del metabolismo y el cáncer, así como su potencial aplicación terapéutica no fueron mayormente exploradas. Actualmente, debido al avance y desarrollo de nuevas tecnologías, la regulación del metabolismo y su relación con el cáncer ha cobrado gran importancia en el estudio de la progresión tumoral llegando a ser reconocido como un marcador o *hallmark* del cáncer (Hanahan y col., 2011, DeBerardinis & Chandel, 2016; Pavlova & Thompson, 2016). Esto se debe a que diferentes tipos de cánceres presentan un **metabolismo alterado con respecto al tejido normal** (DeBerardinis & Chandel, 2016; Vander Heiden & DeBerardinis, 2017). Esta alteración es conocida como **reprogramación metabólica**, que dependiendo del contexto celular promueve o soporta el crecimiento, y bajo condiciones de estrés permite regular o adaptar el metabolismo para mantener los niveles de energía y el balance redox (DeBerardinis & Chandel, 2016).



La reprogramación metabólica es una respuesta celular a la activación de oncogenes (DeBerardinis & Chandel, 2016; Vander Heiden & DeBerardinis, 2017), la pérdida de supresores tumorales u otros tipos de estrés específicos (anoikis, hipoxia y estrés oxidativo) (DeBerardinis & Chandel, 2016; Vander Heiden & DeBerardinis, 2017). Por estos motivos determinar y/o caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la reprogramación metabólica permitirá predecir el comportamiento tumoral y prevenir su progresión mediante el bloqueo de estas vías, lo que generará nuevas aproximaciones terapéuticas contra el cáncer (Hay, 2016; Luengo, Gui, & Vander Heiden, 2017; Martinez-Outschoorn y col., 2017).

Para promover estos procesos es necesario cambios en la actividad y/o expresión de diversas proteínas. Con respecto a lo anterior, AMPK (*AMP-activated protein kinase*) es una quinasa que cuando se encuentra **activa** actúa como un **sensor metabólico**,

inhibiendo los procesos anabólicos y favoreciendo los catabólicos (Hardie, Ross, & Hawley, 2012). Esta evidencia sugirió que AMPK podría actuar como un supresor tumoral, sin embargo, evidencia actual sugiere que la **activación de AMPK** favorece la supervivencia de las células tumorales frente a condiciones de estrés metabólico, ya que controla el metabolismo celular restableciendo el **balance energético y redox** (Jeon, Chandel, & Hay, 2012).

Para la activación de AMPK es requerida **LKB1** (*Liver kinase B1*), una quinasa que fosforila a AMPK en la treonina 172 (humano) y la activa frente al aumento de los niveles de AMP (*Adenosine monophosphate*) (Hawley y col., 2003), sin embargo, LKB1 además de fosforilar a AMPK puede fosforilar y activar a otras 12 quinasas que componen la familia de quinasas relacionadas con AMPK (*AMPK-related kinases*) (Fig. 1) (Lizcano y col., 2004). Esta familia se agrupa principalmente por un dominio quinasa altamente conservado (fosforilado por LKB1) y además por presentar funciones similares. Dentro de estas funciones destacan su efecto sobre la polaridad celular y la **regulación del metabolismo** (Bright y col., 2009).

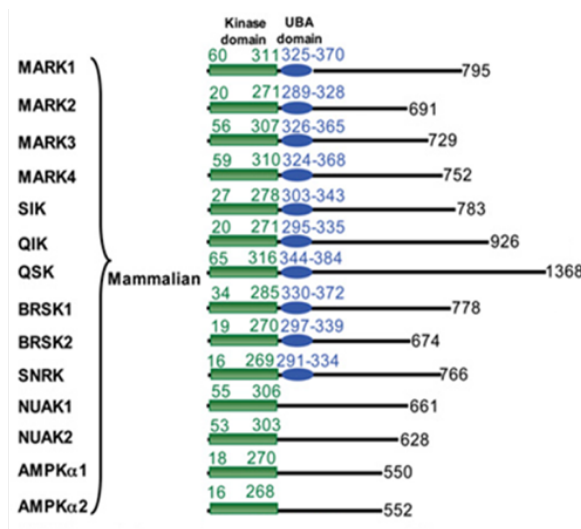


Figura 1. Esquema de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK. En el esquema se agrupan las 14 quinasas que componen la familia de las quinasas relacionadas con AMPK. En verde se representa el dominio quinasa altamente conservado que es fosforilado por LKB1. En azul, un dominio asociado a ubiquitinación conservado en algunos miembros de la familia. Fuente: Elaboración propia

Familia de las quinasas relacionadas con AMPK

Con respecto a lo anterior, existe evidencia de un miembro de la familia que se ha relacionado con la respuesta celular frente a esta condición. Esta quinasa corresponde a **NUAK1** y similar a AMPK es activada y fosforilada bajo condiciones de estrés metabólico (Bright y col., 2009). No obstante, la actividad quinasa de NUAK1 no responde a la relación AMP:ATP, sugiriendo que la regulación de la actividad de NUAK1 no estaría asociada a subunidades regulatorias sino a la existencia de otros mecanismos moleculares que hasta la fecha no han sido estudiados (Bright y col., 2009).

1.3.- NUAK1

La proteína NUAK1 también conocida como ARK5 (*AMPK related kinase member 5*) es una serina/treonina quinasa de **75 kDa** miembro de la familia de AMPK quinasa. Con respecto a su rol en cáncer, NUAK1 ha sido asociada como un potencial nuevo blanco terapéutico, ya que se ha encontrado sobre-expresada en varios tipos de cánceres lo que se correlacionó directamente con un mal pronóstico y una baja supervivencia de los pacientes (Chang y col., 2012; Chen y col., 2013; Li y col., 2013; Cui y col., 2013; Lu y col., 2013a; Phippen y col., 2016). Consistente con lo anterior a nivel funcional NUAK1 promueve la supervivencia de las células cancerosas (Suzuki y col., 2003a), la transformación celular (Liu y col., 2012), la migración (Chen y col., 2013; Phippen y col., 2016), la transición-epitelio-mesenquimal (TEM) (Obayashi y col., 2016), la invasión y metástasis (Bell y col., 2014; Chen y coll., 2013; Lu y col., 2013a; Obayashi y col., 2016). Dentro de su rol en la supervivencia celular, evidencia actual ha asociado a NUAK1 con el control del balance redox en cáncer de colón. Las especies reactivas de oxígeno activan a NUAK1, protegiendo a las células de cáncer de colón del estrés oxidativo a través del importe del factor de transcripción NRF2 (Port y col., 2018). **No obstante, la regulación y los mecanismos moleculares cómo NUAK1 promueve la tumorigénesis no han sido ampliamente estudiados ni caracterizados.**

La regulación de NUA1 ha sido asociada principalmente **a la regulación de su expresión por microARNs** (Bell y col., 2014, Shi y col., 2014; Yu y col., 2015, Obayashi y col., 2016) **y a su fosforilación**. Adicional a la fosforilación por LKB1 (Treonina-211) (Lizcano y col., 2004), NUA1 es fosforilada y activada por AKT (Serina-601) (Suzuki y col., 2003a). La fosforilación mediada por AKT promueve la supervivencia celular bajo privación de glucosa y la invasión (Suzuki y col., 2003a). Sin embargo, esta no es conservada en otros miembros de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK (datos no se muestran). Esta evidencia sugiere la existencia de mecanismos moleculares involucrados en la regulación de NUA1 y además funciones únicas para NUA1 comparado a los otros miembros de la familia. En base a lo anterior, otro aspecto importante de la regulación de NUA1 podría estar asociado a su localización sub-celular. En esta área estudios realizados en estadios tempranos de glioblastoma (grado II) determinaron que la quinasa NUA1 se encuentra localizada mayoritariamente en el núcleo con bajos niveles de expresión a diferencia de glioblastoma de grado III y IV donde NUA1 se encuentra expresada en altos niveles en el núcleo y citosol (Lu y col., 2013).

Consistente con su localización nuclear, existe evidencia que NUA1 interacciona con el factor de transcripción p53 en el núcleo induciendo la expresión de p21 promoviendo el arresto del ciclo celular (Hou y col., 2011). Por otro lado, una de las principales funciones que se puede asociar a la localización citoplasmática de NUA1 es la fosforilación de la fosfatasa de la miosina (MYPT1) que promueve el desprendimiento celular (Zagórska y col., 2010). En resumen, estos estudios indicaron que NUA1 reside en el **núcleo y en el citosol**, sugiriendo la existencia de un **mecanismo molecular** involucrado en la regulación de la localización sub-celular de NUA1 y funciones específicas asociadas a su localización sub-celular. En esta área, basado en análisis bioinformáticos determinamos que NUA1 se

localiza **principalmente en núcleo** (Fig. 2) (Palma y col., 2019). Cabe destacar que la **localización nuclear de NUAK1 y su regulación no ha sido previamente estudiada.**

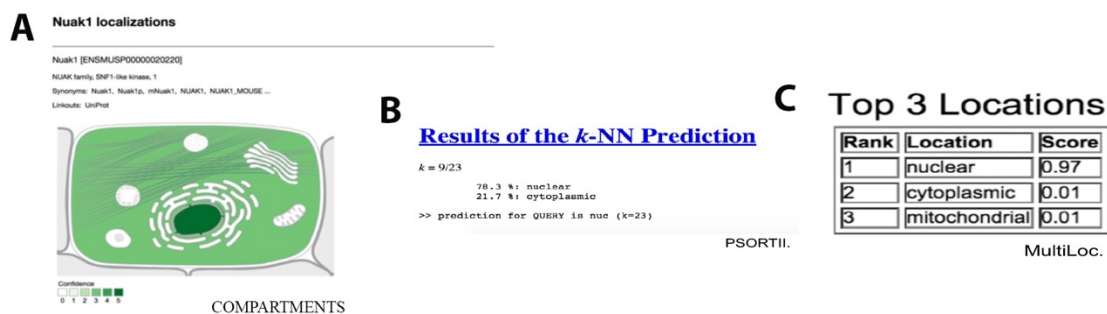


Figura 2. Predicciones bioinformáticas de la localización sub-celular de NUAK1. A.- COMPARTMENTS Subcellular Localization Database (<https://compartments.jensenlab.org>), **B.-** Multiloc2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) **C.-** PSORTII (<https://psort.hgc.jp/form2.html>). Fuente: Elaboración propia.

Estas evidencias nos llevaron a proponer la existencia de un **mecanismo molecular** que media el importe o exporte al núcleo de NUAK1. **Proponiendo la existencia de una nueva área de investigación asociada a la regulación de la localización sub-celular de NUAK1.** El importe y exporte de proteínas es crucial para mantener diversos procesos celulares y por ende la homeostasis celular (Stewart, 2007). **Por lo tanto, el estudio de la compartimentalización y el transporte de NUAK1 ayudará a determinar nuevos mecanismos involucrados en su regulación que podrían estar directamente relacionado con su función.**

1.4.- Transporte de proteínas entre el núcleo – citosol

Proteínas menores a **40 kDa** en tamaño pueden difundir pasivamente a través de el poro nuclear. Sin embargo, proteínas de mayor tamaño requieren de un **transporte activo** (Stewart, 2007) (Fig. 3). Varias vías son responsables del importe-exporte activo de proteínas. Estas vías utilizan varias proteínas, pero a pesar de ello comparten varias características. Dentro de ellas destacan una serie de interacciones proteína-proteína

donde el cargo es reconocido en el citoplasma para luego mediar su translocación al núcleo a través del poro nuclear (Stewart, 2007) (Fig. 3). Las proteínas que transportan los cargos hacia dentro o fuera del núcleo pertenecen a la familia de las karioferinas, también conocidas como: **Importinas, exportinas y transportinas** (Marfori y col., 2011, Stewart, 2007). Con respecto a las importinas existen las importinas- α y las importinas- β que pueden unir y transportar al cargo que contienen una **secuencia de localización nuclear (SLN)** (Marfori y col., 2011). Existen diferentes clases de SLN, sin embargo, sólo dos han sido clasificadas estructural y bioquímicamente: Las secuencias de localización clásicas (SLN-clásicas) y las SLN prolina-tirosina. Las **SLN del tipo clásicas (SLN-clásicas)** contienen una o dos regiones de aminoácidos básicos tales como: Lisina (K) y arginina (R). Las secuencias del tipo monopartitas son secuencias que contienen sólo un grupo de aminoácidos básicos (K-K/R-X-K/R). Las secuencias del tipo bipartitas contienen dos grupos de aminoácidos básicos separados por una región entre 10-12 residuos ((K/R)(K/R) X_{10-12} (K/R) $_{3/5}$) (Stewart, 2007).

Las SLN-clásicas son principalmente reconocidas por el heterodímero $\alpha/\beta 1$, no obstante, existe evidencia que sugiere que también pueden ser reconocidas por otros miembros de la familia de las importinas- β tales como la importina-7 (IPO7) (Freedman & Yamamoto, 2004). Con respecto a las SLN-prolina tirosina (SLN-PY) se caracterizan por presentar una estructura diversa con un N-terminal y C-terminal hidrofóbico (RX $_{2-5}$ PY) (Lee y col., 2006). Adicionalmente, dos nuevos tipos de SLN han sido descritas: Las secuencias Kap121 ricas en lisina (Kobayashi & Matsuura, 2013) y las SLN con repeticiones de RS (Arginina y serina) (Lai, Lin, & Tarn, 2001). Para el transporte nuclear son requeridas las exportinas y las **secuencias de exporte nuclear (SEN)** que al igual que las SLN se encuentran presentes en el cargo (Fig. 3). En resumen, existe un amplio número de proteínas transportadoras, todas ellas requieren de un gradiente de RanGTP/RanGDP,

sin embargo, la regulación de estas proteínas (Importinas-exportinas) y las secuencias/cargos que ellas reconocen han sido muy poco caracterizadas.

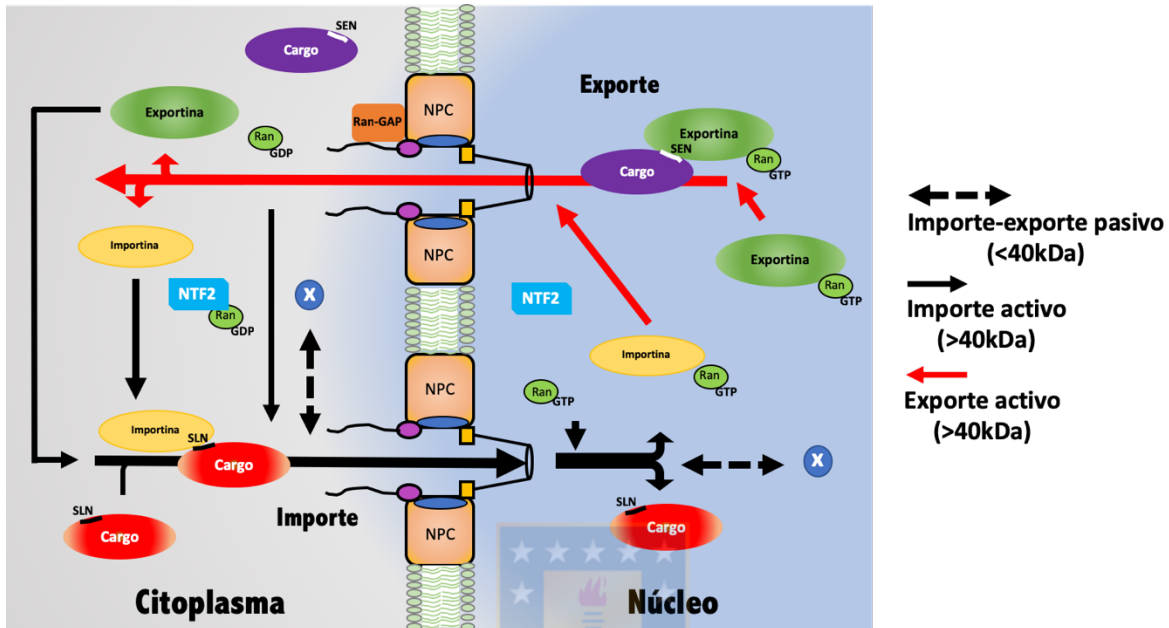


Figura 3. Esquema de los mecanismos moleculares involucrados en el importe y/o exporte de proteínas entre núcleo-citoplasma. Proteínas de menor tamaño que 40 kDa pueden difundir pasivamente el poro nuclear (X). Por otro lado, proteínas de mayor tamaño que 40 kDa requieren de un transporte activo. Para el importe nuclear se requiere de una SLN y el reconocimiento de esta por las Importinas. Para el exporte nuclear es requerida una SEN y el reconocimiento por la exportinas. Ambos procesos (importe/exporte) son regulados por el gradiente de Ran-GDP y Ran-GTP. Fuente: Elaboración propia.

Por lo tanto, basado en la evidencia anterior y considerando que NUA1 es una quinasa de 75 kDa es que se realizaron predicciones bioinformáticas para determinar si NUA1 tiene putativas SLN o SEN que sustenten la existencia de un mecanismo de transporte activo. Derivado de estos análisis se **identificaron dos potenciales SLN del tipo clásicas en NUA1**. La primera SLN fue una putativa **SLN-bipartita** ubicada hacia la región N-terminal (Fig. 4) y la segunda una **SLN-monopartita** ubicada en la mitad de NUA1 (Fig. 4) (Palma y col., 2019). Cabe destacar que otros tipos de SLN y SEN no fueron identificadas en nuestros análisis (datos no se muestran). Con respecto a la funcionalidad de una SLN existen varios estudios que sugieren que para que una SLN sea funcional requiere de una estructura secundaria estable. Por lo tanto, se realizaron predicciones bioinformáticas de la estructura secundaria de NUA1. Derivado de estos análisis se determinó que solo la putativa SLN-bipartita presentan una estructura secundaria estable (Anexo fig. 1)

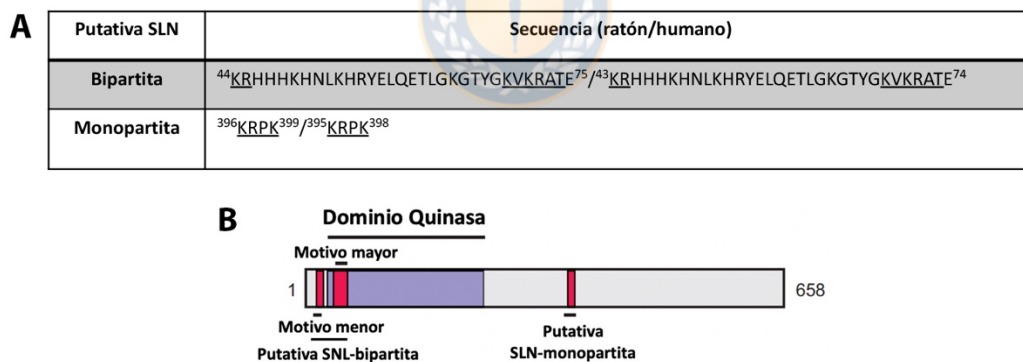


Figura 4. Putativas SLN del tipo monopartita y bipartita identificadas en NUA1 murino y humano. A.- Tabla de las putativas-SLN monopartita y bipartita identificadas en NUA1 murino y humano. **B.-** Representación esquemática de las putativas-SLN. En rojo, la representación de las putativas SLN-bipartita y SLN-monopartita. En púrpura el dominio quinasa de NUA1. Fuente: Elaboración propia.

Estas evidencias nos llevaron a sugerir que un **mecanismo de importe activo** es responsable de regular la localización sub-celular de NUA1. Con respecto a lo anterior, NUA2 el miembro más cercano a NUA1 en la familia de las quinasas relacionadas con AMPK tiene una **SLN-monopartita funcional** hacia el N-terminal (Kuga y col., 2008). Cabe destacar que la secuencia monopartita para NUA2 no es completamente conservada en NUA1 (Fig. 5). A pesar de ello, la región conservada de la secuencia monopartita de NUA2 es parte de la putativa SLN-bipartita de NUA1 (Fig. 5).

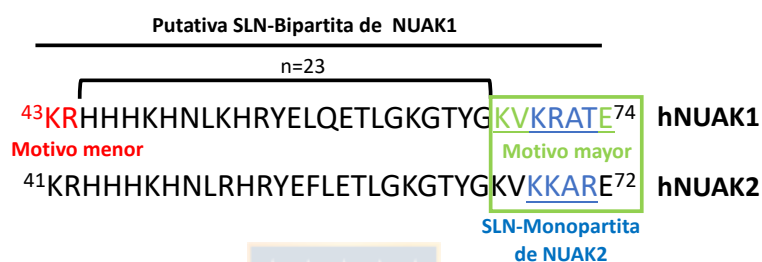


Figura 5. Alineamiento de la putativa SLN-bipartita de NUA1 y la SLN-monopartita de NUA2. La putativa SLN-bipartita es conservada en NUA1, no obstante, la SLN-monopartita no es completamente conservada en NUA1. Fuente: Elaboración propia.

En resumen, los antecedentes entregados permiten destacar las siguientes ideas: **i)** NUA1 es una proteína de 75 KDa. **ii)** Predicciones bioinformáticas sugieren que NUA1 se localiza principalmente en el núcleo. **iii)** NUA1 tiene dos putativas SLN-clásicas (monopartita y bipartita). **iv)** Existe evidencia de una SLN-monopartita en NUA2 que no es conservada en NUA1. **Por lo tanto, proponemos que la distribución sub-celular de NUA1 es regulada por un mecanismo de importe activo mediado por una SLN-clásica.**

Esta hipótesis no había sido estudiada hasta la fecha, ni tampoco se ha evaluado en profundidad si la localización y/o la regulación de la distribución sub-celular de NUA1 está involucrada en funciones específicas y/o nuevas funciones de esta quinasa. Actualmente, existe evidencia que cambios en la distribución sub-celular de diversas proteínas afecta directamente su función, favoreciendo incluso nuevas características o funciones que promoverían la **progresión tumoral o participarían en diversas enfermedades.** Esta idea ha cobrado gran importancia en la comunidad científica, algunos ejemplos son las enzimas de la vía glicolítica donde su **principal función (canónica)** involucra la oxidación de la glucosa a piruvato, no obstante, nuevas evidencias que determinaron que gran parte de ellas se encuentran **principalmente localizadas en el núcleo e incluso en otros compartimentos sub-celulares** (Huangyang & Simon, 2018). Estas evidencias permitieron especular que estas enzimas tienen funciones nucleares no-canónicas y que la regulación en su localización sub-celular es crucial para su función (Huangyang & Simon, 2018).

Con respecto a lo anterior, la Hexoquinasa (HK2), Fosfofructoquinasa-1 (PFK1) y la piruvato quinasa (PKM2) son enzimas que catalizan **reacciones irreversibles y limitantes en la glicólisis** (Fig. 6A). No obstante, pueden ser **translocadas al núcleo** actuando como co-activador o bien co-represor transcripcional y también cómo quinasas que fosforilan a factores de transcripción para regular la expresión génica, **promover la glicólisis y el fenotipo tumoral** (Fig. 6B). Otras enzimas como la Fosfogliceratoquinasa-1 (PGK1) y lactato deshidrogenasa (LDHA) también presentan cambios en su localización sub-celular y con ello nuevas funciones (Fig. 6B). Por lo tanto, estudiar los mecanismos moleculares involucrados en su transporte permitirá determinar nuevos mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estas proteínas, lo que podría estar asociado a promover nuevas funciones dependientes de su localización sub-celular.

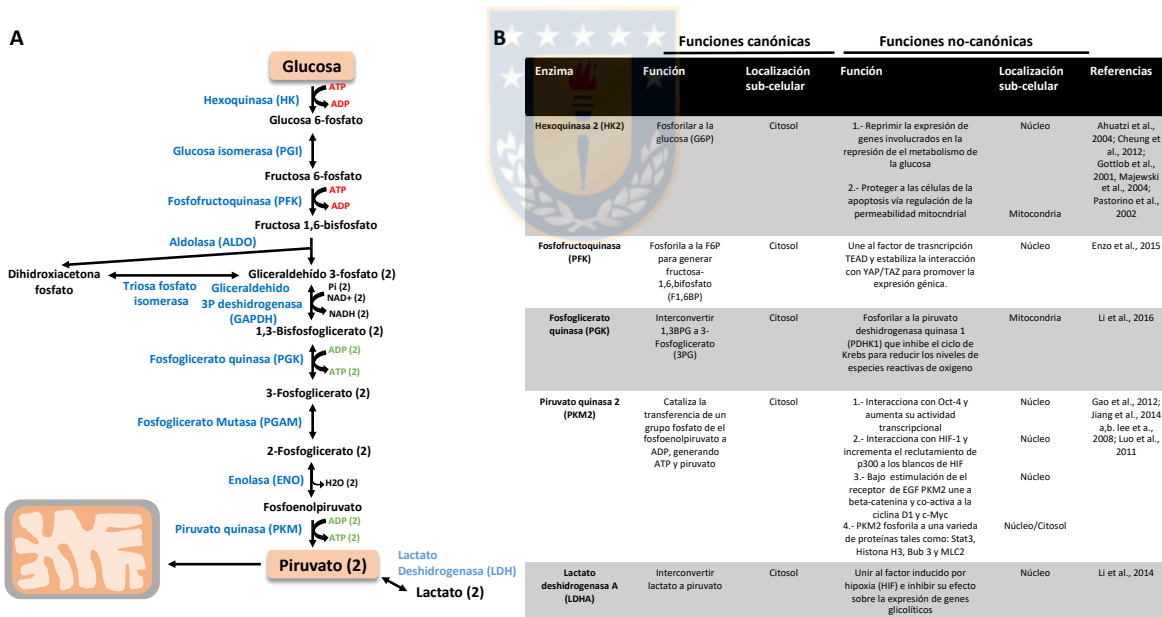


Figura 6. Funciones canónicas y no-canónicas de algunas enzimas glicolíticas dependientes de su localización sub-celular. A.- Esquema de las funciones canónicas de las enzimas de la vía glicolítica. **B.-** Tabla resumen de las funciones canónicas y no-canónicas de algunas enzimas de glicolíticas dependientes de su localización sub-celular (HK2, PFK1, PGK, PKM2 y LDHA). Fuente: Elaboración propia.

En resumen, el modelo propuesto para este proyecto planteó la existencia de un **mecanismo de transporte activo de NUAK1 que favorece su importe al núcleo, el cual consiste en una SLN-clásica e importinas involucradas en su reconocimiento** (Fig. 7). Este mecanismo estaría regulando la distribución sub-celular de NUAK1 y por ende la función de esta quinasa, lo que podría estar directamente relacionado con promover la progresión tumoral a través de los interactores de NUAK1 (Fig. 7).

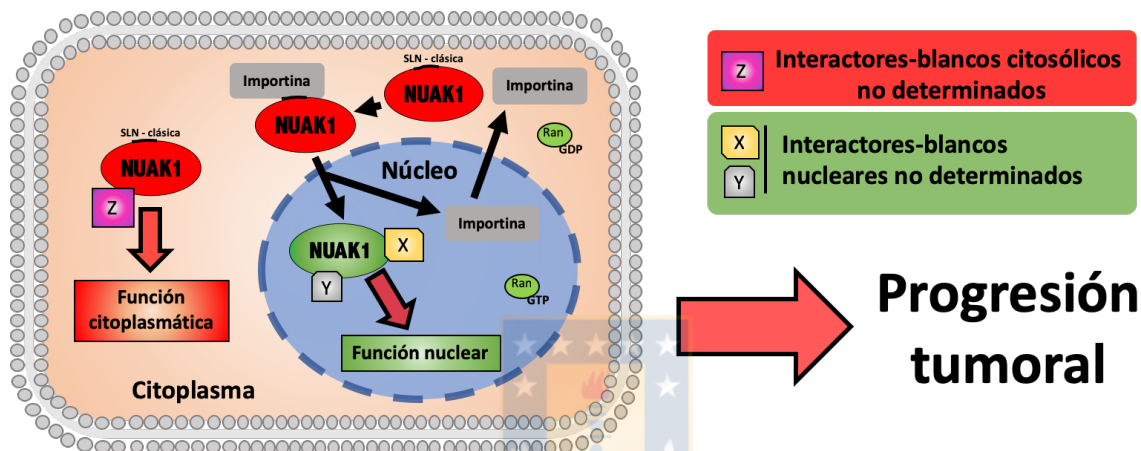


Figura 7. Modelo de investigación propuesto. i) La quinasa NUAK1 puede ser localizada en el citoplasma (rojo) y/o en el núcleo (verde). ii) El importe de NUAK1 al núcleo es regulado por un **mecanismo de transporte activo** (SLN-clásicas y importinas). iii) Dependiendo de la localización sub-celular de NUAK1 ya sea en el citoplasma y/o núcleo, la quinasa NUAK1 al igual que otras enzimas (quinasas) podría tener funciones específicas mediada por sus interactores-blancos no determinados (X, Y y Z) promoviendo la progresión tumoral. Fuente: Elaboración propia

2.- Hipótesis y objetivos:

2.1.- Hipótesis:

NUAK1 es transportada al núcleo a través de un mecanismo de transporte activo y dependiendo de su localización sub-celular regula a proteínas con funciones asociadas a promover la progresión tumoral.

2.2.- Objetivo general:

Identificar nuevos mecanismos moleculares involucrados en la regulación y/o función de la quinasa NUAK1.

2.3.- Objetivos específicos:

1.- Determinar el mecanismo molecular que media el importe al núcleo de NUAK1.

- 1.1.- Determinar la(s) secuencia(s) de localización nuclear funcionales para NUAK1.
- 1.2.- Determinar la(s) proteína(s) responsable(s) de mediar el importe al núcleo de NUAK1.

2.- Determinar nuevos interactores nucleares y citoplasmáticos de NUAK1 que estén asociados a la progresión tumoral.

- 2.1.- Determinar nuevos interactores de NUAK1 a través de la técnica de *MudPIT*.
- 2.2.- Identificar y clasificar los potenciales interactores y/o blancos de NUAK1 asociados a la progresión tumoral.
- 2.3.- Validar los nuevos interactores de NUAK1.

3.- Evaluar el efecto de NUAK1 en la actividad y/o función de los interactores asociados a promover la progresión tumoral.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Materiales:

3.1.1.- Reactivos: Los inhibidores de proteasa y fosfatasa fueron adquiridos en Sigma (*St. Louis, MO, USA*). Para la transfección fue usada Lipofectamina 2000 de *Invitrogen (Carlsbad, CA)*. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fueron: ARK5 (CS4458S), PKM2 (D78A4) de *Cell Signalling (Danvers, MA)*. GAPDH (6C5), HDAC1 (C-19), MEK1/2 (9G3), PFKM (E-4), PFKL (A-6), Transketolase (H-7), PFK2 (D-1), p-PFK2 S483(B-3), PGMA1 (6) hnRNPK (D-6), MYPT1 (C-6) de *Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)*. Anti-Importin 7 (ab15840), PGK1 (ab38007) y PFKP (ab204131) de *Abcam (Cambridge, UK)*. Importin-9 (NBP1-39726) de *Novus Biologicals (Littleton, CO)*. FLAG (M2) y HA (clone 7) de Sigma (*St. Louis, MO, USA*). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*anti-mouse, anti-rabbit y anti-goat*) fueron adquiridos de *BioRad (Hercules, CA)*. Los anticuerpos secundarios usados en las inmunofluorescencias fueron: Anti-rabbit Alexa fluor 488, anti-mouse Alexa 555, Faloidina-Alexa fluor 488 de *Invitrogen (Carlsbad, CA)* y *Hoechst 33342* de *BioRad (Hercules, CA)*. Importazole, Trolox y HTH-01-015 fueron adquiridos en *Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)*. Puromicina de *Santa Cruz Biotechnology*, Higromicina B1 de Sigma, Polibreno de *Merk Millipore*.

3.1.2.- Cultivo Celular: Células Hela, HCT116 p53-null, Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), HEK293, HEK293T y MDA-MB-231 fueron mantenidas en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (*Hyclone, Logan, UT, USA*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (*FBS; Hyclone*), 1% de glutamina (*Invitrogen*) y 1% de penicilina/estreptomicina (*Invitrogen*). Células MCF7 fueron mantenidas en *Minimum Essential Medium* (MEM) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (*FBS*) y 1% de penicilina/estreptomicina (*Invitrogen*). Células DLD-1 fueron mantenidas en *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) (*Hyclone*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (*FBS; Hyclone*), 1%

de glutamina (Invitrogen) y 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Para los experimentos de privación de glucosa se utilizó *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) sin D (+)-glucosa, L-Glutamina y piruvato de Sodio (*Biological Industries*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (*FBS; Hyclone*), 1% de piruvato de Sodio, 1% de glutamina (*Invitrogen*) y 1% de penicilina/estreptomicina (*Invitrogen*). Todas las células utilizadas en este estudio fueron regularmente testeadas (4 meses) de potencial contaminación de micoplasma usando el Kit: *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries)*.

3.1.3.- Plásmidos: El plásmido pBP NUAK1 WT murino (pBP mNUAK1 WT) fue proporcionado por el Dr. Daniel Murphy (Universidad de Glasgow, *Glasgow, UK*). Este plásmido fue utilizado para la generación de todos los plásmidos derivados de **NUAK1 murino**. mNUAK1 WT derivado de pBP mNUAK1 WT fue subclonado dentro del plásmido pCMV2 (NH) FLAG usando los sitios de restricción EcoRI para generar el plásmido; **pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 WT**. Las deleciones mNUAK1 WT (1-366) y mNUAK1 CT (329-658) fueron amplificadas por PCR desde el plásmido pBP mNUAK1 WT y luego sub-clonadas en el plásmido pCR blunt (*Invitrogen*). Luego, los fragmentos mNUAK1 (1-366) y mNUAK1 CT (329-658) fueron sub-clonados en el plásmido pCMV2 NH FLAG usando los sitios de restricción EcoRI generando los plásmidos; **pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 NT y pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 CT**. Las deleciones mNUAK1 dNT1 y mNUAK1 dNT2 fueron generadas por la digestión de los plásmidos pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 NT (1-366) y pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 WT utilizando los sitios de restricción KpnI y BamHI en cada caso. Luego los fragmentos fueron sub-clonados en el plásmido pCMV2 (NH) generando los plásmidos; **pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 dNT1 y pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 dNT2**. La deleción mNUAK1 dNT3 fue amplificada por PCR y luego sub-clonada en el plásmido pCMV2 (NH) utilizando los sitios de restricción EcoRI y BamHI para generar el plásmido

pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 dNT3. La lista de partidores utilizados para generar las delecciones se resume en la Tabla 1 (Tabla 1). Las mutantes de las putativas secuencias monopartitas y bipartitas de NUAK1 murino fueron generadas a partir de mutagénesis sitio dirigida (**pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 KR44AA**, **pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 KR71AA** y **pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 KR44/71AA**). Los partidores utilizados se resumen en la Tabla 2 (Tabla 2). Los plásmidos pCMV FLAG-hNUAK1 WT y pCMV5 HA-importin-β1 (HA-KPNB1) fueron adquiridos en *Medical Research Council protein phosphorylation and ubiquitination Unit (MRC-PPU)*, Reino Unido. Las mutantes de las putativas secuencias monopartitas y bipartitas de NUAK1 humano fueron generadas a partir de mutagénesis sitio dirigida (**pCMV FLAG-hNUAK1 KR43AA**, **pCMV FLAG-hNUAK1 KR70AA** y **pCMV FLAG-hNUAK1 KR43/70AA**). Los partidores utilizados se resumen en la Tabla 3 (Tabla 3). Para la generación de los plásmidos para sobre-expresar FLAG-mNUAK1 y sus respectivas mutantes de **manera estable y constitutiva** se generó el plásmido **pBP FLAG** a partir de la eliminación del gen *STK11 (LKB1)* del plásmido pBP FLAG-LKB1 WT utilizando el sitio de restricción BamHI. Luego mNUAK1 WT y las respectivas mutantes fueron digeridas a partir de los plásmidos pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 WT, pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 KR44AA, pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 KR71AA y pCMV2 (NH) FLAG-mNUAK1 KR44/71AA con el sitio de restricción EcoRI y luego sub-clonadas en el plásmidos pBP FLAG utilizando el sitio de restricción EcoRI, generando los vectores; **pBP FLAG-mNUAK1 WT**, **pBP FLAG-mNUAK1 KR44AA**, **pBP FLAG-mNUAK1 KR71AA** y **pBP FLAG-mNUAK1 KR44/71AA**. Los shRNAs para NUAK1; NUAK1-sh319: 5'-TGGCCGAGTGGTTGCTATAAA-3', NUAK1-sh951: 5'-TTCACATCAGACGAGAGATTG-3', IPO7: 5'-GCACTGACTCACGGTCTTAAT-3' y IPO9: 5'-GAGGATTACTACGAGGATGAT-3' fueron adquiridos en *Sigma* (St. Louis, MO, USA). Los plásmidos para la sobreexpresión de las isoformas de la Fosfofructoquinasa (PFK1), pCMV3 HA-PFKL (HG14223-NY), pCMV3 HA-PFKM (HG14133-NY) y pCMV3 HA-PFKP

(HG15003-NY) fueron adquiridos en *SinoBiological, China*. Los plásmidos para la expresión recombinante de NUA1 humano y la PFKP fueron generados a partir de los plásmidos; pCMV FLAG-hNUAK1 WT y pCMV3 HA-PFKP, respectivamente. hNUAK1 WT fue amplificado por PCR adicionando los sitios SacI y HindIII para luego ser sub-clonado en el plásmido pQE80L utilizando los sitios de restricción SacI y HindIII para generar el plásmido; **pQE80L NUA1**. En el caso de PFKP fue amplificado por PCR adicionando el sitio BamHI y luego sub-clonado en el plásmido pGEX4T1 utilizando el sitio de restricción BamHI para generar el plásmido; **pGEX4T1 PFKP**. Los plásmidos para la sobreexpresión de PGK1; pFTR/TO/HIS/FLAG/HA-PGK1 (# 38071) y los vectores inducibles por doxiciclina; pCW57-MCS1-2A-MCS2 (puro) (# 71782) y pCW57-MCS1-2A-MCS2 (hygro) (# 80922) fueron adquiridos en *Addgene*. Finalmente, los vectores lentivirales inducibles fueron generados a partir de los plásmidos inducibles. Para ello, FLAG-hNUAK1 WT y FLAG-hNUAK1 K84A fueron amplificados a partir de los plásmidos pCMV FLAG-hNUAK1 WT y pCMV FLAG-hNUAK1 K84A por PCR adicionando los sitios de restricción NheI y AgeI en cada caso. Luego fueron sub-clonados en los plásmidos pCW57 MCS1-2A-MCS2 (puro) y pCW57-MCS1-2A-MCS2 (hygro) utilizando los sitios de restricción NheI y AgeI para generar los plásmidos; **pCW57 FLAG-hNUAK1 WT-2A-MCS2 (puro)**, **pCW57 FLAG-hNUAK1 K84A-2A-MCS2 (puro)**, **pCW57 FLAG-hNUAK1 WT-2A-MCS2 (hygro)** y **FLAG-hNUAK1 K84A-2A-MCS2 (hygro)**. En el caso de la HA-PFKP fue amplificado por PCR del plásmido pCMV3 HA-PFKP adicionado los sitios AvrII y BamHI y luego sub-clonado en el plásmido pCW57-MCS1-2A-MCS2 (hygro) utilizando los sitios de restricción AvrII y BamHI para generar el plásmido **pCW57-MCS1-2A- HA PFKP (hygro)**.

3.2.- Métodos:

3.2.1.- Fraccionamiento sub-celular: El fraccionamiento núcleo/citoplasma fue realizado utilizando el buffer de extracción de núcleo (10mM HEPES (pH 7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl) y el buffer de extracción de citoplasma (20mM HEPES (pH 7.9), 25% (v/v) glicerol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA). Para ello, las células o tejidos fueron colectadas con PBS (1X) frío. Luego dependiendo del volumen de pellet celular se agregaron 5 volúmenes de buffer de extracción del citoplasma conteniendo inhibidores de fosfatasa (1X) y proteasa (1X). Las células fueron resuspendidas suavemente e incubadas por 10 minutos en hielo. Luego, se agregó NP-40 al 1% (v/v). Las células fueron agitadas (*vortex*) por 15-20 segundos e incubadas en hielo por 5 minutos. Durante los 5 minutos de incubación es recomendable dar cortos tiempos de agitación (*vortex*). Luego, se centrifugó las células a 5000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante correspondió a la fracción citoplasmática y el pellet a los núcleos. Para mejorar la pureza del extracto nuclear se realizaron 3 lavados con 1ml de buffer de extracción del citosol (sin inhibidores). Para la lisis de los núcleos se agregaron 3 volúmenes del buffer de extracción del núcleo que son relativos al volumen inicial del pellet. La mezcla se resuspendió con pipeta por 20 segundos. Luego fueron mantenidos por 1 hora en hielo con agitación (*vortex*) cada 10 minutos. Finalmente, el extracto nuclear se obtuvo por la centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos. En el caso del fraccionamiento de tejidos los cerebros fueron obtenidos de ratones de la cepa *C57BL6J* de 5 semanas de edad. Todos los estudios con ratones fueron aprobados por el comité de ética animal de CONICYT, proyecto # 1160731 y cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

3.2.2.- Western Blots: Las proteínas derivadas de los lisados celulares (30-50 µg) fueron separados por *SDS-PAGE* y luego transferidas por 90 minutos a 100 Volt a una membrana de PVDF (*Immobilon, Millipore*). Las membranas de PVDF fueron bloqueadas por 1 hora

a temperatura ambiente en 5% de leche disuelta en TBS-T (TBS con 0.1% de Tween) e incubadas con la dilución de anticuerpo primario adecuada a 4°C por toda la noche. Después de una serie de lavados (3 en TBS-T) de 5 minutos las membranas fueron incubadas por 1 hora con el anticuerpo secundario. Las proteínas fueron visualizadas al usar ECL (*General Electric Healthcare, Amersham, UK*) y un fotodocumentador.

3.2.3.- Inmunoprecipitación: Las proteínas a inmunoprecipitar fueron obtenidas utilizando el buffer de lisis (25mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA, 1% NP40, 5% Glicerol and 2mM MgCl₂) suplementado con inhibidores de proteasa (1X) y fosfatasa (1X). Los lisados fueron cuantificados y preparados en igual concentración. Luego, fueron preclarados por 1 hora a 4°C utilizando la resina *A/G plus* de *Santa Cruz Biotechnology* (Dallas, TX). La inmunoprecipitación se realizó incubando con los anticuerpos correspondientes por 6 horas a 4°C en agitación. Para la inmunoprecipitación de FLAG, se utilizó *anti-FLAG M2 affinity gel* de *Sigma*. Para la inmunoprecipitación de HA fue usado el anticuerpo anti-HA (*clone 7*) de *Sigma*. Para la inmunoprecipitación de PFKP y hnRNPK se utilizaron los anticuerpos PFKP (ab204131) y hnRNPK (D-6), respectivamente. Las co-inmunoprecipitaciones fueron analizadas por *Western blots* utilizando los anticuerpos correspondientes a cada experimento (Co-IP).

3.2.4.- Inmunofluorescencia: Las células fueron sembradas en cubreobjetos, transfectadas con lipofectamina 2000 en el caso de corresponder, fijadas con 4% paraformaldehído y permeabilizadas con 0.1% de tritón X-100. Luego, fueron incubadas con los anticuerpos primarios a 4°C por toda la noche. Después de los lavados (3 lavados de 5 min) las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario-conjugado, Hoechst 33342 y Faloidina por 2 horas. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal espectral LMS 780 (*Zeiss, jena, Germany*). Tiempos de exposición idénticos y zoom (63x)

fueron usados para la comparación y cuantificación de las imágenes. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

3.2.5.- Purificación de proteínas recombinantes: Para la purificación de proteínas recombinantes se utilizaron los plásmidos pQE80L hNUAK1 y pGEX4T1 PFKP que fueron transformados en bacterias BL21. Se inoculó una colonia de cada condición por toda la noche a 37°C en medio LB (*Luria broth*) con ampicilina (100ng/μl). Luego, se inocularon 5 ml en 500 ml de medio LB más ampicilina (100ng/μl) hasta alcanzar la Abs 0.4-0.6. La inducción se realizó con *Isopropil β-D1-tiogalactopiranosido* (IPTG) a una concentración de 500 μM por 24 horas a 16°C, con agitación constante. El cultivo fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C y el pellet resuspendido en 10 ml de buffer de lisis frío (300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 20mM imidazol, 0.5 mM PMSF, 5 μg/ml Leupetina y 1μg/ml pepstatin A). Posteriormente, las muestras se sonicaron con 4 pulsos de 15 segundos a 30 *watts*, seguido de 20 segundos de descanso en hielo entre cada pulso. Los lisados fueron centrifugados a 9000 rpm por 10 minutos y luego incubados con la resina Ni-NTA (Qiagen) (previamente equilibrada, en una columna BioRaD) y glutatión sepharose por toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con el buffer de lavado (300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 50mM imidazol). En el caso de la purificación de 6xHis-NUAK1 WT se realizaron 4 eluciones con imidazol 100, 150, 200 y 250 μM, respectivamente. La cuantificación y validación de las purificaciones se realizó con azul de coomassie (Fig. 43)

3.2.6.- Generación de modelos celulares estables: Los modelos celulares estables fueron generados utilizando sistemas retrovirales de **primera** y lentivirales de **segunda generación**. El protocolo para todos los modelos fue estandarizado en esta tesis y comparte los 3 principales pasos de las infecciones virales. El primero, consiste en el

empaquetamiento donde se utilizaron células HEK293T las que fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes. El segundo, la infección, que se realizó 48 post-transfección que corresponde a la primera ronda de infección donde se agregó 8 µg/ml de prolibreno (*Merk millipore*). Después de 24 horas se realizó la segunda ronda de infección repitiendo los pasos de la primera infección. La tercera etapa correspondió a la selección que se realizó por 4-5 días con el antibiótico correspondiente (puromicina y higromicina). La validación de cada uno de los modelos estables se realizó a través de *Western blots* con los anticuerpos correspondientes a cada caso. A continuación, se describen los pasos diferenciales entre cada protocolo en caso de corresponder y los plásmidos utilizados para cada infección viral.

- i) **Silenciamiento de NUA1:** Para el silenciamiento de NUA1 se utilizó el sistema **lentiviral pLKO**. Los plásmidos utilizados fueron: i) pLKO shControl y ii) pLKO shNUA1 319 co-transfectados con pCMV dR8.2 y pCMV VSV-G en cada uno de los casos. La selección de los modelos se realizó con puromicina (5µg/ml para MEF, 4µg/ml para MDA-MB-231 y 4µg/ml para MCF7).
- ii) **Sobre-expresión estable y constitutiva de FLAG-mNUA1:** Para la sobreexpresión estable-constitutiva de FLAG-mNUA1 en células MEF se utilizó el **sistema retroviral pBabe de primera generación**. Los plásmidos utilizados fueron: **i)** pBP FLAG, **ii)** pBP FLAG-mNUA1 WT, **iii)** pBP FLAG-mNUA1 KR44AA, **iv)** pBP FLAG-mNUA1 KR71AA, **v)** pBP FLAG-mNUA1 KR44/71AA co-transfectado con el plásmido pCL-Eco (*addgene*, #12371) para cada caso. Para asegurar bajos niveles de expresión similares a los **niveles endógenos** de NUA1 se realizaron infecciones con diluciones seriadas (al menos 3 diluciones) por 2 rondas de infección. La validación se realizó a través de *Western blots*

donde se eligieron los **modelos estables de menor expresión**. La selección de los modelos se realizó con puromicina (5µg/ml). Es importante destacar que este sistema **sólo infecta** células de ratón. **Para poder utilizar este sistema para infectar células humanas se realizó una nueva estandarización. Este protocolo requirió de un nuevo diseño donde se agregó en la transfección el plásmido pCMV VSV-G. La relación molar fue 1:3 con respecto al plásmido pBP FLAG.**

- iii) **Sobre-expresión estable e inducible de FLAG-hNUAK1:** Para la sobre-expresión de FLAG-hNUAK1 estable e inducible en células MCF7 y MDA-MB-231 se utilizó el sistema lentiviral pCW57 (TET/On). Los plásmidos utilizados fueron pCW57 FLAG-hNUAK1 WT (puro) y pCW57 FLAG-hNUAK1 K84A (puro) co-transfectados con pCMV dR8.2 y pCMV VSV-G en cada caso. La selección de los modelos se realizó con puromicina (2µg/ml para MDA-MB-231 y 4µg/ml para MCF7).
- iv) **Sobre-expresión estable e inducible de FLAG-hNUAK1 y HA-PFKP:** Para la sobre-expresión de FLAG-hNUAK1 (WT y K84A) y HA-PFKP inducible se generó un **nuevo protocolo**. Este consistió en realizar una **co-infección** de FLAG-hNUAK1 (WT y K84A) y HA-PFKP. Para ello, células HEK293T fueron co-transfectadas con: **i)** pCW57 FLAG-hNUAK1 WT (puro), pCMV dR8.2 y pCMV VSV-G (**Condición 1**), **ii)** pCW57 FLAG-hNUAK1 K84A (puro), pCMV dR8.2 y pCMV VSV-G (**Condición 2**), **iii)** pCW57-MCS1-2A- HA PFKP (hygro), pCMV dR8.2 y pCMV VSV-G (**Condición 3**). La infección se realizó co-infectando con las **condiciones 1 y 3** y la co-infección de las **condiciones 2 y 3** en las células

MCF7 y MDA-MB-231. Esta estrategia permitió acelerar y mejorar la eficiencia en la generación de un modelo con una **doble infección**. La selección se realizó durante 1 semana con puromicina y higromicina B (2 μ g/ml de puromicina y 600 μ g/ml de higromicina para MDA-MB-231 y 4 μ g/ml de puromicina y 600 μ g/ml de higromicina para MCF7).

3.2.7.- Ensayo de cierre de herida: Para realizar el ensayo de cierre de herida se sembraron los modelos celulares estables en placas de 12 pocillos. A las 24 horas de cultivo o al alcanzar una confluencia del 100% se procedió a realizar una herida con una punta de pipeta p200. Luego, se realizó el cambio de medio agregando medio DMEM sin suero. El porcentaje de cierre de la herida fue calculado a partir del área inicial (al momento de realizar la herida) y a las 16 y 24 horas de incubación.

3.2.8.- Ensayo de *transwell*: Para realizar el ensayo de transwell se utilizaron insertos de 6.5 mm con poros de 8 μ m (Corning). El día previo a realizar el ensayo se procedió a cubrir la cara inferior de los insertos con 2 μ g/ml de fibronectina (Sigma) por toda la noche a 4°C. El día siguiente los insertos fueron lavados con PBS 1X y secados por 30 minutos. Luego se sembró 1x10⁴ células en la cara superior de cada inserto con DMEM sin suero. En la parte inferior se agregó DMEM completo (10% FBS). Los insertos fueron mantenidos por 3-4 horas a 37°C en 5% de CO₂ para permitir la migración celular. Posterior a la incubación se retiró el inserto y las células que quedaron en la cara superior fueron eliminadas por repetidos lavados con PBS 1X (3 lavados). Las células que lograron migrar fueron fijadas con solución fijadora (10% v/v ácido acético y 10% metanol) por 10 minutos y teñidas con 1 ml de solución de cristal violeta al 0.4% p/v por 10 minutos. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se capturaron las imágenes de cada inserto.

3.2.9.- Análisis de espectrometría de masas, MudPIT: Los modelos celulares estables de menor expresión correspondientes a las células MEF: MEF pBABE FLAG (control), MEF pBABE FLAG-mNUAK1 WT y MEF pBABE FLAG-mNUAK1 KR44/71AA fueron utilizados para la purificación de NUAK1. Se utilizaron 20 placas de 15 cm por modelo en condiciones normales y condiciones de estrés. La lisis de modelos se realizó de acuerdo con el protocolo de fraccionamiento núcleo-citoplasma (ver protocolo en 3.2.1). La purificación de FLAG-NUAK1 se realizó por la incubación con la resina *anti-FLAG-affinity gel* (M2) en agitación por toda la noche a 4°C (ver protocolo en 3.2.3). Luego, se realizaron 3 lavados con buffer de lavado a 4°C en agitación (10mM HEPES (pH7.9), 1.5mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 10mM KCl y 0.5% Triton X-100) y 3 eluciones con el buffer de elución (10mM HEPES (pH7.9), 1.5 mM MgCl₂, 0.15mM NaCl, 0.05% Triton X-100) a temperatura ambiente en agitación por 10 minutos. Las proteínas eluidas fueron precipitadas con TCA (*Trichloroacetic acid*) y enviadas al core de proteómica de *Stowers Institute for medical research*, Estados Unidos, para realizar la técnica de *MudPIT* (*Multidimensional Protein Identification Technology*).

Las proteínas precipitadas fueron denaturadas, reducidas, alcalinizadas y digeridas con endoproteinasa *Lys-C* (*Roche*) seguido de digestión con tripsina (*Promega*) (Florens & Washburn, 2006; Washburn, Wolters, & Yates III, 2001). La mezcla de los péptidos fueron cargados en columnas de microcapilar de silica 250 µm con una resina de intercambio de cationes (*Luna, Phenomenex*) y 5-µm de fase reversa C18 (*Aqua, Phenomenex*), y luego conectada a 100 µm de un microcapilar de silica 5-µm de fase reversa C18 (*Aqua, Phenomenex*) (Florens & Washburn, 2006). Las columnas microcapilares cargadas se colocaron en línea con un *HPLC Agilent series 110* y un espectrómetro de masas con trampa de iones equipado con una *nano-LC electrospray ionization source* (*ThermoScientific*). Se analizaron simultáneamente 10-corridos de MudPIT. Los espectros de masas (MS/MS) fueron interpretados con ProluCID (Xu y col., 2015). Contrastados con

la base de datos de *Mus musculus* (NCBI, 2015-03-04 release), 193 contaminantes usuales (queratinas humanas, IgGs y enzimas proteolíticas). Para estimar el *false discovery rates* (FDR)s, las secuencias de cada proteína no-redundante fue randomizada para generar una librería virtual. Todas las cisteínas fueron consideradas como carboxamidometilas (+57 Da). Todos los FDRs fueron menores al 5%. Todos los sets de datos fueron contrastados con el *merged*, usando *Contrast* v 1.9. El software, NSAF7 v0.0.1 fue usado para generar el conteo-basal espectral (Y. Zhang, Wen, Washburn, & Florens, 2010).

3.2.10.- Medición de la actividad de la Fosfofructoquinasa (PFK): Para medir la actividad de la PFK1 se utilizaron células MDA-MB-231 y MCF7. En el caso de las células MDA-MB-231 se sobre-expresó FLAG-hNUAK1 WT y luego fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1 por 2 horas en condiciones normales (experimento 1) y en privación de glucosa (experimento 2). En el caso de las células MCF7, NUAK1 fue silenciado con un *shRNA* específico. Por otro lado, células MCF7 fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015) por 2 horas Luego se utilizó el kit; *Phosphofructokinase (PFK) Activity Colorimetric kit #K776 (Biovision)*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.11.- Medición de los niveles de NADPH: Para medir los niveles de NADPH células MDA-MB-231 y MCF7 fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015) por 2 horas. Luego las células fueron colectadas y se utilizó el kit; *NAPD/NAPDH Quantitation Colorimetric Kit #K337 (Biovision)*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.12.- Medición de los niveles de estrés oxidativo: Para medir los niveles de estrés oxidativo células MCF7 fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015) por 4 horas. Luego las células fueron tripzinizadas y tratadas con 500nM de la sonda *CellROX Deep*

Red por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo *Cell Sorter BD FACSAria III*.

3.2.13.- Análisis bioinformáticos: Las predicciones de la localización sub-celular de NUA1 fueron realizadas en las bases de datos: *COMPARTMENTS Subcellular Localization Database* (<https://compartments.jensenlab.org>), *Multiloc2* (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) and *PSORTII* (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) usando la secuencia completa de NUA1 murino y humano. Las predicciones de las SLN fueron realizadas en: *NLStradamus*, *cNLS mapper* and *netNES 1.1* utilizando la secuencia completa de NUA1 murino y humano. Los análisis ontológicos fueron realizados en *Toppgene database*. El motivo de fosforilación de NUA1 fue generado en *plogo*. Las predicciones de fosforilación de los potenciales interactores de NUA1 se realizaron utilizando este motivo, el obtenido en *phosphonetworks* y el facilitado por el Dr. Daniel Murphy (Universidad de Glasgow, Reino Unido). El análisis de la estructura de la fosfofructoquinasa de plaqueta (PFKP) y las mutaciones sitio dirigidas fueron realizadas con la estructura PDB utilizando *SPD viewer*.

3.2.14.- Cuantificación y análisis estadísticos: La cuantificación de las inmunofluorescencias fueron realizadas en el *software ImageJ* midiendo la fluorescencia de la fracción nuclear y citoplasmática seguido por la normalización con sus respectivas áreas. Los porcentajes de NUA1 nuclear y citoplasmático fueron calculados después de la normalización. Las densitometrías de los *western blots* y el análisis de las imágenes también fueron realizadas en *ImageJ*. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados en *GraphPad Prism 7*. La significancia estadística fue determinada por *t-test Student* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) o *one way ANOVA* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.- Resultados

4.1.- Objetivo 1: Determinar el mecanismo molecular que media el importe al núcleo de NUA1.

La localización sub-celular de la quinasa NUA1 no ha sido previamente caracterizada. Por lo tanto, la primera aproximación experimental utilizada fue evaluar la localización sub-celular de NUA1 en diferentes líneas celulares y tejidos de ratón. Derivado de estos experimentos se determinó que la quinasa NUA1 se localiza **principalmente en el núcleo** en fibroblastos embrionarios de ratón (*MEF*), células HCT116 p53 null y células HeLa (Fig. 8A-C). En contraste, NUA1 fue localizada **principalmente en el citoplasma** de células de cáncer de mama; MCF7 y MDA-MB231 (Fig. 8D-E) y en **ambas fracciones** en células de adenocarcinoma colorectal, DLD-1 (Fig. 8F). Análisis adicionales realizados en tejidos normales de ratón determinaron que la quinasa NUA1 es localizada principalmente en el núcleo en tejidos de cerebro, corazón y pulmón, pero en ambas fracciones en el hígado (Fig. 8G-J). Finalmente, confirmamos la localización nuclear de NUA1 a través de inmunofluorescencia sobre-expresando a FLAG-NUA1 murino o humano en células HeLa (Fig. 8K-L). En resumen, estos resultados sugirieron la existencia de un mecanismo de regulación de la localización sub-celular de NUA1 que depende del tipo celular y el tejido evaluado (Palma y col., 2019).

Por lo tanto, debido a las evidencias entregadas anteriormente, se propuso en este objetivo: **i)** Determinar la(s) secuencia(s) de localización nuclear funcionales para NUA1 (Objetivo 1.1). **ii)** Determinar la(s) proteína(s) que medían el importe de NUA1 al núcleo (Objetivo 1.2).

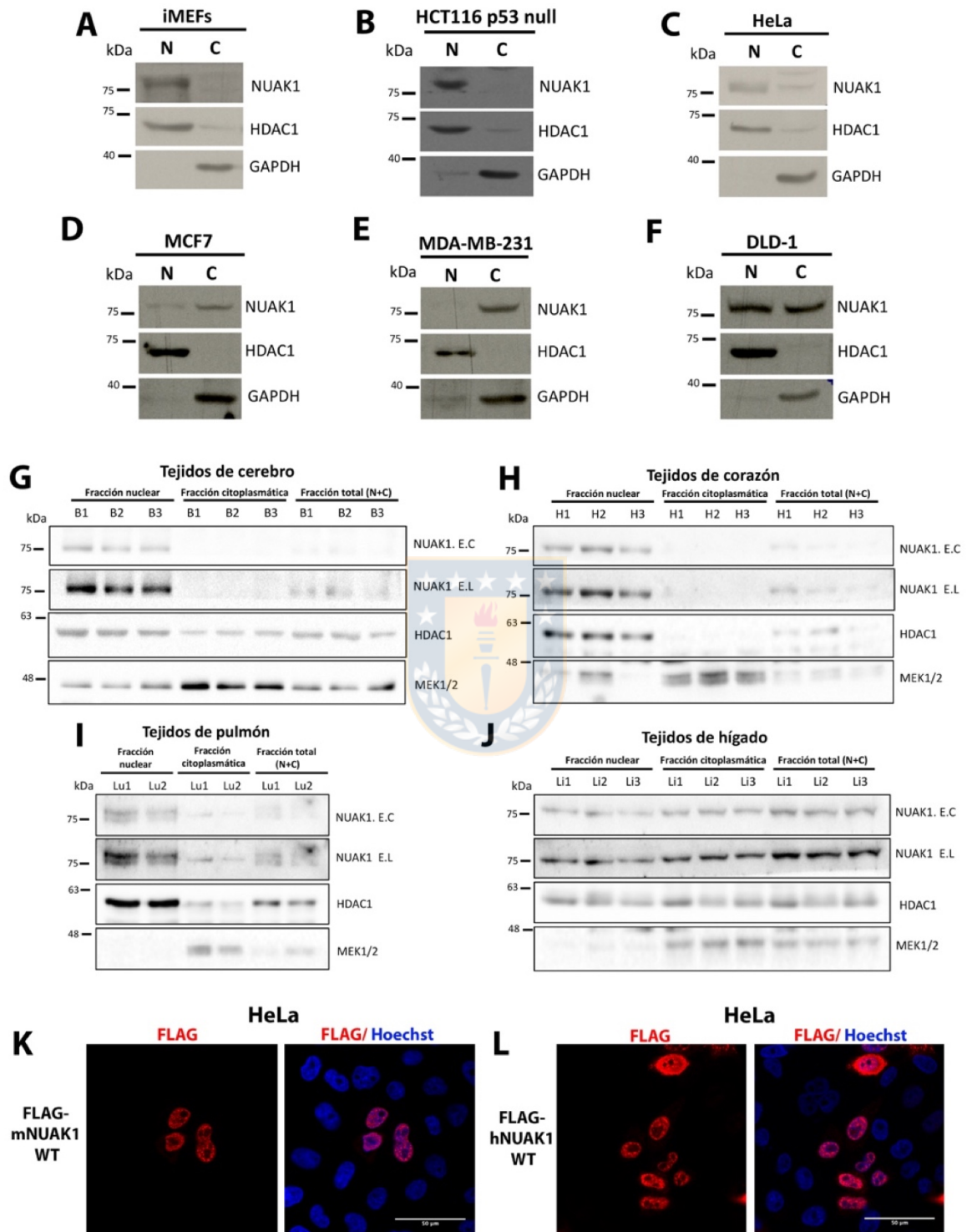


Figura 8. NUAK1 es localizada en el núcleo y/o citosol dependiendo del tipo celular y el tejido analizado. A-F.- *Western blots* del fraccionamiento sub-celular de células iMEFs (A), HCT116 p53-null (B), HeLa (C), MCF7 (D), MDA-MB-231 (E) y DLD-1 (F) utilizando los anticuerpos indicados. HDAC1 fue utilizado como marcador nuclear. GAPDH fue utilizado como marcador citoplasmático. N: Fracción nuclear, C: fracción citoplasmática. **G-J.-** *Western Blot* del fraccionamiento sub-celular de tejidos de ratón. B1, B2 y B3 corresponden a 3 diferentes tejidos de cerebro (G). H1, H2, H3 corresponden a 3 diferentes tejidos de corazón (H). Lu1 y Lu2 corresponden a 2 diferentes tejidos de pulmón (I). Li1, Li2, Li3 corresponden a 3 diferentes tejidos de hígado (J). Los tejidos fueron obtenidos de ratones de 5 semanas de edad. MEK1/2 fue utilizado como control de la fracción citoplasmática. E.C: Exposición corta, E.L: Exposición larga. **K-L.-** Microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-NUAK1 WT murino y humano, respectivamente. Las células fueron incubadas con anticuerpo anti-FLAG, Rojo. Azul, núcleo. 63X zoom. Cada figura es representativa de al menos 3 experimentos independientes. Fuente: Elaboración propia.

4.1.1.- Objetivo 1.1: Determinar la(s) secuencia(s) de localización nuclear funcionales para NUAK1.

Los estudios previos determinaron **dos putativas-SLN** conservadas en NUAK1 murino y humano (Fig. 4). Por lo tanto, nos focalizamos en **validar la funcionalidad de las putativas-SLN** (bipartita y monopartita) utilizando diversas aproximaciones experimentales.

4.1.1.1.- La región N-terminal de NUAK1 es requerida para su localización nuclear.

Debido a que ambas putativas-SLN se encuentran localizadas en diferentes regiones de NUAK1 (Fig. 4) es que la primera aproximación experimental fue evaluar si la región N-terminal o C-terminal es requerida para la localización nuclear de NUAK1. Estos datos a su vez nos permitieron acotar la búsqueda de la SLN-funcional de NUAK1. Para ello, monitoreamos la localización sub-celular de varias deleciones de NUAK1 murino en células HeLa (Fig. 9). La generación y expresión de las diferentes deleciones fue validada

previo a su uso (Anexo fig. 2). La localización nuclear de FLAG-mNUAK1 WT presentó un patrón puntiforme (Fig. 9). Esta localización y patrón fue mantenido en FLAG-mNUAK1 NT (1-336), deleción que contiene sólo el N-terminal de NUAK1 (Fig. 9). Por otro lado, FLAG-mNUAK1 CT (329-658), deleción que contiene el C-terminal de NUAK1, fue localizada en el citoplasma (Fig.9). **Estos datos nos sugirieron que el N-terminal es la región que contiene los elementos funcionales necesarios para el importe nuclear de NUAK1.** Por lo tanto, generamos nuevas deleciones de la región N-terminal focalizándonos en la putativa SLN-bipartita. Para ello, se deletaron los primeros 64 aminoácidos de la deleción FLAG-mNUAK1 NT y también de la proteína completa FLAG-mNUAK1 WT, generando nuevas deleciones; FLAG-mNUAK1 dNT1 (65-336) y FLAG-mNUAK1 dNT2 (65-658). Cabe destacar que ambas deleciones perdieron el **motivo menor** de la putativa SLN-bipartita. La expresión de FLAG-mNUAK1 dNT1 (65-336) en células HeLa evidenció una localización nuclear y citoplasmática (Fig. 9). Sin embargo, la deleción FLAG-mNUAK1 dNT2 (65-658) fue completamente localizada en el citosol. Debido a que FLAG-mNUAK1 dNT1 tiene un tamaño de ~28.9 kDa existe la posibilidad que su localización en el núcleo-citosol pueda deberse a un **transporte pasivo** a través del poro nuclear. Adicionalmente, generamos una nueva deleción FLAG-mNUAK1 dNT3 (76-658) la cual carece del **motivo menor y mayor** de la putativa SLN-bipartita. **En otras palabras carece de la putativa SLN-bipartita.** La deleción FLAG-mNUAK1 dNT3 exhibió una localización completamente citoplasmática (Fig. 9). Así, estos datos sugieron que la región N-terminal esta involucrada en la localización nuclear de NUAK1 a través de la putativa SLN-bipartita localizada entre los residuos 64 y 75 de NUAK1 murino.

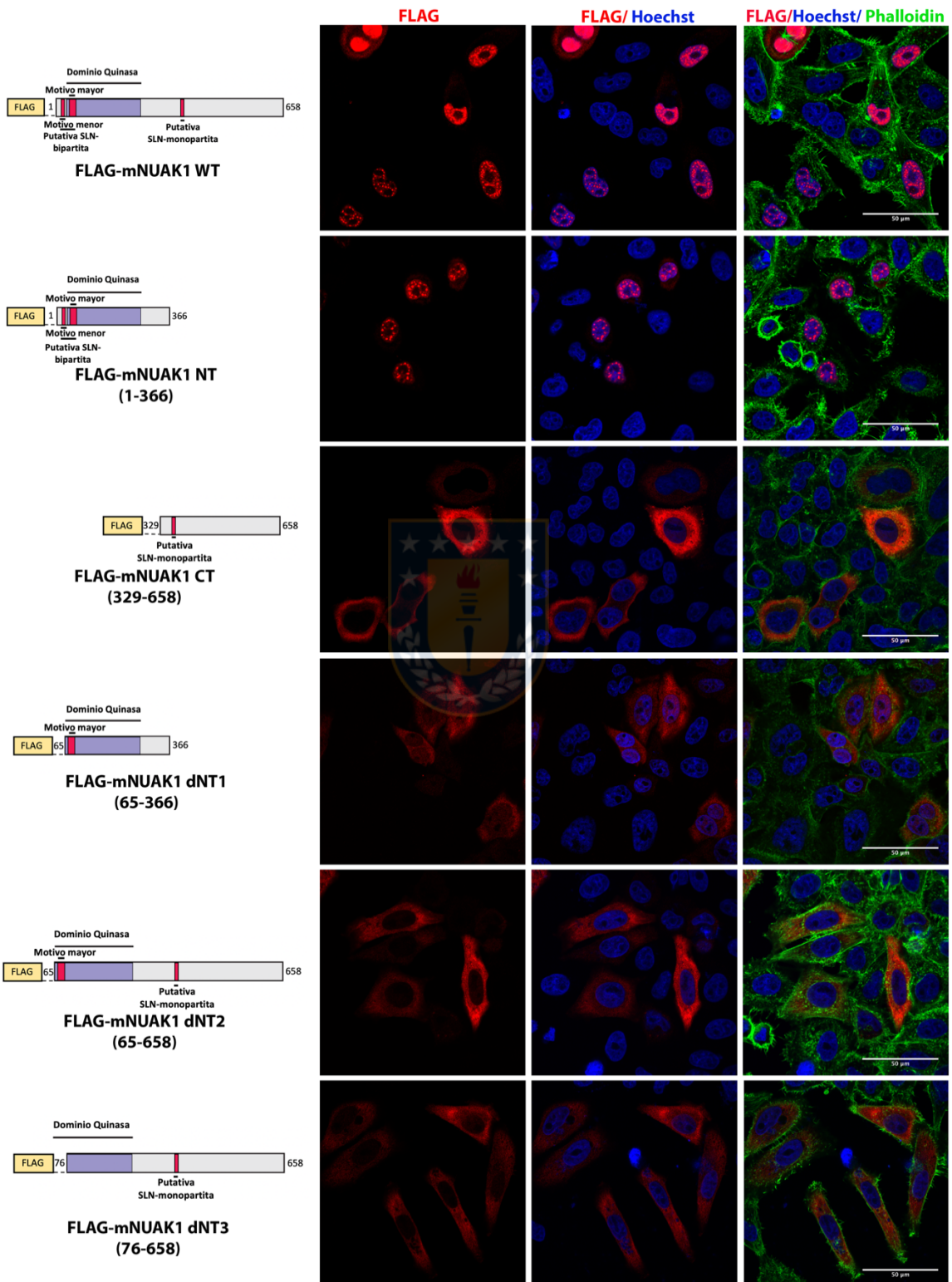


Figura 9. La región N-terminal de NUAK1 es requerida para su localización nuclear. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-mNUAK1 WT y otras deleciones de NUAK1 murino. En rojo, FLAG-mNUAK1 WT y las deleciones utilizando el anticuerpo anti-FLAG M2. Verde, Filamentos de actina utilizando Faloidina. Azul, núcleo. Zoom 63X. A la izquierda se representan los esquemas de FLAG-mNUAK1 WT y las respectivas deleciones de NUAK1. Fuente: Elaboración propia.

4.1.1.2.- NUAK1 tiene una SLN-bipartita conservada hacia la región N-terminal.

Para validar la funcionalidad de la SLN-bipartita generamos mutaciones puntuales en el motivo menor (⁴⁴KR⁴⁵) y/o el mayor (⁶⁹KVKRAT⁷⁴). Los residuos de Lisina y Arginina de estos motivos fueron mutados por Alanina. (Fig. 10). La generación y expresión de las diferentes mutantes de NUAK1 fue validada previo a su uso (Anexo fig. 3). La mutante del motivo menor (⁴⁴AA⁴⁵) presentó una localización nuclear y citoplasmática (66.5% nuclear; 33% citoplasmática) (Fig. 10A-B). La mutante del motivo mayor (⁶⁹KVAAAT⁷⁴) exhibió una mayor acumulación citoplasmática comparada con la mutante del motivo menor (40 % nuclear, 60 % citoplasmática) (Fig. 10A-B). Sin embargo, la expresión de una mutante que contiene la mutación del motivo menor y mayor de la putativa SLN-bipartita (⁴⁴AA⁴⁵_(Linker, n=23)⁶⁹KVAAATE⁷⁵) evidenció la mayor acumulación citoplasmática comparado con todas las mutantes murinas (22 % nuclear, 78 % citoplasma) (Fig. 10A-D). Estos resultados validaron la funcionalidad de la SLN-bipartita (⁴⁴KR⁴⁵_(linker, n=23)⁶⁹KVKRATE⁷⁵) que según nuestros datos media el transporte de NUAK1 murino al núcleo (Fig. 10A-B). Estos resultados fueron validados a través del fraccionamiento sub-celular de células HeLa expresando FLAG-mNUAK1 WT o FLAG-mNUAK1 KR44/71AA (Fig. 10C-D). En paralelo, mutamos los residuos de Lisina y Arginina de la putativa SLN-monopartita (³⁹⁶KRKK³⁹⁹) localizada en la mitad de NUAK1 (Fig. 4). La mutante de la putativa SLN-monopartita (³⁹⁶AAKK³⁹⁹) mantuvo la localización nuclear y el patrón puntiforme (87 % núcleo; 12 % citoplasma), validando los resultados obtenidos en los experimentos de las deleciones (Fig. 11).

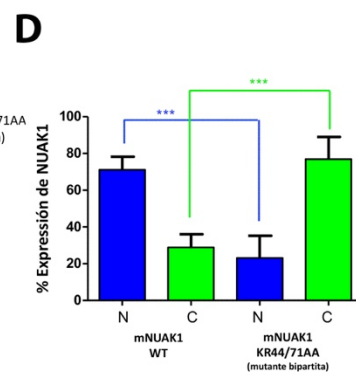
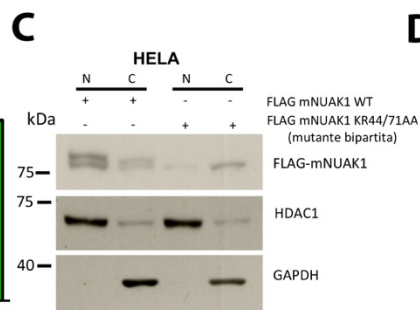
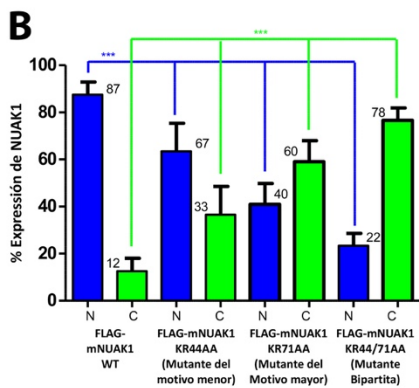
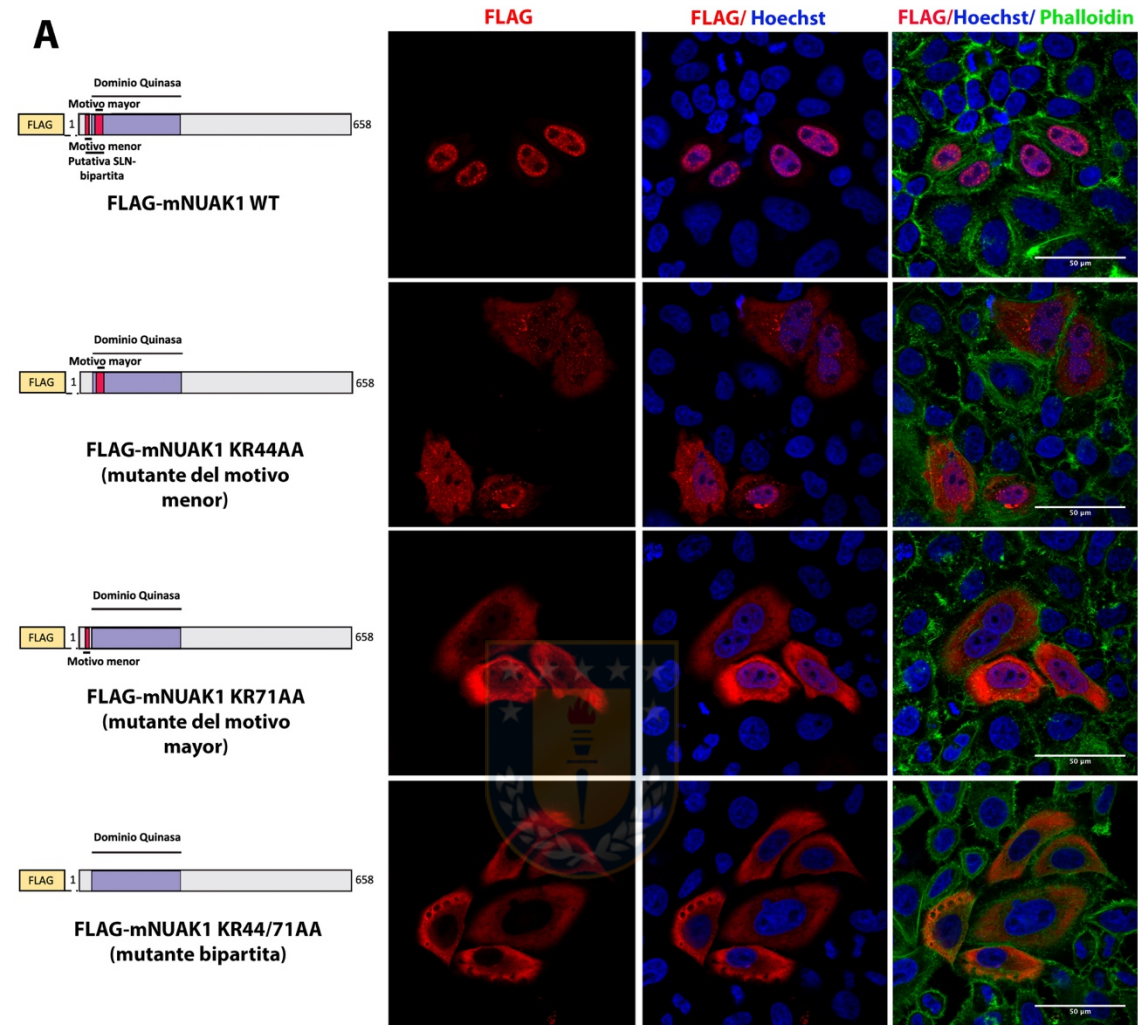


Figura 10. NUA1 murino contiene una SLN-bipartita funcional en la región N-terminal. A.- Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-mNUAK1 WT o mutantes de la putativa SLN-bipartita de NUA1. En rojo, FLAG-mNUAK1 WT y las delecciones utilizando el anticuerpo anti-FLAG M2. Verde, Filamentos de actina utilizando Faloidina. Azul, núcleo. Zoom 63X. A la izquierda se representan los esquemas de FLAG-mNUAK1 WT y las respectivas mutantes de NUA1. **B.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (A) mNUAK1 WT (n=95), mutante del motivo menor (n=88), mutante del motivo mayor (n=88) y mutante bipartita (n=100). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. ***p<0.001. *one-way ANOVA* **C.-** *Western blot* del fraccionamiento sub-celular de células HeLa expresando FLAG-mNUAK1 WT y la mutante de la putativa SLN-bipartita. La fracción nuclear y citoplasmática fueron validadas con los anticuerpos indicados (HDAC1 y GAPDH). **D.-** Gráfico de la cuantificación densitométrica (n=3) del fraccionamiento sub-celular realizado en (C). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. ***p<0.001. *test t-student*. Fuente: Elaboración propia.



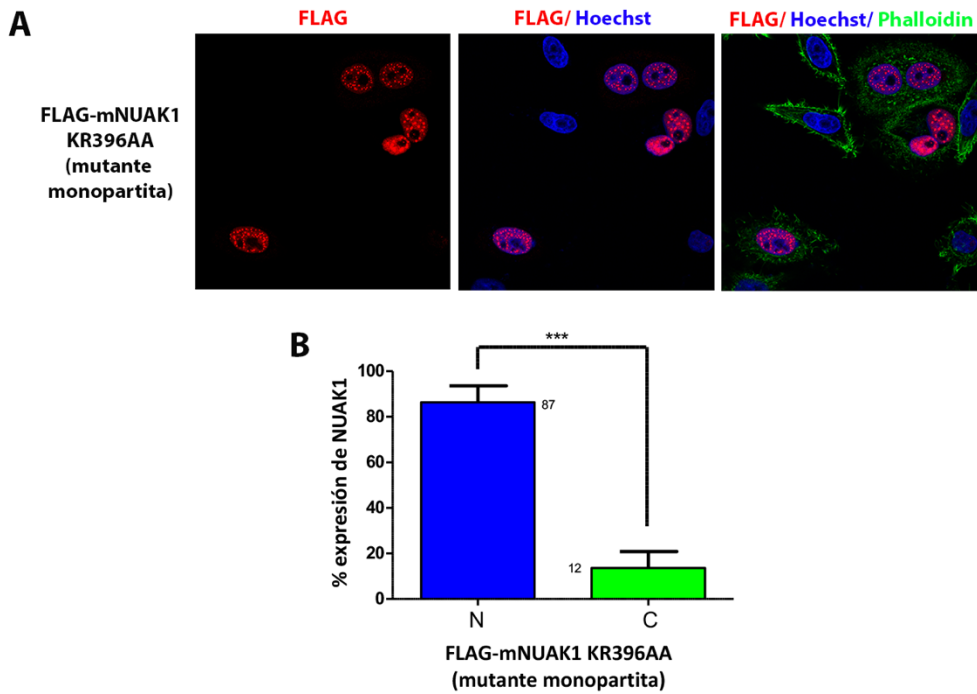


Figura 11. La putativa SLN-monopartita no afecta la localización nuclear de NUAK1.

A.- Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando la mutante de la putativa SLN-monopartita localizada hacia la región C-terminal. En rojo, FLAG-mNUAK1 WT y las deleciones utilizando el anticuerpo anti-FLAG M2. Verde, Filamentos de actina utilizando Faloidina. Azul, núcleo. Zoom 63X. **B.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (A). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. *** $p < 0.001$. *Test t-student*. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, debido a la conservación de la SLN en NUAK1 murino y humano analizamos si la SLN-bipartita es requerida para el transporte nuclear de NUAK1 humano. Para ello, se realizaron las mutaciones del **motivo menor, mayor y ambos en NUAK1 humano**. Expresando estas mutantes en células HeLa (Fig. 12) y MDA-MB-231 (Fig. 13) determinamos que la SLN-bipartita es funcional en NUAK1 humano. **En resumen, nuestros resultados identificaron una SLN-bipartita funcional conservada en humano y ratón que es requerida para el importe nuclear de la quinasa NUAK1.**



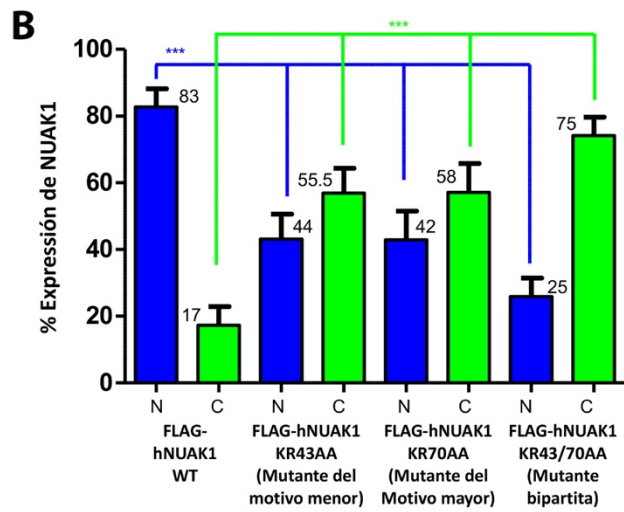
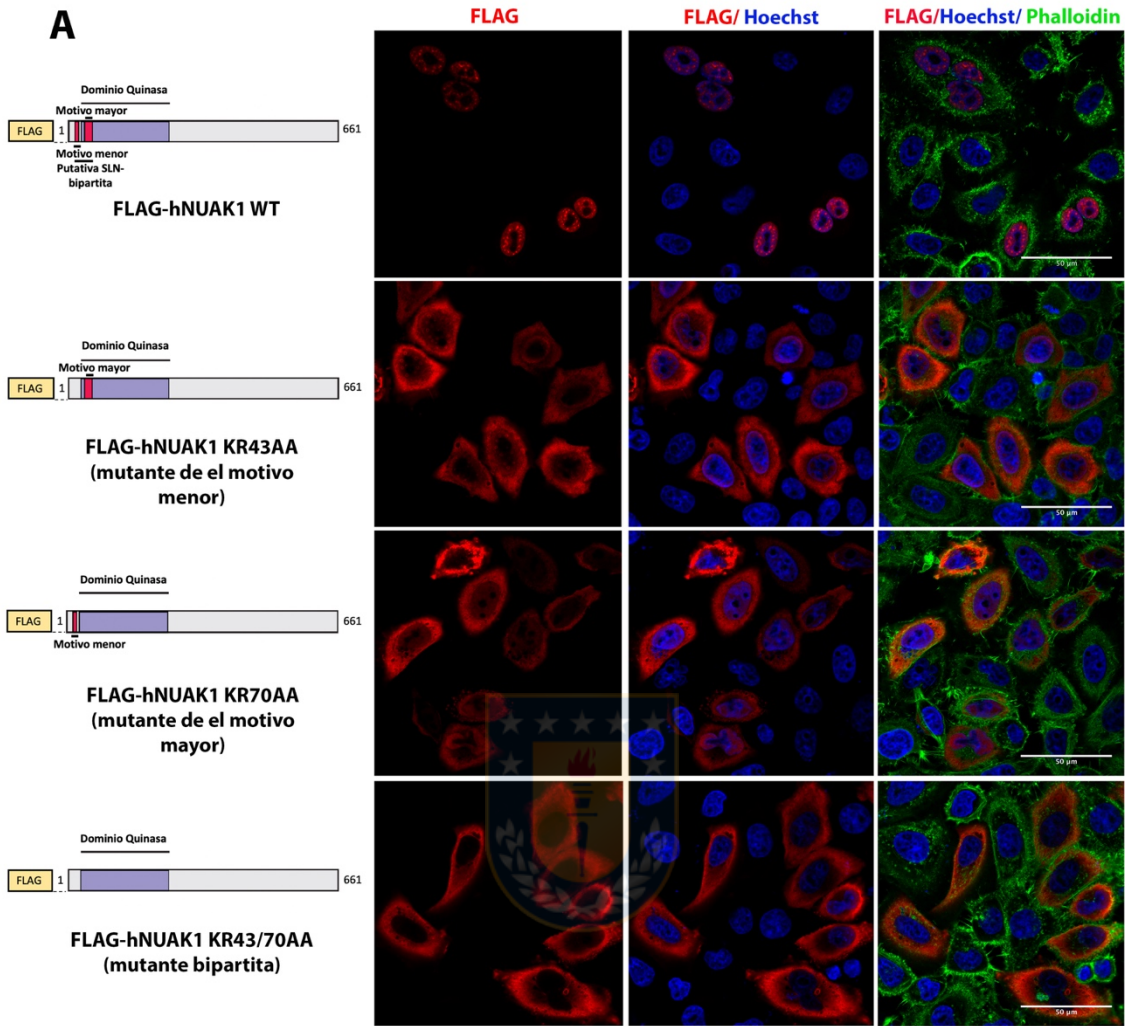


Figura 12. La SLN-bipartita es conservada en NUAK1 humano. A.- Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-hNUAK1 WT o mutantes de la putativa SLN-bipartita de NUAK1. En rojo, FLAG-hNUAK1 WT y las mutantes utilizando el anticuerpo anti-FLAG M2. Verde, Filamentos de actina utilizando Faloidina. Azul, núcleo. Zoom 63X. A la izquierda se representan los esquemas de FLAG-hNUAK1 WT y respectivas mutantes de NUAK1 (humano). **B.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (A), hNUAK1 WT (n=100), mutante del motivo menor (n=90), mutante del motivo mayor (n=95) y mutante bipartita (n=100). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. ***p<0.001. *one-way ANOVA*. Fuente: Elaboración propia.

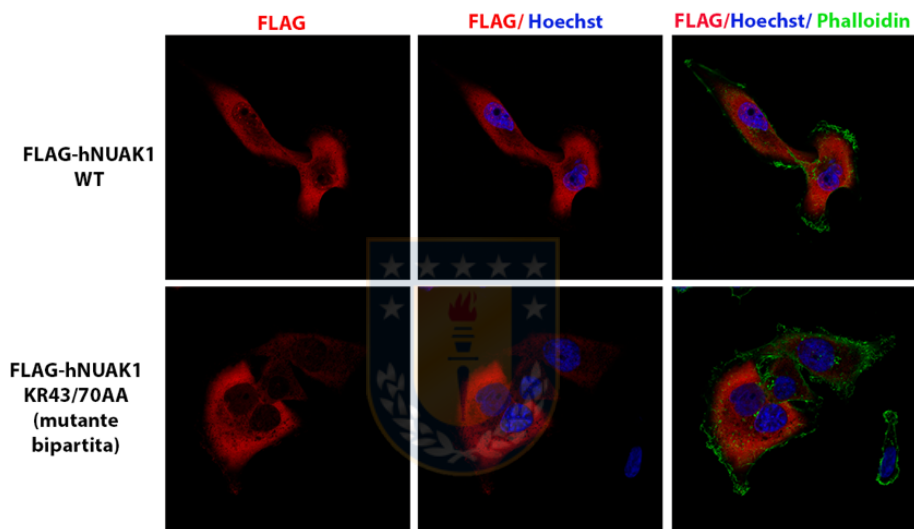


Figura 13. Validación de la SLN-bipartita en MDA-MB-231. Imágenes Microscopía confocal de células MDA-MB-231 expresando FLAG-hNUAK1 WT o la mutante de la SLN-bipartita de NUAK1. En rojo, FLAG-hNUAK1 WT y la mutante bipartita utilizando el anticuerpo anti-FLAG M2. Verde, Filamentos de actina utilizando Faloidina. Azul, núcleo. Zoom 63X. Fuente: Elaboración propia.

4.1.2.- Objetivo 1.2. Determinar la(s) proteína(s) responsable(s) de mediar el importe al núcleo de NUA1

Después de identificar la SLN involucrada en el transporte nuclear de NUA1 nos propusimos determinar la(s) proteína(s) que reconocen y median el importe nuclear de NUA1. Para ello, se purificó FLAG-mNUA1 WT de la fracción nuclear y citoplasmática de células MEF estables y luego se analizaron las proteínas purificadas por espectrometría de masas utilizando; *multidimensional protein identification technology* (MudPIT). Derivado de este análisis identificamos sólo péptidos de miembros de la familia de la importinas- β los cuales incluyen a la Importina- β 1 (KPNB1), IPO7 y IPO9 en la fracción citoplasmática (Fig. 14A). La abundancia de estos péptidos fue significativamente mayor en el purificado de NUA1 que en el control (Fig. 14A). Adicionalmente, es importante destacar que no fueron identificados péptidos de las Importinas- α (Fig. 14A). En general, el transporte nuclear activo de proteínas es mediado por las importinas. Las células de mamífero contienen 7 isoformas de las importinas- α y 20 isoformas de las importinas- β . Ellas pueden formar monómeros- β , heterodímeros- $\alpha\beta$ 1 o heterodímeros- β 1 β que unen al cargo a través de la(s) SLN (Chook & Suel, 2011; Marfori y col., 2011). Cabe destacar que existe evidencia que las SLN-clásicas son reconocidas principalmente por el heterodímeros- $\alpha\beta$ 1, pero también por las Importinas- β (Flores & Seger, 2013; Freedman & Yamamoto, 2004). Por lo tanto, examinamos si NUA1 interacciona con la importina- β 1, IPO7 y IPO9. Utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación identificamos que FLAG-NUA1 WT co-inmunoprecipita con la importina- β 1, IPO7 y IPO9 (Fig. 14B-C). Adicionalmente, la región N-terminal de NUA1 que contiene la SLN-bipartita, FLAG-mNUA1 NT (1-336) co-inmunoprecipitó con la importina- β 1 (Fig. 14D). Estos datos validaron que NUA1 interacciona con las importinas- β y que la región N-terminal que contiene la SLN-bipartita es requerida para su interacción. Para determinar la relevancia de la SLN-bipartita en la interacción con las importinas- β

evaluamos si la mutante de la SLN-bipartita puede interactuar con IPO7 y IPO9 endógenas. Como fue observado en la Fig. 10C la sobreexpresión de NUA1 WT muestra una doble banda que corresponde a una modificación post-traducciona que no es observada en la mutante bipartita (Fig. 14E). Los niveles de expresión de la banda inferior fueron similares a los niveles de expresión de la mutante bipartita. Sin embargo, el inmunoprecipitado de la banda superior distorsiona la cantidad de inmunoprecipitado. Considerando las bandas inferiores y comparado con la proteína WT, la mutante bipartita evidenció una leve interacción con IPO7 y IPO9 endógeno validando la relevancia de secuencia bipartita en la interacción con las importinas- β . Finalmente, utilizando otro modelo celular, células HEK293 validamos que NUA1 interactúa con las importinas- β (β 1, IPO7 y IPO9) pero esta vez utilizando una aproximación experimental diferente que consistió en inmunoprecipitar la importina- β 1 y evaluar si la interacción u complejo con IPO7/IPO9 aumenta cuando FLAG-hNUA1 WT se encuentra presente (Fig. 14F). **En resumen, con estos datos validamos que IPO7, IPO9 y la importina- β 1 son nuevos interactores de NUA1 que podrían mediar su transporte al núcleo.**

Proteins	MEF FLAG-NUAK1 WT							MEF (Control)					
	MW	Nuak1-WT-NE_P			Nuak1-WT-CE_P			Control-NE_P			Control-CE_P		
		P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF
Nuak1	73662	45	542	0,0317	54	1317	0,01957824	0	0	0	0	0	0
Kpnb1 (Importin-B1)	97184	2	4	0,00017582	9	24	0,00026799	1	1	0,00004131	3	4	0,00007995
Ipo9	115951	0	0	0	16	79	0,00074303	0	0	0	9	18	0,00030305
Ipo7	119357	0	0	0	3	6	0,0000566	0	0	0	2	2	0,00003377

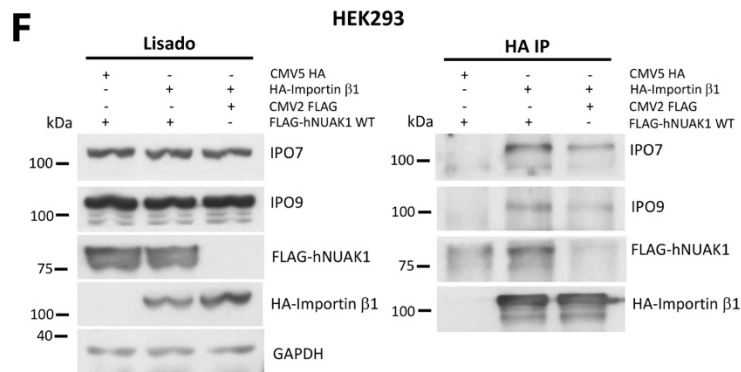
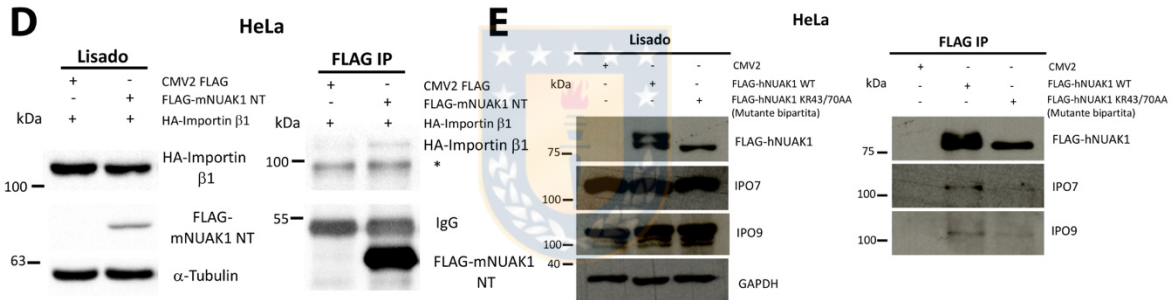
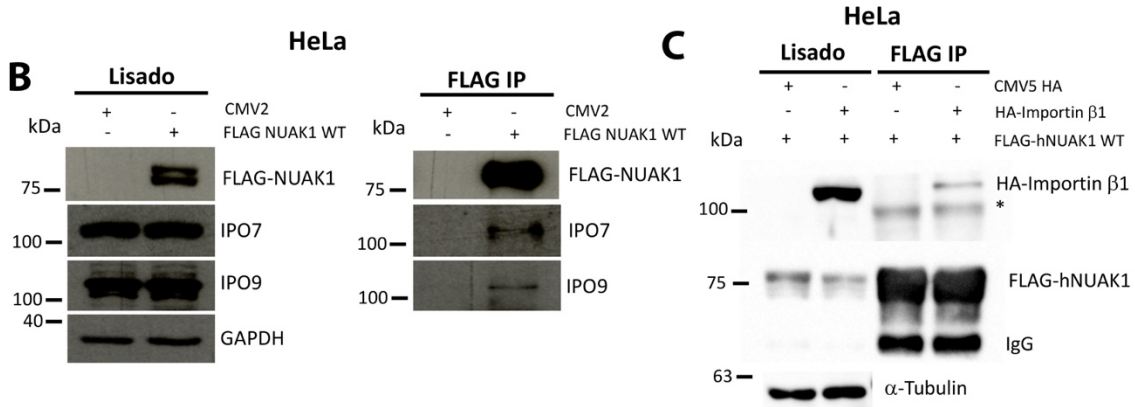


Figura 14. La Importina- β 1, IPO7 y IPO9 son nuevos interactores de NUA1. **A.-** Tabla que muestra el conteo total de péptidos (P), el conteo de la distribución espectral (dS) y la distribución del factor de abundancia espectral normalizado (dNSAF) para cada proteína identificada en la purificación de FLAG NUA1 WT murino (n=3). EN: Extracto nuclear, EC: Extracto citoplasmático. **B.-** Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT expresada en células HeLa y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de IPO7 y IPO9. **C.-** IP de FLAG-hNUAK1 WT co-expresada con HA-importina β 1 (Co-IP) en células HeLa. **D.-** IP de HA-importina β 1 co-expresando con FLAG-hNUAK1 NT (CoIP) en células HeLa. GAPDH y α -tubulina fueron usados como control de carga de los lisados. * Banda no específica. **E.-** IP de FLAG-hNUAK1 WT o FLAG-hNUAK1 KR43/70AA expresadas en células HeLa y CoIP de IPO7 y IPO9. **F.-** IP de HA-importina β 1 y CoIP de FLAG-hNUAK1 WT, IPO7 y IPO9 en células HEK293. Fuente: Elaboración propia.



Basado en estas evidencias evaluamos si el importe nuclear de NUAK1 depende de la actividad de las importinas- β . Para ello, células HeLa fueron tratadas con importazole (IPZ) un inhibidor específico de las importinas- β , siendo la inhibición de la importina- β 1 la más caracterizada (Soderholm y col., 2011). Derivado de estos experimentos células no tratadas (vehículo) mantuvieron la localización nuclear de NUAK1 (Fig. 15A). La localización de NUAK1 no fue significativamente afectada por 50 μ M de IPZ (Fig. 15A). Por otro lado, 100 μ M que corresponde a altas concentraciones de IPZ fueron tóxicas e indujeron la muerte celular (Fig. 15A); sin embargo, 75 μ M de IPZ indujo la acumulación citoplasmática de NUAK1 (Figs. 15A and 15B). Así, estos resultados nos sugirieron que la actividad de la importina- β 1 es necesaria para la localización nuclear de NUAK1. Para complementar estos resultados, silenciamos específicamente a IPO7 o IPO9. Para ello, se utilizaron *shRNA*-específicos para estas importinas (Fig. 15C-D). El silenciamiento de IPO7 o IPO9 indujo la acumulación citoplasmática de NUAK1 sugiriendo que ambas son requeridas para el transporte de NUAK1 (Fig.15E-F). **En resumen, los resultados obtenidos sugirieron que las importinas- β (β 1, IPO7 y IPO9) reconocen a la SLN-bipartita de NUAK1 mediando el importe nuclear de NUAK1.**

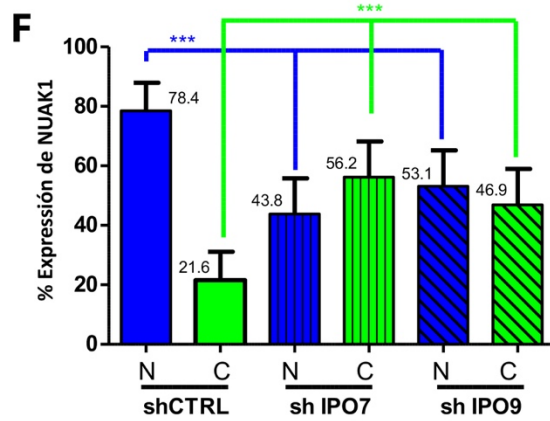
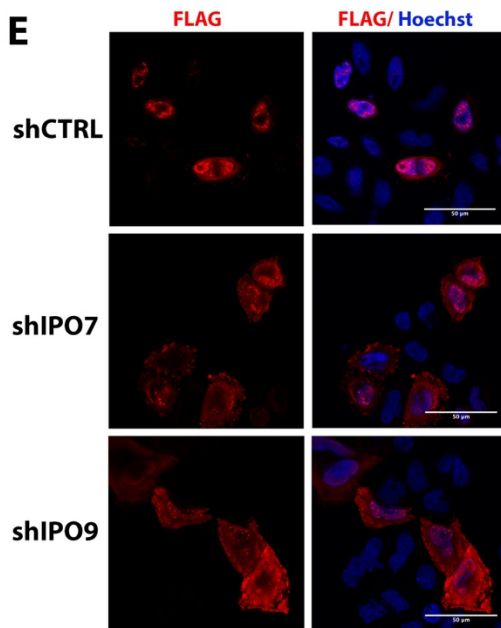
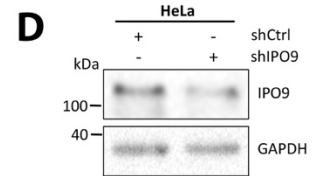
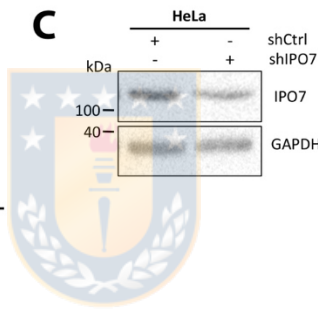
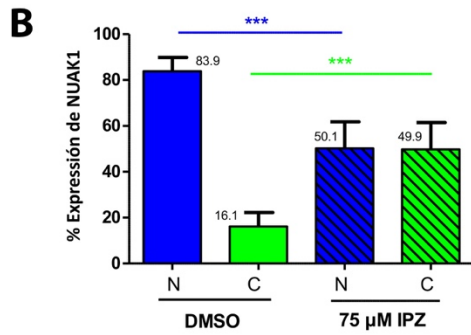
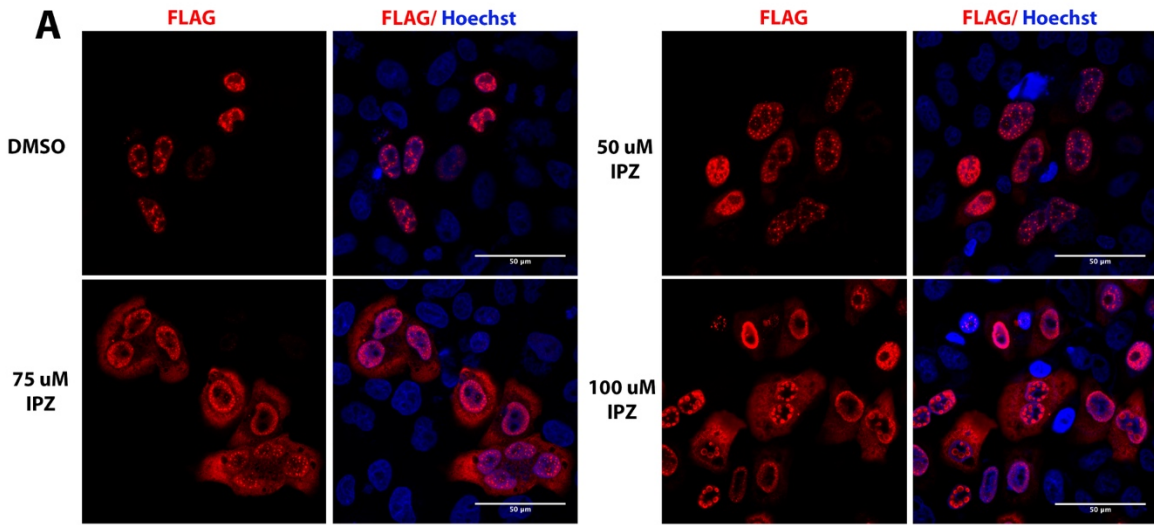


Figura 15. La Importina-β1, IPO7 y IPO9 median el importe nuclear de NUAK1. **A.-** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-hNUAK1 WT tratadas con DMSO o diferentes condiciones de Importazole (IPZ) (50, 75 and 100 μM) por 4 horas. **B.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (A). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. ***p<0.001. *Test t-student* **C.- D.-** *Western blot* del silenciamiento de IPO7 (C) o IPO9 (D) en células HeLa. **E.-** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando *shRNAs* para IPO7 y IPO9. **F.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (E), shCtrl (n=100), shIPO7 (n=100) y shIPO9 (n=100). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. ***p<0.001. *one-way ANOVA* Fuente: Elaboración propia.

4.1.3.- Resumen de los principales logros obtenidos en el Objetivo 1.

Como objetivo 1 se propuso determinar el mecanismo molecular que regula la localización sub-celular de la quinasa NUAK1. Derivado del uso de predicciones bioinformáticas, la generación de **varias delecciones y mutantes de NUAK1 murino y humano se logró identificar una SLN-clásica del tipo bipartita responsable de la localización nuclear de NUAK1** (Fig.16) (Palma y col., 2019). Complementario a lo anterior, para completar el mecanismo molecular se realizaron análisis de espectrometría de masas (*MudPIT*), ensayos de Co-inmunoprecipitación, el uso de inhibidores (IPZ) y *shRNAs* específicos para IPO7 o IPO9 (Palma y col., 2019). **Estas estrategias experimentales nos permitieron determinar 3 nuevos interactores de NUAK1 responsables de su importe nuclear.** Estos datos en su conjunto aportaron nuevas evidencias involucradas en la **regulación de NUAK1** (Fig.16). Debido a que NUAK1 presenta una localización en el núcleo y/o citoplasma que depende del tipo celular y los tejidos evaluados (Fig. 8), nos resultó de gran interés identificar el/los contextos celulares que afectan la localización sub-celular de NUAK1 y por ende la función de esta quinasa dependiente de su localización (Fig.16). Es por ello que adicional a los objetivos propuestos

se planteó un nuevo sub-objetivo 1 que buscó determinar el/los contextos celulares que afectan la localización sub-celular de NUAK1.

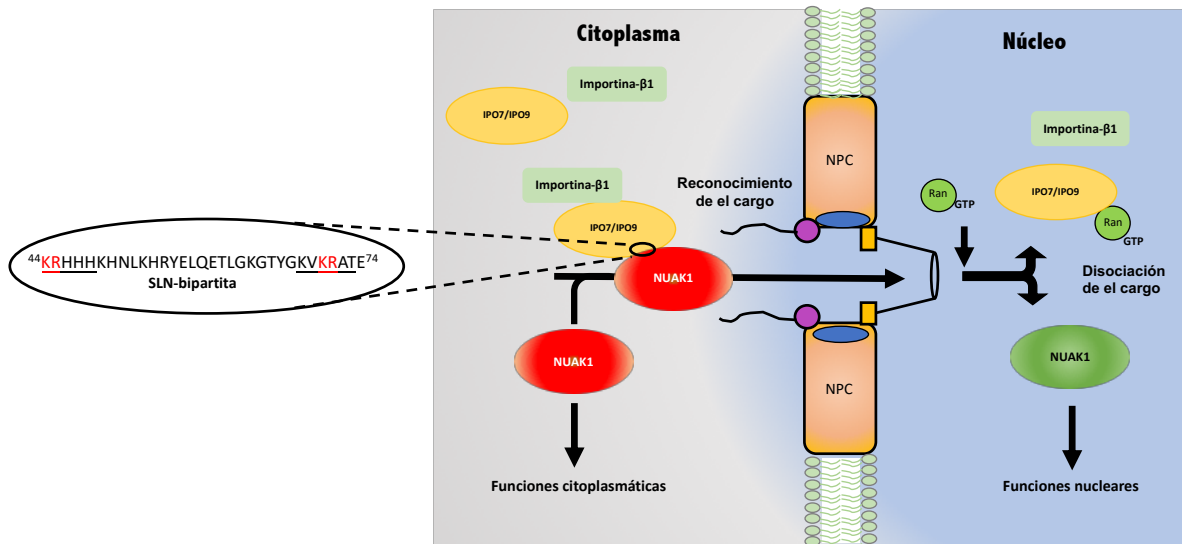


Figura 16. Modelo del mecanismo molecular que media el importe nuclear de la quinasa NUAK1. NUAK1 tiene una SLN-bipartita clásica en la región N-terminal y las importinas-β (importina-β1, IPO7 y IPO9) son necesarias para su importe al núcleo. Fuente: Elaboración propia.

4.1.4.- Experimentos adicionales del objetivo 1: Determinar el/los contextos celulares que afectan la localización sub-celular de NUAK1.

Existen evidencias que tanto factores intrínsecos como extrínsecos afectan la localización sub-celular de proteínas y por ende su función. Esta idea nos llevó a **complementar el Objetivo 1** evaluando si algún contexto celular (intrínsecos y/o extrínsecos) afecta la localización sub-celular de NUAK1. Dentro de los factores extrínsecos que afectan el importe nuclear se encuentran el **estrés oxidativo, calor y etanol entre otros** (Kodiha y col., 2004; Stochaj y col., 2000). Adicionalmente, los factores intrínsecos como el contexto genético afecta la expresión de las importinas en diversos tejidos, líneas celulares e incluso en cánceres (van der Watt, Ngarande, & Leaner, 2011). Así, la sobre-expresión y/o silenciamiento de las importinas altera la homeostasis en el transporte núcleo-

citoplasma, promoviendo diversas enfermedades donde destacan las neurodegenerativas y el cáncer (Da Cruz & Cleveland, 2016; Y. H. Kim, Han, & Oh, 2017).

4.1.4.1.- El estrés oxidativo induce la acumulación citoplasmática de NUAK1.

Es importante destacar que existen estudios previos que han determinado que la actividad quinasa de NUAK1 es regulada por estrés oxidativo y privación de glucosa (Suzuki y col., 2003a, Port y col., 2018). Por lo tanto, evaluamos si el estrés oxidativo y/o la privación de glucosa además de activar a NUAK1 afecta su localización sub-celular. Para ello, células HeLa fueron tratadas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (500 μ M, 750 μ M and 1000 μ M). Derivado de estos datos determinamos que el tratamiento con 1000 μ M de H_2O_2 promovió la acumulación citoplasmática de NUAK1 (Fig. 17A). Para corroborar si el efecto de H_2O_2 en la acumulación citoplasmática de NUAK1 depende del estrés oxidativo inducido por el tratamiento con H_2O_2 , células Hela fueron tratadas con H_2O_2 y además con el antioxidante Trolox. El tratamiento con Trolox (500 μ M) revirtió completamente la acumulación citoplasmática de NUAK1 (Fig. 17B-C), **sugiriendo que además de inducir la actividad quinasa de NUAK1 el estrés oxidativo induce su acumulación en el citoplasma**. Estos datos resultaron de gran importancia ya que nos generaron nuevas interrogantes asociadas a como se conecta la regulación de NUAK1 con su función. Una de ellas fue evaluar si existen otros contextos celulares que pueden regular la localización sub-celular de NUAK1 al igual que el estrés oxidativo.

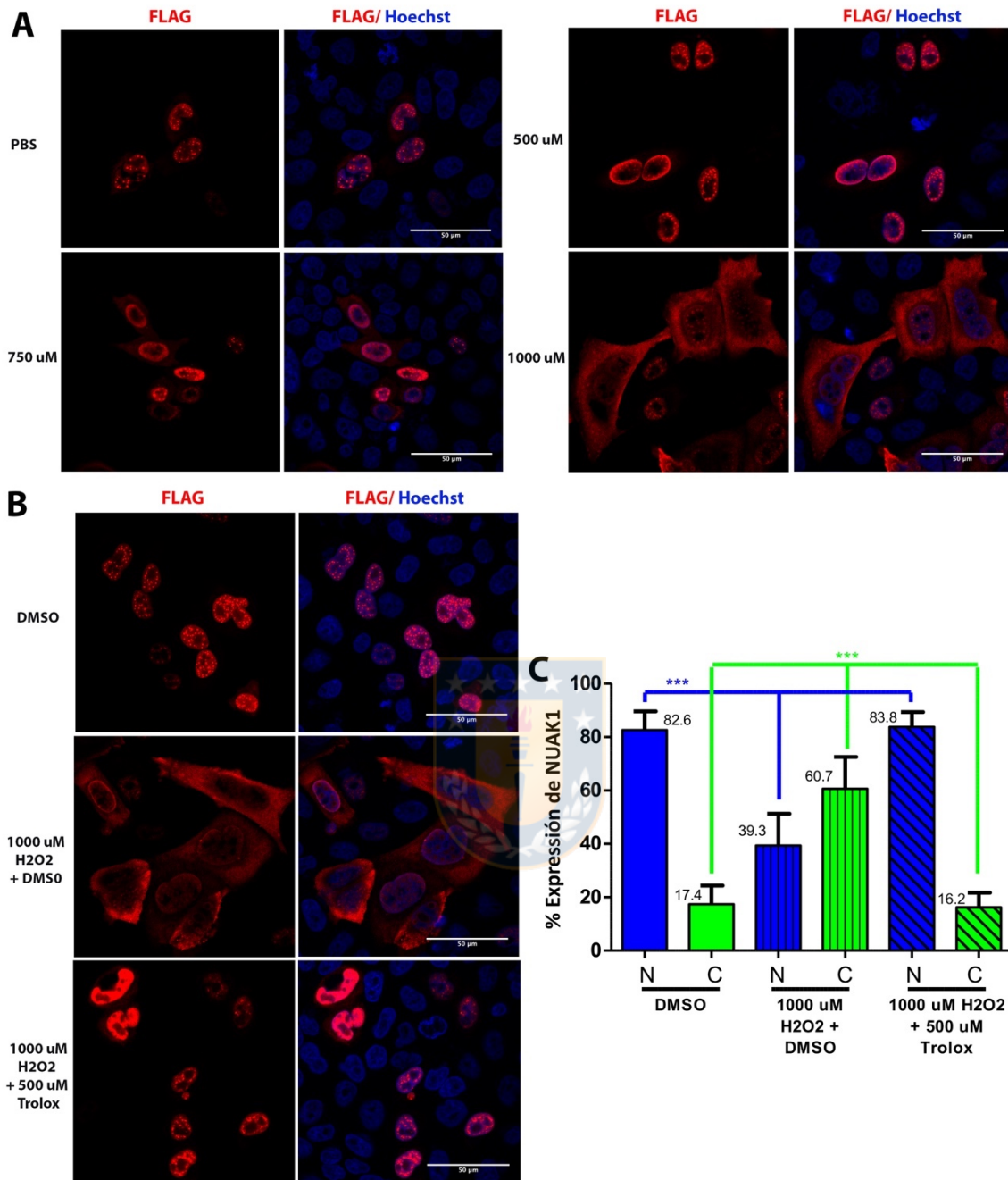


Figura 17. El estrés oxidativo induce la acumulación citoplasmática de NUAK1. A.- Imágenes de microscopía confocal expresando FLAG-hNUAK1 WT tratadas con diferentes concentraciones de **peróxido de hidrógeno** (H₂O₂) (500, 750 y 1000 μM) por 2 horas. **B.-** Imágenes de microscopía confocal expresando FLAG-hNUAK1 WT tratadas con DMSO, 1000 μM H₂O₂ + DMSO, y 1000 μM H₂O₂ + 500 μM Trolox por 2 horas. **C.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (B). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. * ***p<0.001. one-way ANOVA. Fuente: Elaboración propia.

Basado en la idea anterior y considerando que la privación de glucosa puede inducir estrés oxidativo y también activar a NUA1 (Suzuki y col., 2003a), evaluamos si la privación de glucosa induce cambios en la localización sub-celular de NUA1. La privación de glucosa en células HeLa también indujo la acumulación de NUA1 en el citosol (Fig. 18). Por lo tanto, evaluamos si este efecto era mediado por el estrés oxidativo inducido por este tipo de estrés. Para ello, nuevamente se utilizó el antioxidante Trolox. Al igual que los resultados obtenidos frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno, la privación de glucosa y el tratamiento con Trolox (500 μ M) revirtió completamente la acumulación citoplasmática de NUA1 (Fig. 18C-D). **En resumen, los resultados obtenidos nos sugirieron que la localización sub-celular de NUA1 y su actividad son regulados en respuesta a un incremento en los niveles de estrés oxidativo.**



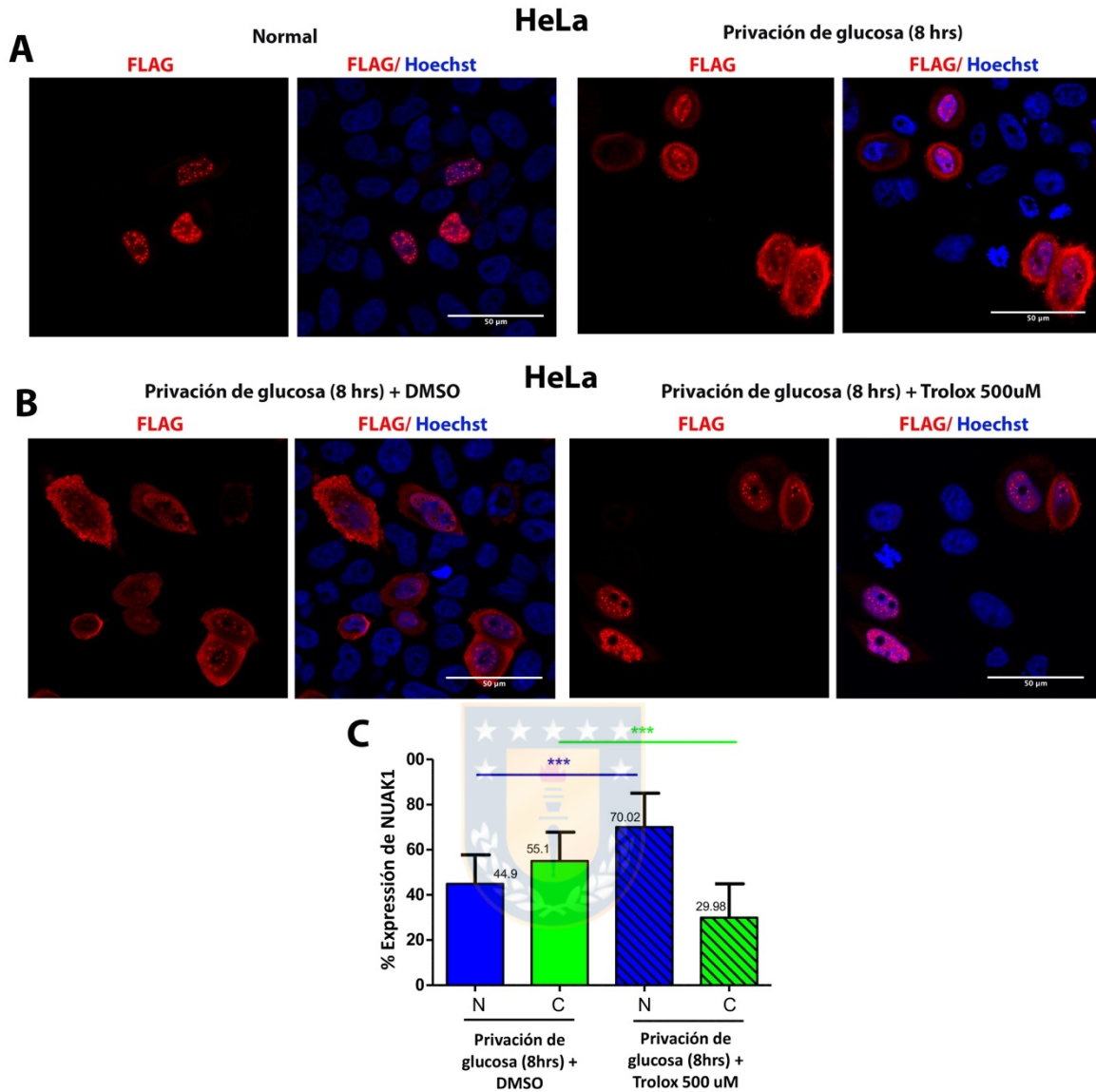


Figura 18. La privación de glucosa promueve la acumulación citoplasmática de NUAK1. **A.-** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-hNUAK1 WT sometidas a 8 horas de privación de glucosa. **B.-** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa expresando FLAG-hNUAK1 WT sometidas a 8 horas de privación de glucosa y el tratamiento con el antioxidante Trolox (500 μ M) (8 horas). **C.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (B). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. *** $p < 0.001$. *t-student*. Fuente: Elaboración propia.

4.1.4.2.- Correlación entre la expresión de NUA1/IPO7 y NUA1/IPO9 dependiendo del tipo de cáncer, posibles implicancias en la localización sub-celular de NUA1.

Con respecto a la participación de algún factor intrínseco que regule la localización sub-celular de NUA1 es importante destacar que no existen evidencias de este tipo de regulación, sin embargo, el contexto genético puede ser de vital importancia en esta área. Focalizándonos en lo anterior, las células HeLa carecen de la expresión de LKB1 uno de los principales activadores de NUA1. Con respecto a lo anterior, evidencias previas determinaron que la reconstitución de LKB1 WT (*wild-type*), pero no de la quinasa muerta (LKB1 KD), indujo una leve acumulación citoplasmática de SIK1, otra quinasa miembro de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK (Al-Hakim y col., 2005). A pesar de ello, esta evidencia requiere de mayores estudios. Adicionalmente, nos planteamos la hipótesis que el contexto genético y/o la expresión de las importinas podría regular la localización sub-celular de NUA1.

Para evaluar esta idea se utilizaron predicciones bioinformáticas analizando la expresión de las importinas que interaccionan y median el importe de NUA1 al núcleo y su correlación con la expresión de NUA1. Para estos estudios de correlación se consideró el tipo de cáncer y la localización sub-celular de NUA1 (Cáncer de colón: principalmente núcleo (Fig. 8B, 8E); Cáncer de mama: principalmente citoplasma (Fig. 8 D-F). En esta área determinamos una **correlación positiva** entre la expresión de NUA1-IPO7 y NUA1-IPO9 en adenocarcinoma de colón (Fig. 19A-B), lo que se correlacionó con la localización nuclear de NUA1 en células de cáncer de colón (Fig. 8B, 8E). Contrario a lo anterior, determinamos una **correlación negativa** entre la expresión de NUA1-IPO7 y NUA1-IPO9 en metástasis de colón y cáncer de mama invasivo, respectivamente (Fig. 19C-D).

Estas evidencias coinciden con la localización citoplasmática de NUA1 en las células de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231 (Fig. 8D-F). Por lo tanto, basado en lo anterior postulamos que la expresión de la importinas, IPO7 y/o IPO9 **podría** estar involucrada en cambios de la distribución sub-celular de NUA1 dependiendo el tipo de cáncer.



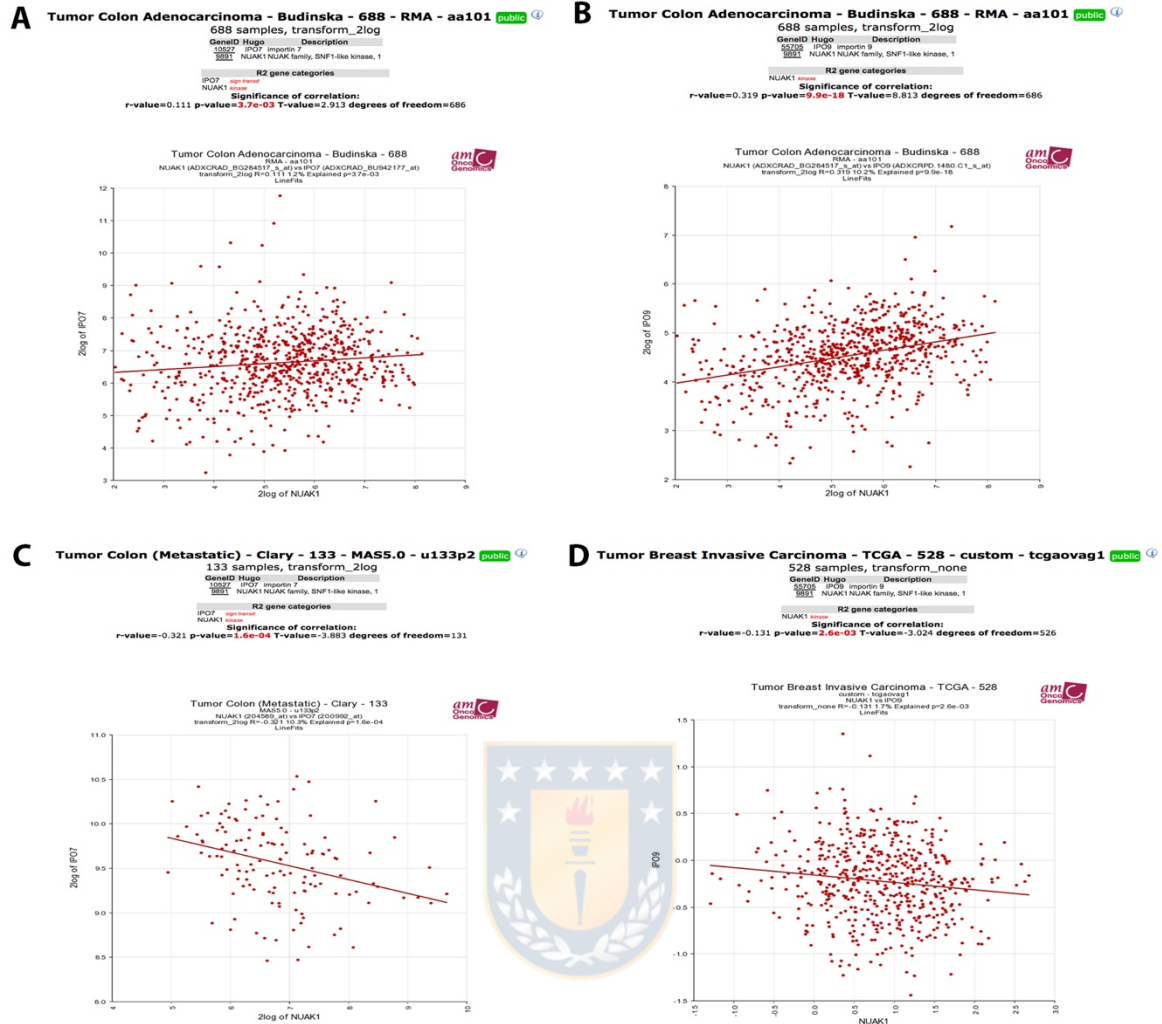


Figura 19. Correlación entre la expresión de NIAK1-IPO7 y NIAK1-IPO9 en cáncer.
A.- Análisis de correlación entre la expresión de NIAK1 y IPO7 en colon adenocarcinoma. (n=688, $p=3.7e^{-3}$). **B.-** Análisis de correlación entre la expresión de NIAK1 y IPO9 en colon adenocarcinoma. (n=688, $p=9.9e^{-18}$). **C.-** Análisis de correlación entre la expresión de NIAK1 y IPO7 colon adenocarcinoma metastásico. (n=133, $p=1.6e^{-4}$). **D.-** Análisis de correlación entre la expresión de NIAK1 y IPO9 en carcinoma de mama invasivo (n=528, $p=2.6e^{-3}$). Todos los análisis fueron realizados en *R2 database*: <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>. Fuente: Elaboración propia.

4.1.4.3.- Experimentos adicionales del objetivo 1: NUA1 citoplasmático promueve la migración celular.

Como se describió anteriormente, para varias proteínas cambios de su distribución sub-celular alteran sus funciones (Huangyang & Simon, 2018). Dentro de las principales funciones descritas para NUA1 se encuentra promover la migración celular, la invasión y la metástasis (Bell y col., 2014; Chen y col., 2013; Lu y col., 2013a; Obayashi y col., 2016). Sin embargo, aún se desconoce si estas u otras funciones de NUA1 son dependientes de su localización sub-celular. Para evaluar si el efecto de NUA1 en la migración celular depende de una localización sub-celular específica de NUA1 (núcleo y/o citoplasma), generamos modelos celulares estables en células MEFs que expresen mayoritariamente a NUA1 en diferentes compartimentos celulares. Para ello, FLAG-mNUA1 WT (núcleo), la mutante del motivo mayor FLAG-mNUA1 KR71AA (núcleo-citoplasma) y la mutante bipartita FLAG-mNUA1 KR44/71AA (citoplasma) fueron sub-clonados en el plásmido **pBP FLAG** que fue generado previamente (datos no se muestran). Los nuevos plásmidos generados fueron: **pBP FLAG-mNUA1 WT**, **pBP FLAG-mNUA1 KR71AA** y **pBP FLAG-mNUA1 KR44/71AA**, estos fueron utilizados junto a un sistema de empaquetamiento de primera generación para generar los modelos estables: **MEF pBP FLAG-mNUA1 WT**, **MEF pBP FLAG-mNUA1 KR71AA** y **MEF pBP FLAG-mNUA1 KR44/71AA** (Fig. 20A). La migración celular fue evaluada utilizando dos técnicas; **ensayo de cierre de herida (Fig. 20B)** y **ensayo de *transwell* (Fig. 20C)**. Los resultados obtenidos en el ensayo de cierre de herida determinaron que la mutante bipartita que se localiza principalmente en el citosol induce un mayor porcentaje de migración comparado con los otros modelos (Fig. 20D-G). Estos resultados fueron validados a través del ensayo de *transwell* (Fig. 20H). En resumen, estos datos son la primera evidencia que asoció la localización sub-celular de NUA1 con sus funciones. A pesar de ello, es necesario determinar nuevas funciones y/o mecanismos moleculares cómo NUA1 promueve la progresión tumoral.

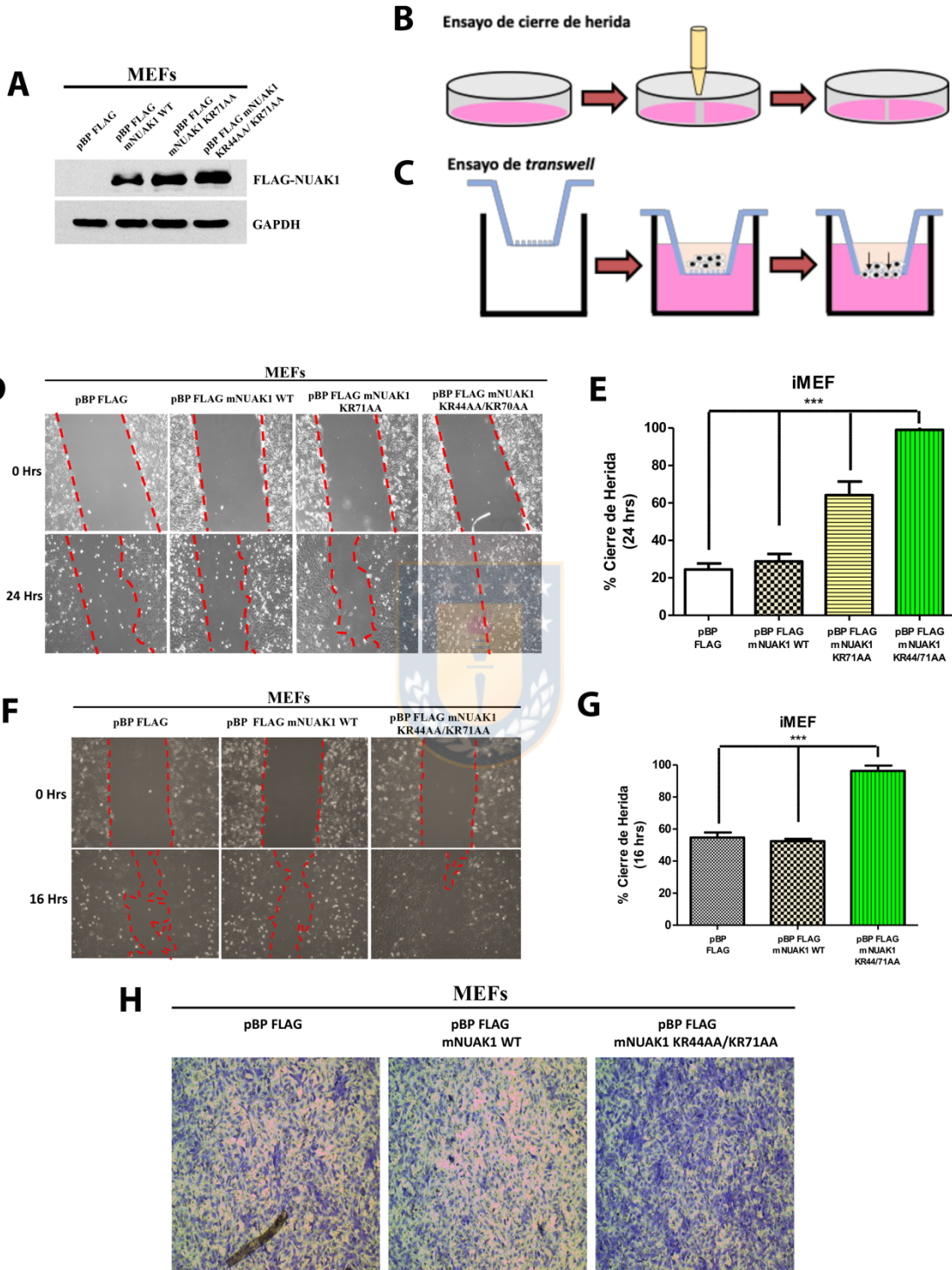


Figura 20. NUAK1 citoplasmático induce la migración celular. **A.-** *Western Blot* de la validación de la expresión estable de pBP FLAG, pBP FLAG-mNUAK1 WT, pBP FLAG-mNUAK1 KR71AA y pBP FLAG-mNUAK1 KR44/71AA en células iMEF. **B-C.-** Representación esquemática del ensayo de cierre de herida (B) y el ensayo de *transwell* (C). **D.-** Ensayo de cierre de herida realizado en células MEF que expresan pBP FLAG, pBP FLAG-mNUAK1 WT, pBP FLAG-mNUAK1 KR71AA y pBP FLAG-mNUAK1 KR44/71AA. **E.-** Cuantificación de las condiciones en (D). *one-way ANOVA*. **F.-** Ensayo de cierre de herida realizado en células MEF que expresan pBP FLAG, pBP FLAG-mNUAK1 WT y pBP FLAG-mNUAK1 KR44/71AA. **G.-** Cuantificación de las condiciones en (F). *one-way ANOVA*. **H.-** Ensayo de *transwell* realizado en células MEF que expresan pBP FLAG, pBP FLAG-mNUAK1 WT y pBP FLAG-mNUAK1 KR44/71AA. Fuente: Elaboración propia.

4.1.4.4.- Resumen de los principales logros obtenidos en los experimentos adicionales del objetivo 1.

Los datos obtenidos de los experimentos adicionales permitieron complementar el objetivo 1. En estos experimentos se buscó determinar si el contexto celular regula la localización sub-celular de NUAK1. Evidencias previas determinaron que el estrés oxidativo y la privación de glucosa inducen la actividad quinasa de NUAK1. Basado en nuestros datos identificamos que el estrés oxidativo generado por peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y por la privación de glucosa indujo la localización citoplasmática de NUAK1 lo que podría estar directamente asociado a inducir la actividad de NUAK1 y sus funciones citoplasmáticas para disminuir el estrés oxidativo y promover la supervivencia celular. **En resumen, nuestros resultados determinaron que no solo la actividad de NUAK1 es regula por el estrés oxidativo, sino que la localización sub-celular también es afectada (Fig. 21)** (Palma y col., 2019). Complementario a lo anterior, identificamos que la expresión de la importinas-β (IPO7 y IPO9) podrían estar involucradas en la regulación de la localización de NUAK1. En su conjunto, además de identificar el mecanismo molecular que media el importe de NUAK1 al núcleo proponemos que diferentes **contextos celulares** ya sea intrínsecos y/o

extrínsecos pueden alterar el transporte de NUA1, lo que podría estar directamente relacionado con promover funciones específicas de NUA1 dependiendo de su localización sub-celular (Fig. 21). En esta área utilizando las herramientas generadas en el objetivo 1 determinamos que NUA1 citoplasmático induce la migración celular, sustentando la idea que la localización sub-celular de NUA1 es crucial para promover su función. Por lo tanto, en el siguiente objetivo se buscó identificar diferentes interactores nucleares y citoplasmáticos de NUA1 y así poder identificar nuevas funciones de esta quinasa dependientes de su localización sub-celular.

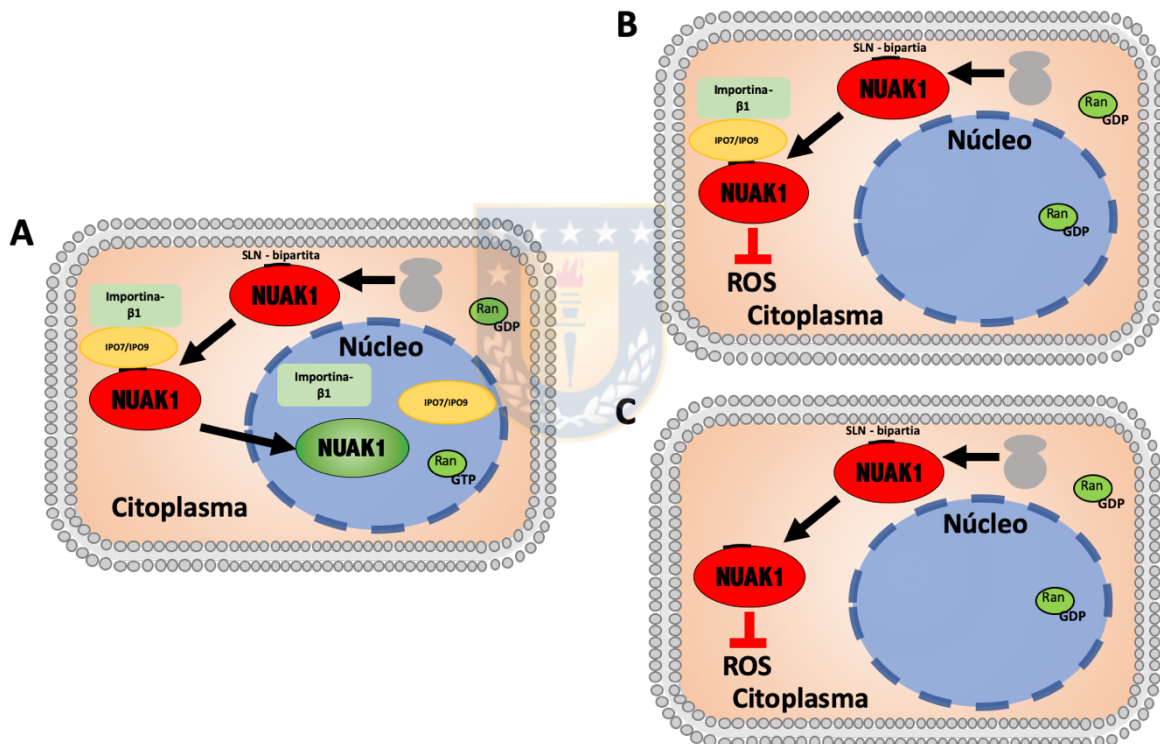


Figura 21. El contexto celular determina la localización sub-celular de NUA1. A.- En células HeLa bajo condiciones normales de cultivo la quinasa NUA1 es traducida en el citosol y luego importada al núcleo a través de un mecanismo de transporte activo previamente descrito. B.- La exposición y/o inducción de factores extrínsecos como el estrés oxidativo y la privación de glucosa inducen la acumulación citoplasmática de NUA1 en células HeLa. C.- Factores intrínsecos como el silenciamiento o sobre-expresión de algunas importinas también podrían afectar la localización sub-celular de NUA1. Fuente: Elaboración propia.

4.2.- Objetivo 2: Determinar nuevos interactores nucleares y citoplasmáticos de NUA1 que estén asociados a promover la progresión tumoral.

Las evidencias entregadas en el **objetivo 1** determinaron un nuevo mecanismo molecular y contextos celulares involucrados en la **regulación de la localización sub-celular** de la quinasa NUA1. Estos resultados a su vez sustentaron la idea de la existencia de mecanismos moleculares y/o funciones de NUA1 dependientes de su localización sub-celular. Para determinar estos potenciales nuevos mecanismos se utilizó la técnica de **espectrometría de masas conocida como MudPIT** (*Multidimensional protein identification technology*). Cabe destacar que actualmente se han descrito solo **6** interactores-blancos de NUA1 (Suzuki y col., 2003a, Zagórska y col., 2010). Por lo tanto, la finalidad de este objetivo fue determinar nuevos interactores de la quinasa NUA1 en el núcleo y/o citosol y así poder determinar nuevos mecanismos moleculares involucrados en promover la tumorigénesis.



4.2.1.- Objetivo 2.1: Determinar nuevos interactores de NUA1 a través de la técnica de MudPIT.

Para identificar nuevos interactores de la quinasa NUA1 dependientes de su distribución sub-celular (núcleo-citoplasma) se utilizó la técnica MudPIT (Fig. 22). Esta técnica tiene una gran sensibilidad debido a una alta resolución y separación de los péptidos, lo que favorece su detección e identificación (Washburn, Wolters, & Yates III, 2001). Como modelo celular se utilizaron **células MEF** ya que presentan un origen embrionario y un contexto genético normal. Debido a estas características es que las células MEF han representado un buen modelo para estudios iniciales de la progresión tumoral (ciclo celular, senescencia, transformación celular, etc) (Zhu y col., 1991). Utilizando estas células se generaron los modelos estables: **MEF pBP FLAG, MEF pBP FLAG-mNUAK1 WT y MEF FLAG-mNUAK1 KR44/71AA** (Fig. 22A). Para generar estos modelos

a diferencia de los utilizados en los experimentos de migración celular se estandarizó un **nuevo protocolo** cuya finalidad fue obtener niveles de expresión de NUA1 similares a los endógenos (Fig. 22A). También se consideró la adición del epítoto **FLAG** a NUA1 WT y NUA1 KR44/771AA (ver materiales y métodos) lo que permitió aumentar la eficiencia de la purificación y también su detección. La validación de la expresión de FLAG-mNUA1 WT (Fig. 22B) y FLAG-mNUA1 KR44/71AA (datos no se muestran) se realizó a través de *western blot*. **En general, las estrategias utilizadas fueron adoptadas con la finalidad de mejorar la purificación y disminuir los falsos positivos.** Para la purificación de FLAG-mNUA1 se utilizaron células en condiciones normales (pBP FLAG (control), FLAG-mNUA1 WT y FLAG-mNUA1 KR44/71AA) (Fig. 22C) y sometidas a la ausencia de suero (pBP FLAG (control) y FLAG-mNUA1WT) (Fig. 22D). Derivado de estas condiciones se obtuvieron las fracciones nucleares y citoplasmáticas de cada condición a través del fraccionamiento sub-celular (Fig.22 C-D). Este fraccionamiento permitió el enriquecimiento de cada fracción para luego realizar la inmunoprecipitación de FLAG-mNUA1 utilizando la resina anti-FLAG (M2) (Fig. 22C-D).

En total se realizaron **4 purificaciones en condiciones normales utilizando pBP-FLAG como control, FLAG-mNUA1 WT y FLAG-mNUA1 KR44/71AA (Fig.22C) y 3 purificaciones en ausencia de suero utilizando pBP-FLAG como control y FLAG-mNUA1 WT (Fig. 22D).** Después de realizar las purificaciones y antes de enviar las muestras para la espectrometría de masas se debió validar la calidad de cada purificación utilizando; **tinción de plata y Western blots** (Fig. 22E-F – Anexo fig. 4). Una vez validadas (7 en total) las muestras fueron precipitadas con TCA y luego corridas en el espectrómetro de masas (ver materiales y métodos 3.2.9). El análisis de las muestras y de los datos obtenidos fue realizado por el centro de proteómica de *Stowers institute for Medical Research* (ver materiales y métodos 3.2.9) (Fig. 23A).

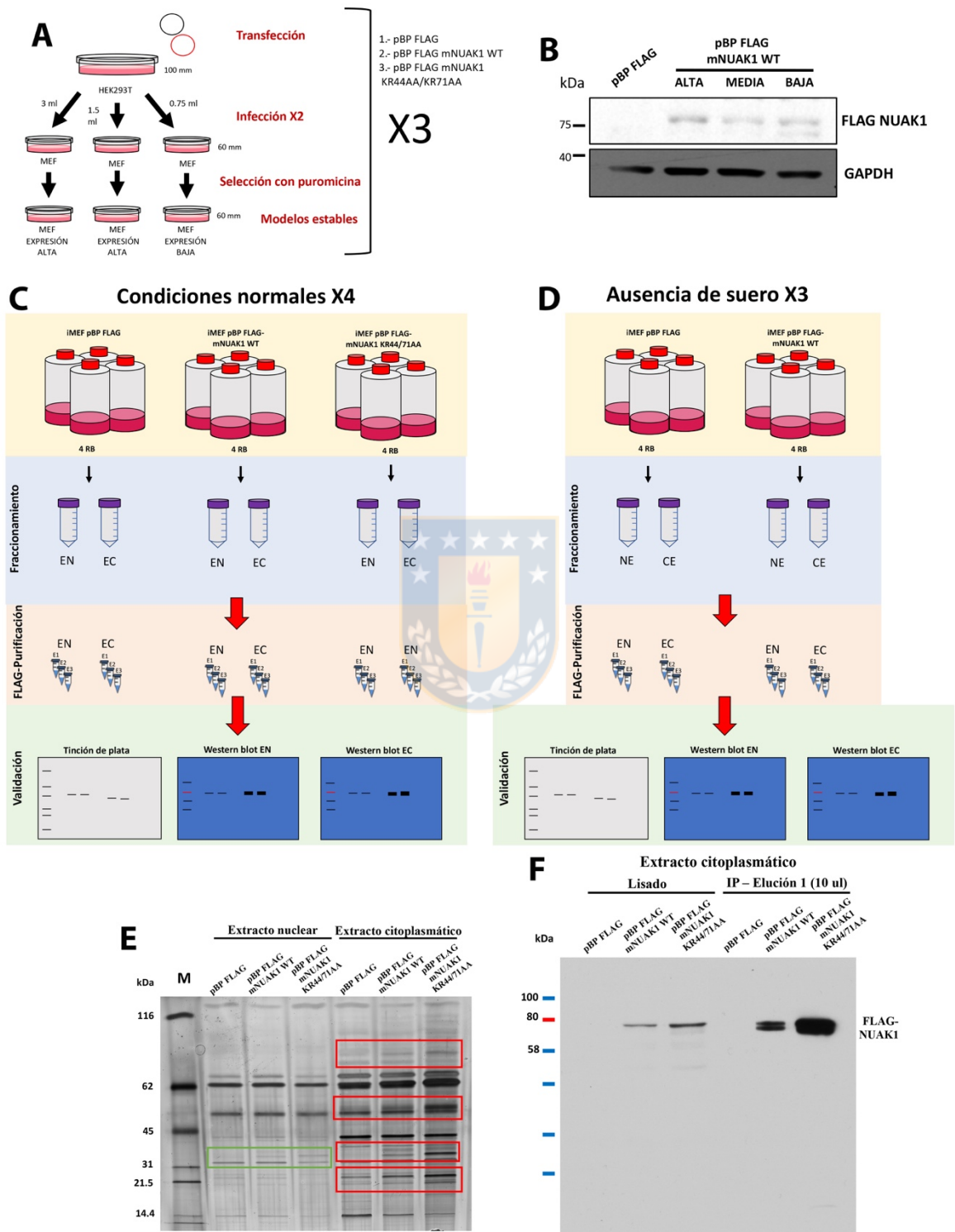


Figura 22. Diseño experimental y purificación de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA en condiciones normales y en estrés. **A.-** Esquema resumen del protocolo utilizado para generar los modelos estables que expresaron FLAG-mNUAK1 en bajos niveles de expresión. **B.-** *Western blot* de la validación de los modelos estables (A). **C-D.-** Esquema del diseño experimental utilizado para la purificación de FLAG-mNUAK1 en condiciones normales (C) y de estrés (D). **E.-** Tinción de plata de la purificación de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA en condiciones normales utilizando 10 μ l de la elución 2. **F.-** *Western blot* de la purificación del extracto citoplasmático de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA en condiciones normales utilizando 10 μ l de la elución 1. Fuente: Elaboración propia.

En resumen, de las 4 purificaciones en condiciones normales se determinaron **86 potenciales nuevos interactores directos o indirectos de NUAK1**. 11 de ellos son potenciales interactores exclusivos del núcleo, 38 exclusivos del citosol y los 37 restantes fueron detectados en ambas fracciones (núcleo-citoplasma) (Fig. 23B). Con respecto a la purificación en ausencia de suero el número de potenciales interactores disminuyó, identificando 44 potenciales interactores de NUAK1, 10 exclusivos del núcleo, 13 exclusivos del citoplasma y 21 entre el núcleo-citosol (Fig. 23C). Esta disminución en los interactores se debió principalmente a que los niveles de expresión de FLAG-mNUAK1 WT disminuyeron frente a la ausencia de suero (datos no se muestran). A pesar de ello, existieron diferencias significativas entre el purificado de FLAG-mNUAK1 WT y su respectivo control. Debido al alto número de potenciales interactores detectados es importante destacar que estos pueden ser **interactores directos o indirectos**. Por lo tanto, se realizaron análisis bioinformáticos para identificar y/o clasificar los potenciales interactores y así poder priorizar cual o cuales validar.

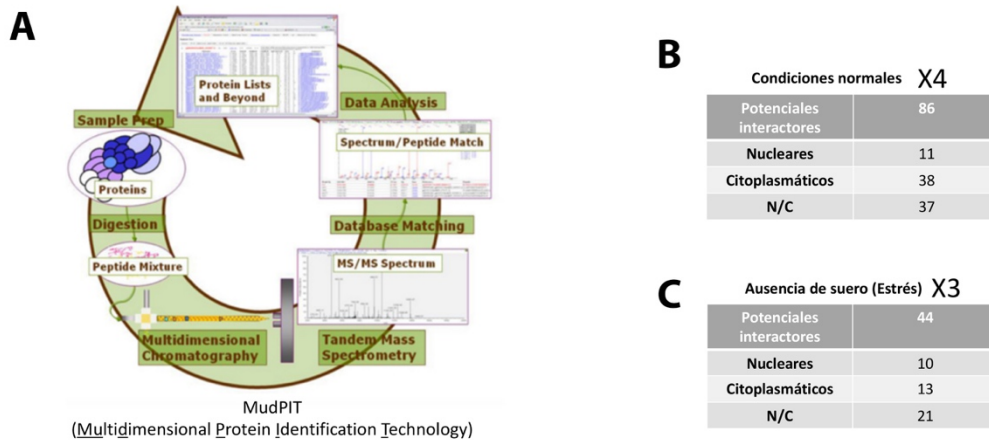


Figura 23. Resumen de los resultados obtenidos en los análisis de MudPIT. A.- Esquema resumen de la técnica de MudPIT. **B.-** Resultados de los potenciales interactores de NUAK1 en condiciones normales (n=4). **C.-** Resultados de los potenciales interactores de NUAK1 en ausencia de suero (n=3). Fuente: Elaboración propia.

4.2.2.- Objetivo 2.2: Identificar y clasificar los potenciales interactores y/o blancos de NUAK1 asociados a la progresión tumoral.

Para clasificar los potenciales interactores y agruparlos según su función y potencial relación con la tumorigénesis se realizaron análisis ontológicos de las diferentes purificaciones de NUAK1 (normales y en ausencia de suero). Estos análisis fueron realizados en el servidor; *Topppgene*, utilizando en una primera instancia los datos de las purificaciones en condiciones normales. Los análisis se realizaron utilizando **3 categorías: i) Funciones moleculares, ii) Vías de señalización y iii) Enfermedades**. Con respecto a las funciones moleculares identificadas para los potenciales interactores de NUAK1 se encuentra principalmente **proteínas que unen al ARN** (Fig. 24A). La principal vía de señalización en la que participan los potenciales interactores fue **la conversión de glucosa a acetil-CoA** (Fig. 24B). Por último, las enfermedades en las que participan los interactores de NUAK1 **coinciden** con las que ya han sido descritas para esta quinasa, destacando **la progresión tumoral**, miopatías y arterosclerosis (Fig. 24C). En el caso de los potenciales interactores en condiciones de estrés las potenciales nuevas funciones de NUAK1 se

mantienen (datos no se muestran). Estos análisis en su conjunto resultaron ser de gran importancia para sugerir nuevas funciones y procesos celulares afectados por la quinasa NUAK1, lo que ayudó a acotar y facilitar la elección de los interactores a validar. En resumen, derivados de los datos obtenidos podemos sugerir **dos nuevas funciones de NUAK1** determinadas a través de los potenciales interactores. Cabe destacar que ninguna de ellas ha sido previamente descrita ni estudiada como una función de NUAK1. **La primera es el potencial efecto de NUAK1 nuclear en el procesamiento del ARN (Fig. 24A) y la segunda es el potencial efecto de NUAK1 citoplasmático en el metabolismo de la glucosa (Fig. 24B).**



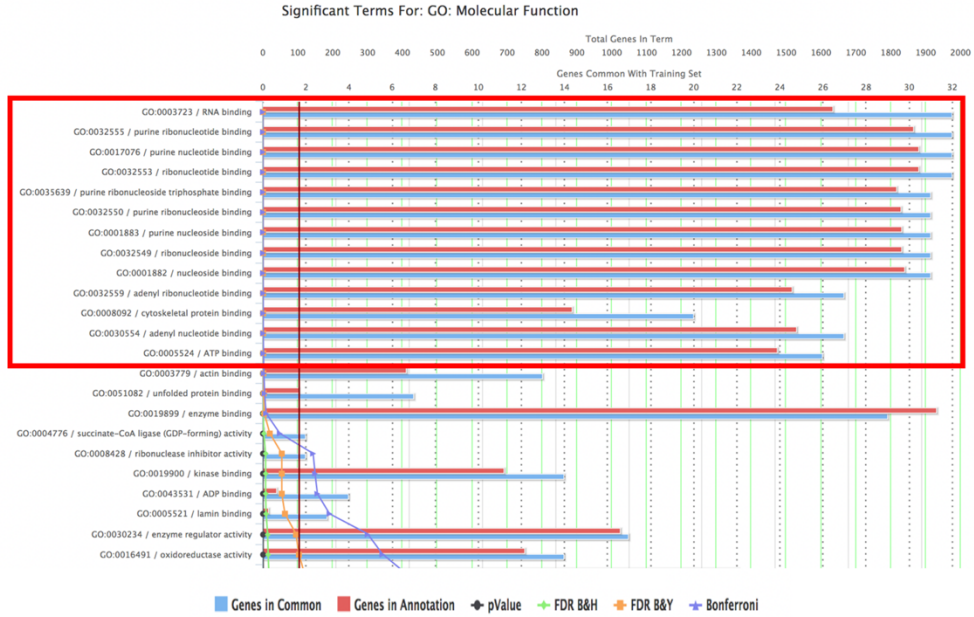
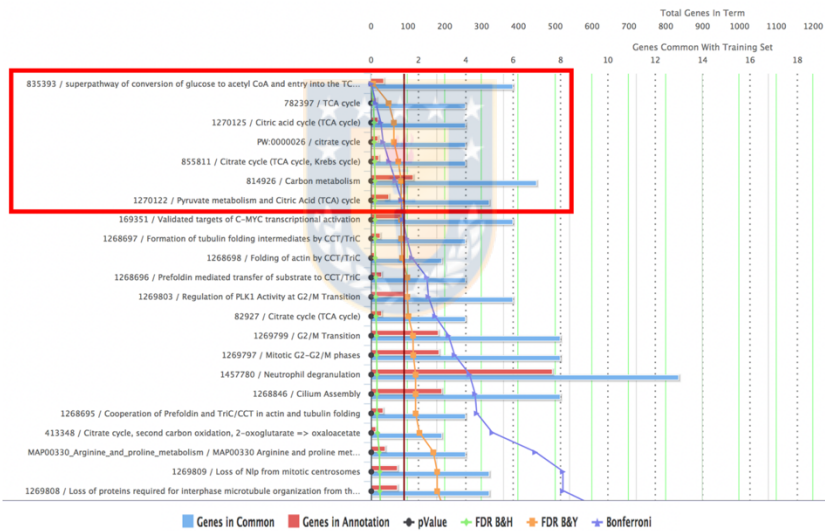
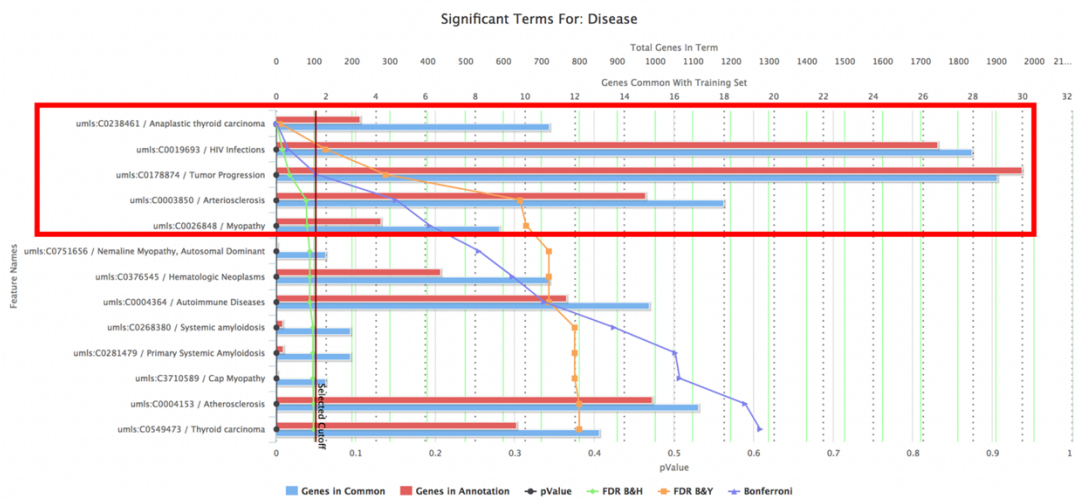
A**B****C**

Figura 24. Análisis ontológicos derivados de los análisis de espectrometría de masas.

A.- Análisis ontológicos de las funciones moleculares que tienen los potenciales interactores de NUA1. **B.-** Análisis ontológicos de las principales vías de señalización afectadas por los potenciales interactores de NUA1. **C.-** Análisis ontológicos de las principales enfermedades en las que participan los potenciales interactores de NUA1. Todos los análisis fueron realizados en *Topogene database*. Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a lo anterior los potenciales interactores asociados al procesamiento del ARN es importante destacar que fueron determinados principalmente en la **fracción nuclear** donde destacan: hnRNPU2, hnRNPK, Snrpd3 y hnRNPF (Fig. 25A). Con respecto a los potenciales interactores asociados al metabolismo de la glucosa se encuentran: GPI1, PFKP, PFKM, PFKL, PGK1, PGAM1, PKM y LDHA. Todos ellos fueron detectados principalmente en la fracción citoplasmática (Fig. 25B). **En resumen, estos datos además de sugerir nuevas funciones de NUA1 a través de sus potenciales interactores nos sugirieron que la localización sub-celular de NUA1 es crucial para promover diferentes funciones asociadas a promover la tumorigénesis** (Fig. 25C).

A

Proteins	MW	MEF FLAG (Control)						MEF FLAG-NUAK1 WT						MEF FLAG-NUAK1 KR44/71AA					
		Control-NE_P			Control-CE_P			Nuak1-WT-NE_P			Nuak1-WT-CE_P			Nuak1-KR44/71AA-NE_P			Nuak1-KR44/71AA-CE_P		
		P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF
Nuak1	73662	0	0	0	0	0	45	542	0,0317	54	1317	0,019578	53	1080	0,039253	65	2052	0,03421	
Hnrnpul2	84940	0	0	0	0	0	5	7	0,000358	0	0	0	5	7	0,0002247	0	0	0	
Hnrnpk	50976	3	4	0,00023	4	7	0,000261	5	11	0,000904	4	9	0,000188	5	10	0,0005	6	11	0,00026
Snrpd3	13916	0	0	0	2	8	0,00109	0	0	0	3	35	0,00268	0	0	0	2	6	0,0005
Hnrnpf	45730	5	18,9	0,00163	7	26,5	0,001093	8	33,3	0,003056	13	85,5	0,001991	8	49,7	0,00286	11	49,4	0,00165

B

Proteins	MW	MEF FLAG (Control)						MEF FLAG-NUAK1 WT						MEF FLAG-NUAK1 KR44/71AA					
		Control-NE_P			Control-CE_P			Nuak1-WT-NE_P			Nuak1-WT-CE_P			Nuak1-KR44/71AA-NE_P			Nuak1-KR44/71AA-CE_P		
		P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF
Nuak1	73662	0	0	0	0	0	45	542	0,0317	54	1317	0,019578	53	1080	0,039253	65	2052	0,03421	
Gpi1	62767	0	0	0	0	0	1	1	0,000069	3	4	7,01E-05	0	0	0	1	1	2E-05	
Pfkp	80151	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	0,000107	0	0	0	10	23	0,00034	
Pfkm	93247	0	0	0	2	1,29	2,649E-05	0	0	0	4	5,33	0,000061	0	0	0	16	24,8	0,00032
Pfkl	85360	0	0	0	5	7,71	0,000173	0	0	0	6	10,7	0,000134	0	0	0	12	41,3	0,00058
Pgk1	44550	2	3	0,00017	0	0	0	2	3	0,000277	9	40	0,000938	1	2	0,000115	4	6	0,00016
Pgam1	28832	1	4	0,00057	0	0	0	2	2	0,000303	8	25	0,000963	0	0	0	2	3	0,00013
Pkm	57845	3	5	0,00341	5	7	0,000231	5	7	0,000508	17	80	0,001474	2	2	9,01E-05	13	33	0,00068
Ldha	39758	1	1	0,0001	0	0	0	0	0	0	9	29	0,000786	0	0	0	2	7	0,00021

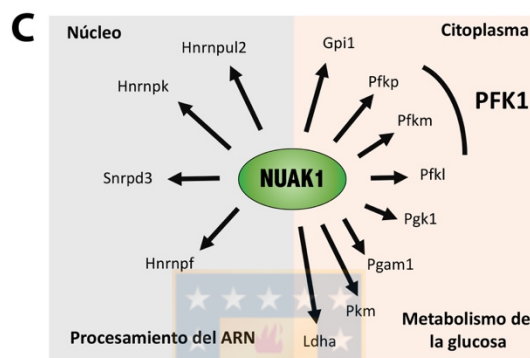


Figura 25. Resultados de los potenciales interactores involucrados en la unión del ARN y el metabolismo de la glucosa. A.- Tabla que muestra el conteo total de péptidos (P), el conteo de la distribución espectral (dS) y la distribución del factor de abundancia espectral normalizado (dNSAF) para cada proteína que tiene capacidad de unir al ARN identificada en la purificación de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA murino (n=3). EN: Extracto nuclear, EC: Extracto citoplasmático. **B.-** Tabla que muestra el conteo total de péptidos (P), el conteo de la distribución espectral (dS) y la distribución del factor de abundancia espectral normalizado (dNSAF) para cada proteína que participa en el metabolismo de la glucosa identificada en la purificación de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA murino (n=3). EN: Extracto nuclear, EC: Extracto citoplasmático. **C.-** Esquema resumen de los potenciales de NUAK1 en el núcleo asociados a el procesamiento del ARN y los citoplasmáticos asociados a la regulación del metabolismo de la glucosa. Fuente: Elaboración propia.

Complementario a lo anterior, es importante destacar que los potenciales interactores nucleares o citoplasmáticos de NUA1 pueden ser interactores directos o indirectos. En general, lo esperado es que la mayoría sean interactores indirectos debido a la gran cantidad de complejos proteicos que se forman en las células. Sin embargo, aquellos que sean interactores directos pueden ser blancos de NUA1 asociados a una función o bien interactores directos que no son blancos de NUA1 que estén involucrados en su **regulación**. Ejemplos son la importina- β 1, IPO7 y IPO9 (ver Objetivo 1). Por lo tanto, considerando estos datos además de identificar y clasificar los potenciales interactores se decidió aplicar un nuevo filtro que consideró evaluar si los potenciales interactores presentan potenciales sitios de fosforilación para la quinasa NUA1. **Estos datos nos permitieron acotar y focalizar aún más la validación de potenciales interactores y/o blancos de NUA1.**



Para ello, se generó el motivo de fosforilación de NUA1 considerando los 6 sitios o motivos de fosforilación correspondiente a los 6 blancos descritos para NUA1 (Fig. 26A). También se utilizó el servidor *phosphonetworks* (Fig. 26B) y el motivo de fosforilación obtenido por nuestros colaboradores – **RNxSF/Q/Y** (Fig. 26C). En general, todos los motivos utilizados son bastante similares lo que dio mayor confianza a nuestras predicciones. De los potenciales interactores de NUA1 que unen al ARN sólo hnRNPUL2 y hnRNPK presentan potenciales sitios de fosforilación para NUA1 (Fig. 26D). Con respecto a los potenciales interactores de NUA1 que participan en el metabolismo de la glucosa se encuentran la fosfofructoquinasa-1 (PFKP, PFKL y PFKM), la fosfoglicerato quinasa (PGK1) y la piruvato quinasa (PKM) todos ellos presentan al menos un potencial sitio de fosforilación para NUA1 (Fig. 26D).

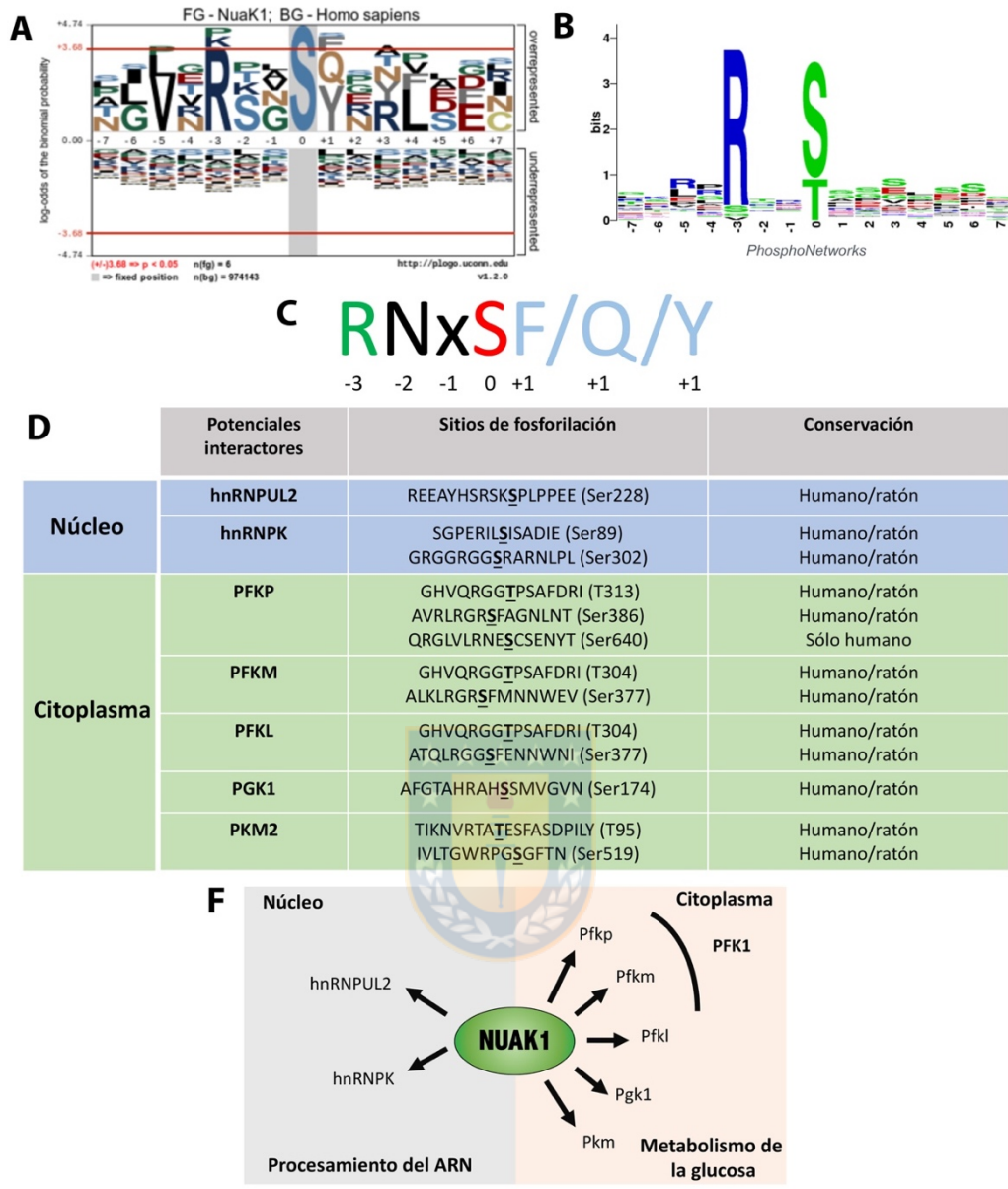


Figura 26. Predicciones de sitios de fosforilación para NUAK1 en los potenciales interactores nucleares y citoplasmáticos asociados a unir el ARN y al metabolismo de la glucosa. A-B.- Motivos de fosforilación generados en *plogo* (A) y *PhosphoNetworks* (B). **C.-** Motivo de fosforilación generado por nuestros colaboradores. **D.-** Tabla resumen de los potenciales sitios de fosforilación identificados en los interactores nucleares y citoplasmáticos de NUAK1. Las secuencias y los residuos potencialmente fosforilados por NUAK1 (negrita/sub-rayado) así como su conservación se indican en la tabla. **F.-** Esquema resumen de los potenciales interactores-blancos de NUAK1 en el núcleo asociados al procesamiento del ARN y los potenciales interactores-blancos en el citoplasma asociado al metabolismo de la glucosa. Fuente: Elaboración propia.

En resumen, hnRNPU2, hnRNPK, PFK1 (PFKP, PFKM y PFKL), PGK1 y PKM pueden ser nuevos interactores y a su vez blancos de NUA1 dependientes de su localización sub-celular (Fig. 26F). Por lo tanto, nos focalizamos en primera instancia en validar la interacción de NUA1 con estas proteínas lo que nos permitirá determinar nuevas funciones de NUA1 a través de sus interactores.

4.2.3.- Objetivo 2.3: Validar los nuevos interactores de NUA1.

La validación de los potenciales interactores se realizó basado en la identificación y clasificación realizada en el sub-objetivo 2.2 (4.2.2). Con respecto a los interactores-blancos asociados al procesamiento del ARN nos focalizamos en **hnRNPK**. Esto se debió a que hnRNPK presenta diversas funciones asociadas a promover la progresión tumoral (Bomsztyk y col., 2004) (Fig. 27A) y tiene una expresión ubicua a diferencia de hnRNPU2 que no ha sido ampliamente estudiada ni caracterizada. Con respecto a los potenciales interactores-blancos asociados al metabolismo de glucosa se realizó la validación de **PFKP, PFKM, PFKL, PGK1 y PKM2**.

4.2.3.1.- NUA1 interacciona con hnRNPK

hnRNPK es una ribonucleoproteína que se localiza principalmente en el núcleo (Fig. 27B), y tiene 3 dominios KH repetidos que son los responsables de unir al ARN (Bomsztyk y col., 2004). Esta proteína además de unir y favorecer el procesamiento del ARN actúa como un co-regulador transcripcional, remodelador de cromatina, participa en la transducción de señales y en la traducción (Bomsztyk y col., 2004) (Fig. 27A). Estas evidencias han llevado a proponer que **hnRNPK actúa como un oncogén promoviendo la tumorigénesis** (Gallardo et al., 2016; J. Lu & Gao, 2016). Para la validación de la interacción de hnRNPK y NUA1 se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en células HeLa. En este modelo celular se validó la interacción de NUA1-hnRNPK (Fig.

27C). Cabe destacar que en células HeLa ambas proteínas (NUAK1 y hnRNPk) se localizan principalmente en el núcleo (FIG. 27B). Por lo tanto, evaluamos si la interacción de NUAK1-hnRNPk depende de la localización de NUAK1. Para ello, se utilizaron células HeLa expresando FLAG-hNUAK1 WT (núcleo) y FLAG-hNUAK1 KR43/70AA (citoplasmática) y se evaluó la interacción a través de ensayos de Co-immunoprecipitación. Utilizando estas herramientas se logró determinar que en células HeLa la quinasa NUAK1 y hnRNPk interaccionan en el núcleo debido a una mayor interacción entre FLAG-hNUAK1 WT y hnRNPk (Fig. 27D). **Estas evidencias nos sugirieron que hnRNPk es un nuevo interactor nuclear de NUAK1 lo que a su vez propone una nueva función nuclear de NUAK1 regulando el procesamiento del ARN.** Estos datos nos resultaron de gran relevancia para determinar nuevas funciones de la quinasa NUAK1, por lo tanto, su efecto será abordado en futuros estudios de nuestro laboratorio.



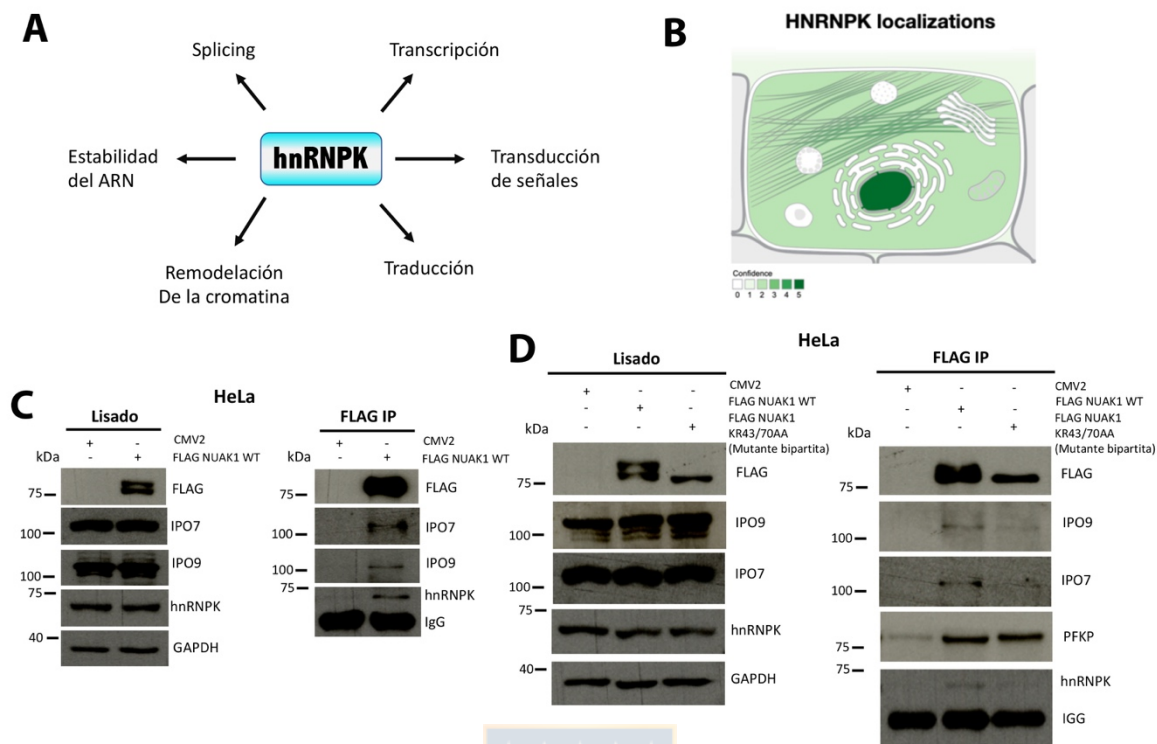


Figura 27. NUA1 interacta con hnRNPK. A.- Esquema resumen de las diferentes funciones de hnRNPK. **B.-** Predicciones bioinformáticas de la localización sub-celular de hnRNPK. **C.-** Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT expresada en células HeLa y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de IPO7, IPO9 y hnRNPK. **D.-** IP de FLAG-hNUAK1 WT o FLAG-hNUAK1 KR43/70AA expresadas en células HeLa y CoIP de IPO7, IPO9, PFKP y hnRNPK. Como controles positivos de la IP se utilizó IPO7, IPO9 y PFKP. Fuente: Elaboración propia.

4.2.3.2.- NUAK1 interacciona con PFK1 y PGK1

Como se describió anteriormente, la regulación del metabolismo celular es crucial para promover la progresión tumoral. Con respecto a lo anterior, **NUAK1 a diferencia de otros miembros de la familia no se le han descrito una función directa sobre la regulación del metabolismo celular.** La única evidencia existente es el efecto de NUAK1 en mantener los niveles de ATP en células transformadas con el oncogén c-myc. En esta área se propuso a NUAK1 como nuevo regulador de la actividad mitocondrial (Liu y col., 2012), sin embargo, hasta la fecha no se han determinado el/los mecanismos moleculares que relacionan a NUAK1 con la regulación de la actividad mitocondrial. **Por esta razón focalizamos gran parte de nuestros esfuerzos en validar los interactores de NUAK1 asociados a la regulación del metabolismo de la glucosa, lo que permitirá elucidar nuevas funciones citoplasmáticas de NUAK1 que estarían asociadas a promover la progresión tumoral.**

Las enzimas involucradas en la regulación del metabolismo detectadas en la espectrometría de masas y las predicciones de potenciales sitios de fosforilación participan directamente en la oxidación de la glucosa a lactato. En esta área la Fosfofructoquinasa-1 (PFK1) y la piruvato quinasa (PKM) son enzimas que regulan reacciones **irreversibles** en la glicólisis (Fig. 28A). Por otro lado, la Fosfoglicerato quinasa-1 (PGK1) cataliza la conversión de 1,3-bifosfoglicerato a 3-fosfoglicerato que es una reacción reversible (Fig. 28A). En efecto, la función de estas enzimas es crucial para promover la progresión tumoral. Para la validación de la interacción de NUAK1 y PGK1 se utilizaron ensayos de Co-immunoprecipitación en células HEK293. Derivado de estos experimentos determinamos que PGK1 es un nuevo interactante de NUAK1 (Fig. 28B). Con respecto a la piruvato quinasa (PKM) después de realizar varias Co-IP no se logró detectar la interacción de PKM2 y NUAK1 en diferentes líneas celulares (datos no se muestran).

En el caso de la Fosfofructoquinasa-1 (PFK1) es importante destacar que en cáncer de mama, glioblastoma y leucemia la regulación de la actividad de la fosfofructoquinasa- 1 (PFK1) es necesaria para promover la progresión tumoral (N. H. Kim y col., 2017; J.-H. Lee y col., 2017, 2018; T. Y. Li y col., 2016; Wang y col., 2017). En estos tipos de cánceres la quinasa NUAK1 ha sido descrita como un oncogén y un potencial blanco terapéutico (Mor, Cheung, & Vousden, 2011). Debido a que PFK1 presenta 3 diferentes isoformas; PFKP (plaquetas), PFKL (hígado) y PFKM (músculo) y que todas fueron detectadas y significativas en los análisis de espectrometría de masas (Fig. 25B), es que la primera aproximación experimental fue sobre-expresar las tres isoformas de la PFK1 (PFKP, PFKL y PFKM) en células MDA-MB-231 y se evaluó la interacción con NUAK1 endógeno a través de ensayos de co-inmunoprecipitación. Derivado de estos experimentos determinamos que NUAK1 puede interaccionar con las 3 isoformas de la PFK1 (PFKP, PFKL y PFKM), sin embargo, la expresión de las distintas isoformas no fue la misma, lo que afectó la interacción con NUAK1 (Fig. 28C). Estas diferencias en la expresión de las isoformas de la PFK1 se deben a la existencia de mecanismos de regulación transcripcional y/o post-traduccionales que afectan a la expresión de las isoformas PFKM y PFKL en cáncer de mama. Por lo tanto, esta regulación induce **principalmente la expresión de la PFKP** (N. H. Kim y col., 2017)

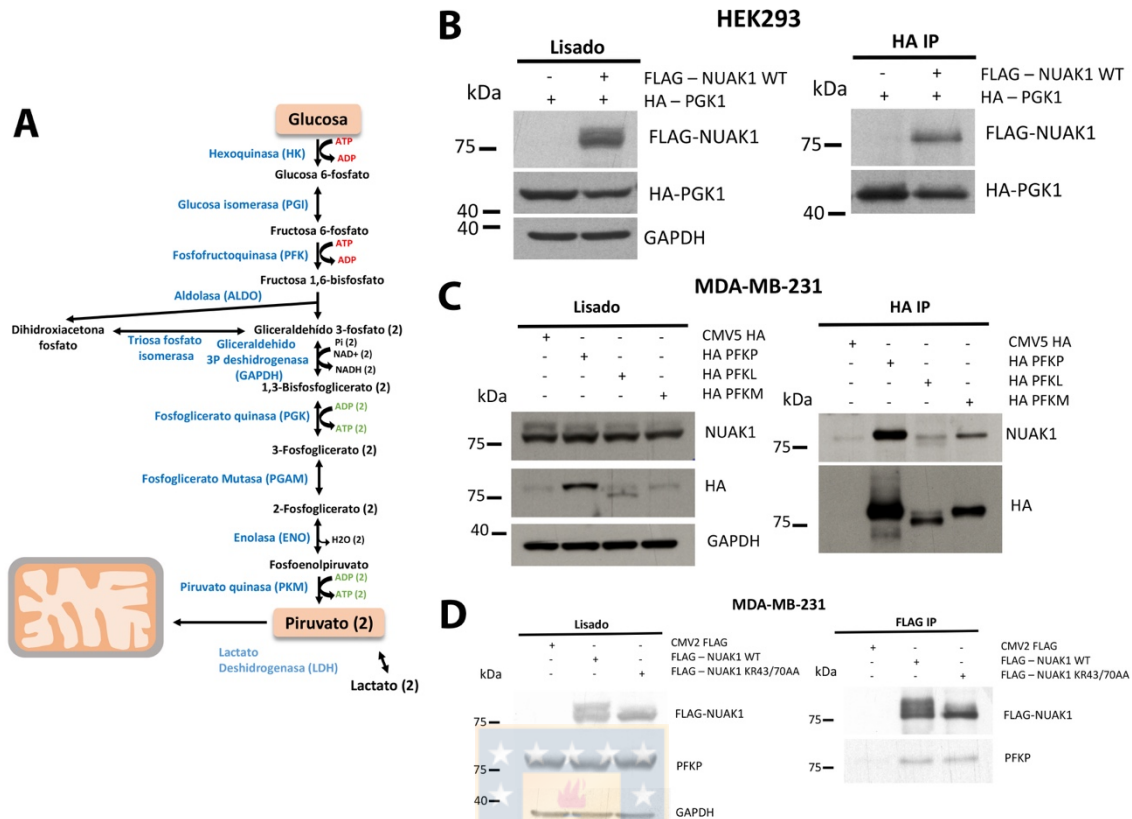


Figura 28. NUA1 interacciona con PGK1, PFKP, PFKL y PFKM. **A.-** Representación esquemática de las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa. **B.-** Inmunoprecipitación (IP) de HA-PGK1 expresada en células HEK293 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de FLAG-hNUAK1 WT. **C.-** Inmunoprecipitación (IP) de HA-PFKP, HA-PFKM y HA-PFKL expresada en células MDA-MB-231 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de NUA1 endógena. **D.-** Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT o FLAG-hNUAK1 KR43/70AA expresadas en células MDA-MB-231 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de PFKP endógena. Fuente: Elaboración propia.

Debido a estas evidencias nos focalizamos en la **isoforma PFKP** y en la utilización de células de cáncer de mama. Teniendo en consideración que PFK1 se localiza principalmente en el citoplasma al igual que NUA1 en estos modelos celulares (cáncer de mama) se evaluó si la localización de NUA1 puede afectar la interacción de **FLAG-hNUA1 y PFKP endógena** en células MDA-MB-231. Para ello, se sobre-expresó e inmunoprecipitó FLAG-hNUA1 WT o FLAG-hNUA1 KR43/70AA (mutante principalmente citoplasmática) y se evaluó la co-inmunoprecipitación con PFKP endógena. Los resultados obtenidos determinaron que FLAG-NUA1 WT y la mutante citoplasmática de NUA1 (KR43/70AA) interaccionan en niveles similares con la PFKP sugiriendo que la interacción NUA1-PFKP ocurre en el citoplasma (Fig. 28D). Complementario a lo anterior, se evaluó a través de inmunofluorescencia la localización sub-celular de NUA1 y PFKP en células MDA-MB-231. Derivado de estos experimentos se observó que el citoplasma es el compartimento donde ambas proteínas se localizan (Fig. 29). Lo que sugiere que FLAG-hNUA1 WT y FLAG-hNUA1 KR43/70AA co-localiza con PFKP en esta fracción (Fig. 29). Estos resultados validaron los resultados de la espectrometría de masas (Fig. 25B) y los resultados obtenidos con la inmunoprecipitación de las mutantes de NUA1 (Fig. 28D) **corroborando que la PFK1 es un nuevo interactante citoplasmático de NUA1.**

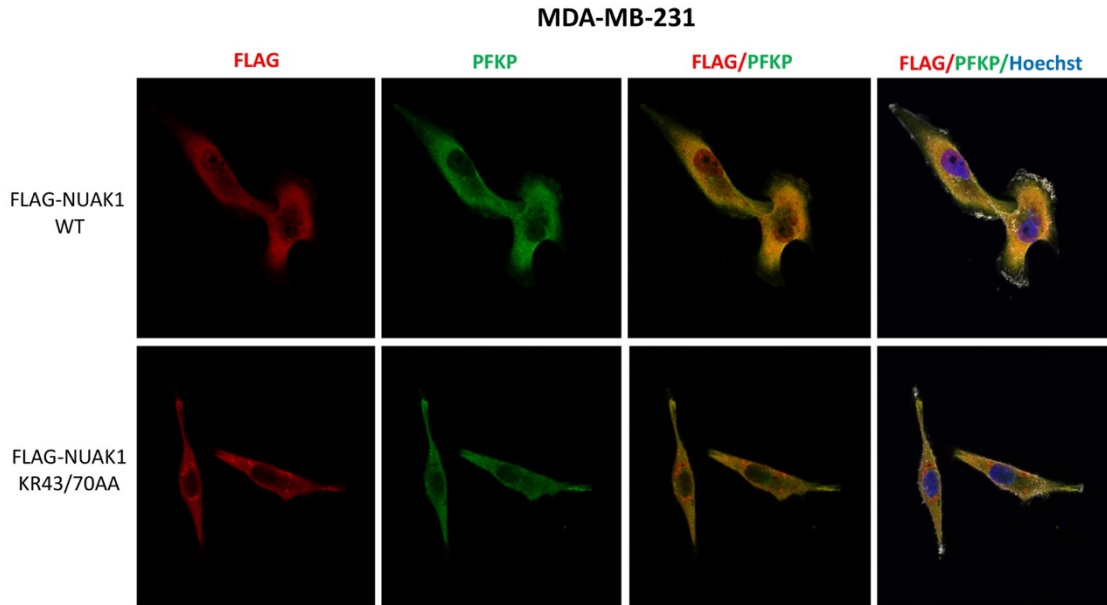
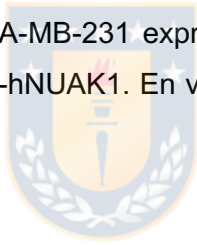


Figura 29. NUA1 y PFKP se localizan principalmente en el citoplasma. Imágenes de microscopía confocal de células MDA-MB-231 expresando FLAG-hNUAK1 WT o FLAG-hNUAK1 KR43/70AA. En rojo, FLAG-hNUAK1. En verde, PFKP. En azul, núcleo. Fuente: Elaboración propia.



Adicionalmente, evaluamos si la interacción entre NUA1 y PFKP es detectada inmunoprecipitando las **proteínas endógenas**. Para ello, se inmunoprecipitó PFKP endógeno y se evaluó la co-inmunoprecipitación de NUA1 en células MDA-MB-231 (Fig. 30A) y MCF7 (Fig. 30B). Derivado de estos datos se corroboró la interacción endógena de PFKP y NUA1 en células de cáncer de mama. **Con estos datos este objetivo ha logrado determinar que hnRNPK es un nuevo interactador nuclear de NUA1 y PFK1 un nuevo interactador citoplasmático de NUA1.**

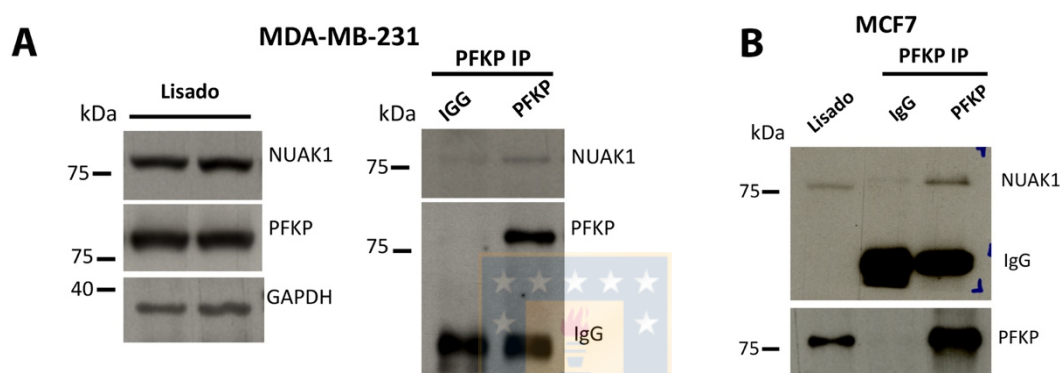


Figura 30. PFKP endógena interacciona con NUA1 endógeno en células de cáncer de mama. A.- Inmunoprecipitación (IP) de PFKP endógena en células MDA-MB-231 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de NUA1 endógena. **B.-** Inmunoprecipitación (IP) de PFKP endógena en células MCF7 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de NUA1 endógena. Fuente: Elaboración propia.

4.2.3.3.- La interacción de NUA1 – PFK1 depende del contexto celular y la localización sub-celular de NUA1.

Debido a que la regulación de PFK1 es crucial para promover la progresión tumoral. Es que se ha descrito que diferentes contextos celulares afectan la actividad de la PFK1. En condiciones de estrés PFK1 es fosforilada o reprimida transcripcionalmente para inhibir su actividad, disminuir los niveles de ROS y promover la supervivencia celular a través del aumento de los niveles de NADPH (N. H. Kim y col., 2017; Li y col., 2016; Wang y col., 2017) (Fig. 31). En caso contrario, frente a la estimulación por factores de crecimiento (EGF) PFK1 es fosforilada y activada para promover la proliferación celular (J.-H. Lee y col., 2018) (Fig. 31). En estas condiciones la regulación de la actividad de NUA1 y su localización sub-celular también son afectadas (Port y col., 2018). Por lo tanto, basado en estas evidencias evaluamos si la interacción de NUA1 y PFK1 puede alterarse dependiendo del contexto celular.



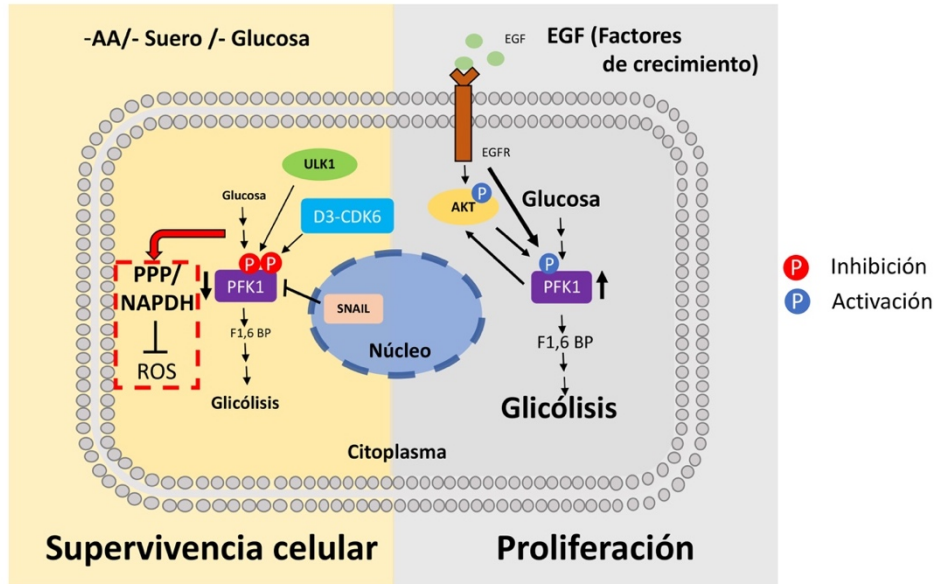


Figura 31. Esquema de la regulación de la Fosfofructoquinasa-1 (PFK1). En condiciones de estrés inducido por ausencia de aminoácidos, suero o glucosa, quinasas como ULK1 o CDK6 se activan y fosforilan a PFK1 inhibiéndola. En estas condiciones también se activa el factor de transcripción SNAIL que reprime la expresión de PFK1. Cuando PFK1 es inhibida se altera el metabolismo de la glucosa inhibiendo la glicólisis e induciendo la vía oxidativa de la glucosa para aumentar los niveles de NAPDH. El aumento de NAPDH disminuye el estrés oxidativo promoviendo la supervivencia celular. Frente al tratamiento con factores de crecimiento como EGF, AKT y EGFR se activan y fosforilan a PFK1 activándola lo que promueve la glicólisis para promover la proliferación celular. Fuente: Elaboración propia.

Para ello, se sobre-expresó FLAG-hNUAK1 WT en células MDA-MB-231 mantenidas en condiciones normales, ausencia de glucosa por 2 horas e inducción con insulina por 4 horas. Luego se inmunoprecipitó FLAG-hNUAK1 WT y se evaluó la Co-IP de PFKP endógena. **Estos experimentos determinaron que la interacción de NUAK1 y PFKP aumenta en condiciones de estrés y disminuye con el tratamiento con insulina** (Fig. 32A-B). Estos resultados fueron validados en células HEK293 en ausencia de glucosa por 2 horas (Fig. 32C-D), sugiriendo que la interacción de NUAK1 y PFKP depende del contexto celular.

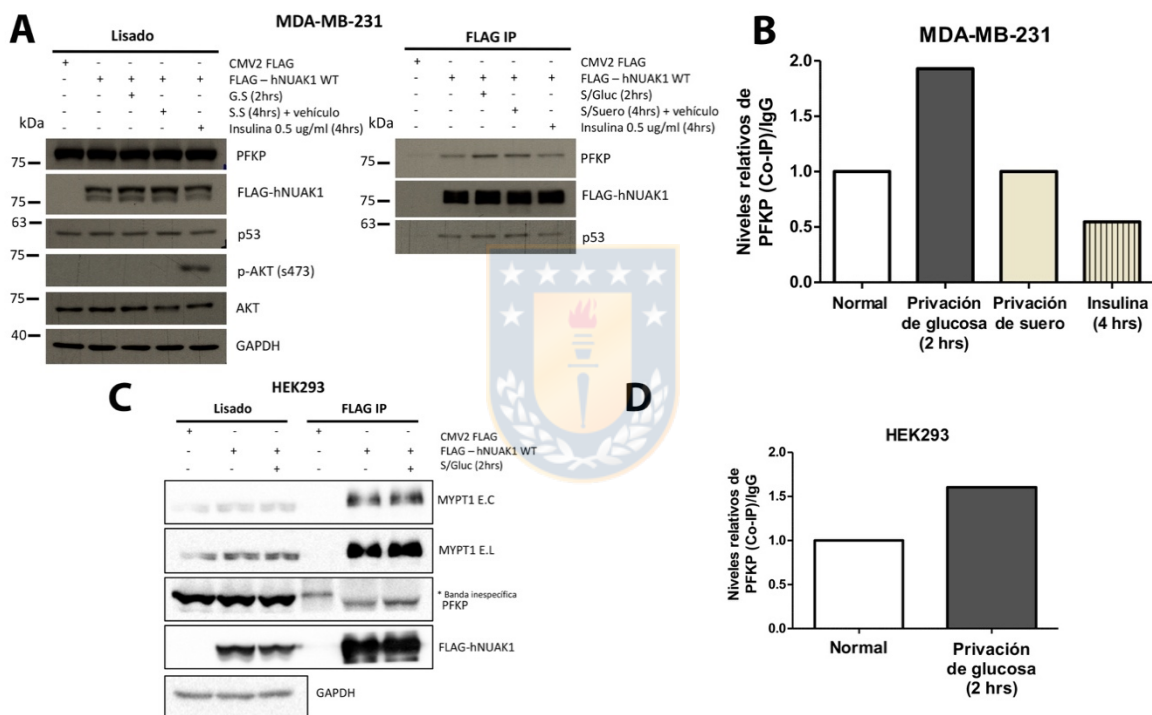


Figura 32. La interacción de NUAK1 y PFKP depende del contexto celular. A.- Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT y Co-IP de PFKP endógena en células MDA-MD-231 en condiciones normales, privación de glucosa (2 horas) y tratamiento con insulina (4 horas). p-AKT fue utilizado como control del tratamiento con insulina. p53 es un interactivo descrito de NUAK1 que fue utilizado como control de la Co-IP. **B.-** Cuantificación de la Co-IP de PFKP realizada en (A). Se cuantificó la Co-IP de PFKP normalizada por la IP de FLAG-hNUAK1. **C.-** Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT y Co-IP de PFKP endógena en células HEK293 en condiciones normales y privación de glucosa (2 horas). MYPT1 fue utilizado como control de la Co-IP. **D.-** Cuantificación de la Co-IP de PFKP realizada en (C). Fuente: Elaboración propia.

Como fue descrito previamente, el contexto celular afecta la localización sub-celular de NUA1 (ver experimentos adicionales Objetivo 1). De hecho, la ausencia o privación de glucosa induce la acumulación citoplasmática de NUA1 en células HeLa a través de la inducción de estrés oxidativo (Fig. 18). Por lo tanto, evaluamos en células MDA-MB-231 si el estrés oxidativo y la privación de glucosa induce la acumulación citoplasmática de NUA1 (Fig. 33). Este efecto fue menos drástico en las células de cáncer de mama comparado con las células HeLa (Fig. 33). Sin embargo, a pesar de ello se induce la acumulación citoplasmática de NUA1 lo que podría estar involucrada en el aumento de la interacción de NUA1 y PFKP.



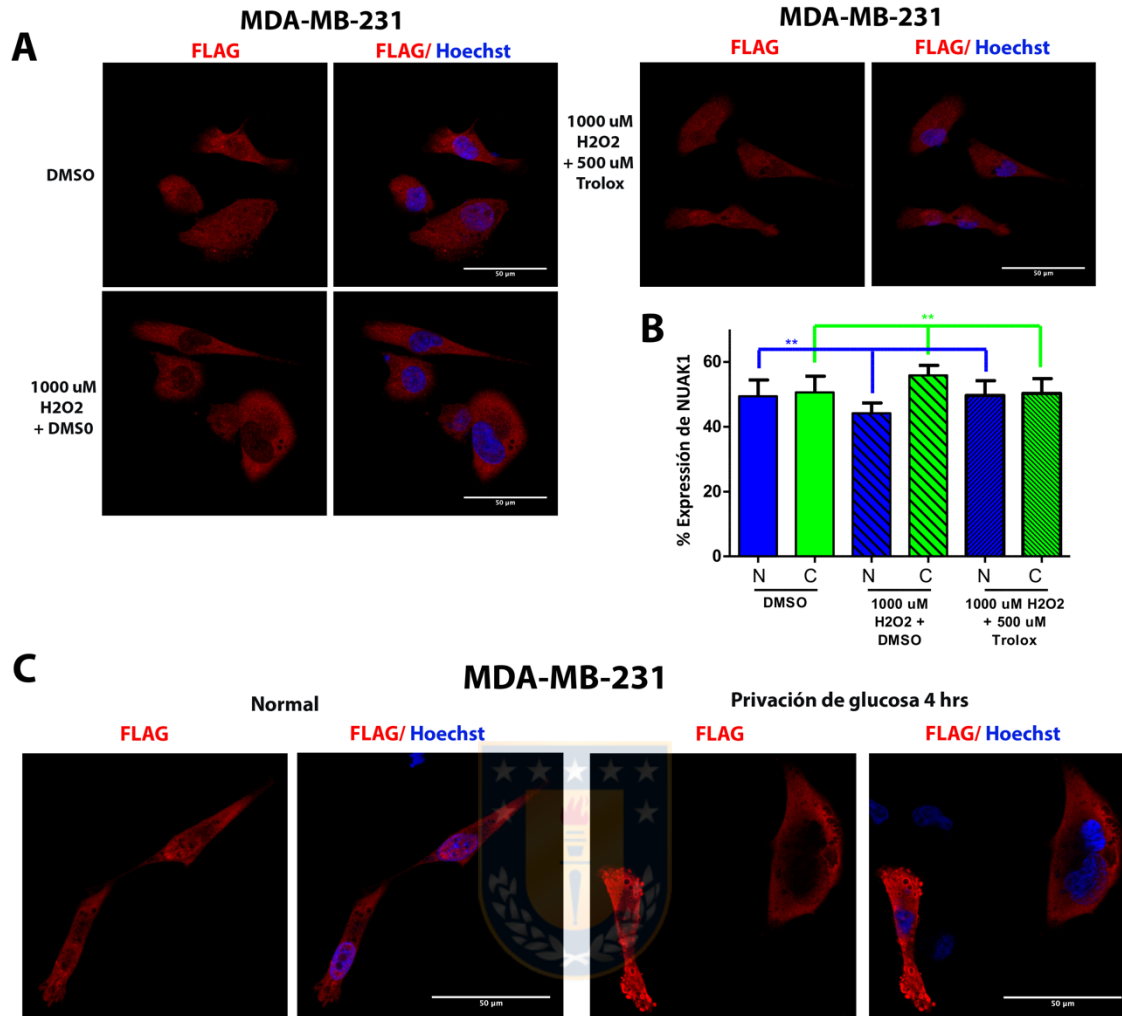


Figura 33. El estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno y la privación de glucosa induce la acumulación citoplasmática de NUAK1 en MDA-MB-231. A.- Imágenes de microscopía confocal de células MDA-MB-231 expresando FLAG-hNUAK1 WT tratadas con DMSO, 1000 μ M H₂O₂ + DMSO, y 1000 μ M H₂O₂ + 500 μ M Trolox por 2 horas. **B.-** Gráficos muestran la cuantificación de las imágenes de la microscopía confocal (B). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. *** $p < 0.001$. *one-way ANOVA*. **C.-** Imágenes de microscopía confocal de células MDA-MB-231 expresando FLAG-hNUAK1 WT sometidas a 4 horas de privación de glucosa y el tratamiento con el antioxidante Trolox (500 μ M) (4 horas). Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, en diferentes líneas celulares se evaluó el efecto del tratamiento de insulina en la localización sub-celular de NUAK1. En células MDA-MB-231 el tratamiento con insulina indujo la acumulación nuclear de NUAK1 y la disminución de NUAK1 citoplasmático (Fig. 34A-B). Este efecto se validó en células MEF TSC2 $-/-$ a través de fraccionamiento sub-celular (Fig. 34 C,F). En células MEF (normales) (Fig. 34 D,G) y U2OS (Fig. 34 E,H) el tratamiento de insulina indujo la acumulación nuclear de NUAK1. En resumen, estos resultados nos sugirieron que la localización sub-celular es crucial para la interacción de NUAK1 con la PFK1, efecto que estaría determinado por el contexto celular.



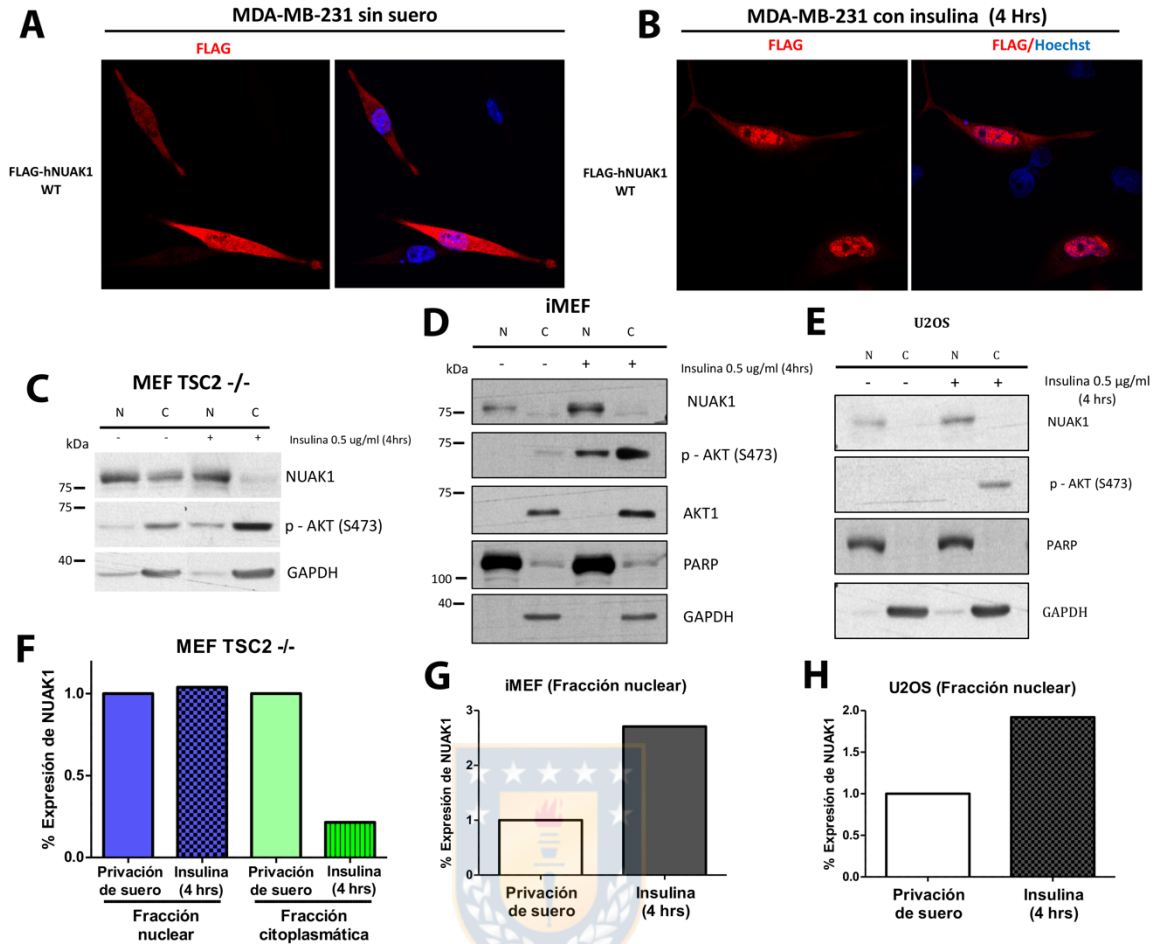


Figura 34. El tratamiento con insulina induce la acumulación nuclear de NUA1. A.- **B.-** Imágenes de microscopía confocal de células MDA-MB-231 tratadas con insulina por 2 horas (A) y 4 horas (B). **C-E.-** *Western blot* del fraccionamiento sub-celular de MEF TSC2 -/- (C), iMEF (D) y U2OS (E) tratadas con insulina 0.5 μ g/ml por 4 horas. **F-H.-** Cuantificación de la expresión de NUA1 en las diferentes fracciones (C-E). Fuente: Elaboración propia.

4.2.4.- Resumen del objetivo 2

Derivado de los resultados obtenidos de la espectrometría de masas se logró determinar/validar **8 nuevos interactores de NUA1 asociados a su regulación y función** (Fig. 35). Con respecto a la regulación de NUA1 en el objetivo 1 se validó la interacción de NUA1 con la importina- β 1, IPO7 y IPO9, así como su efecto en el transporte de NUA1 al núcleo. En el objetivo 2 nos focalizamos en determinar nuevos interactores asociados con nuevas funciones de NUA1 dependientes de su localización sub-celular. Para ello se utilizaron diversos análisis bioinformáticos de los datos de *MudPIT* que nos permitieron acotar que potenciales interactores-blancos validar. Con respecto a lo anterior, determinamos que hnRNPK es un nuevo interactor nuclear y potencial blanco de NUA1, **lo que nos sugiere que NUA1 nuclear a través de hnRNPK regularía el *splicing* o procesamiento del ARN. Por otro lado, validamos que PGK1 y las 3 isoformas de la PFK1 (PFKP, PFKL y PFKM) son nuevos interactores y potenciales blancos citoplasmáticos de NUA1 (Fig. 35).**

Finalmente, nuestros estudios se focalizaron en la interacción de NUA1 con PFKP (isoforma de plaquetas), determinando que esta interacción depende de la localización sub-celular de NUA1, la cual es afectada por el contexto celular. Por lo tanto, sugerimos que NUA1 citoplasmático afecta el metabolismo celular a través de la regulación de la actividad de la PFK1. En resumen, con estos datos se ha propuesto diferentes mecanismos moleculares involucrados en la regulación y función de NUA1 a través de sus interactores.

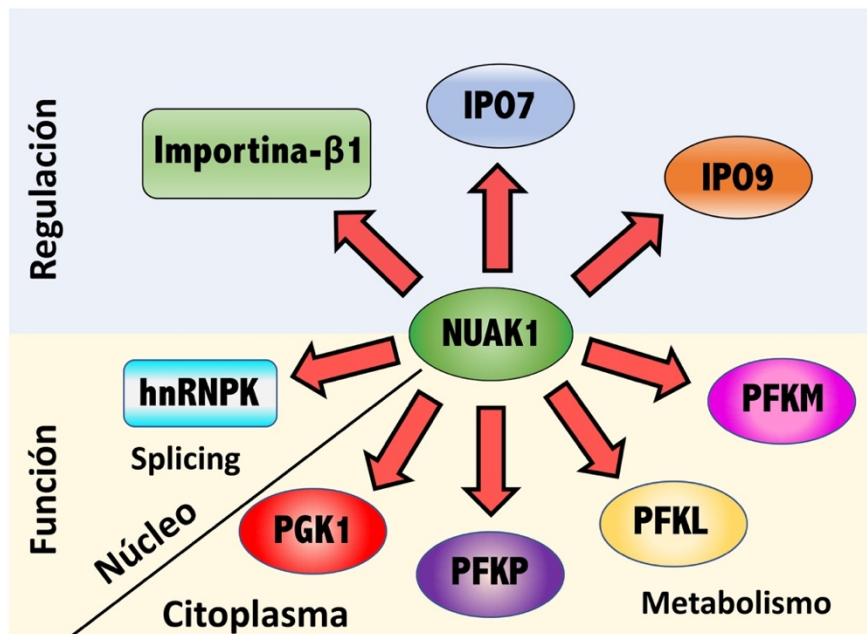


Figura 35. Esquema resumen de los nuevos interactores de NUA1 determinados en el objetivo 2. La importina-β1, IPO7 y IPO9 son nuevos interactores asociados a la regulación de la localización sub-celular de NUA1. hnRNPk es un nuevo interactor nuclear de NUA1 asociado al procesamiento del ARN. PFKP, PFKL, PFKM y PGK1 son nuevos interactores citoplasmáticos de NUA1 asociados al metabolismo de la glucosa. Fuente: Elaboración propia.

4.2.5.- Experimentos adicionales del objetivo 2: Determinar si NUAK1 fosforila a la Fosfofructoquinasa-1 (PFK1).

De los experimentos de predicción de sitios de fosforilación se determinó que las 3 isoformas de PFK1 presentaban dos potenciales sitios de fosforilación para NUAK1 conservados entre humano y ratón (Fig. 36A). En esta área validamos que NUAK1 puede interaccionar con las 3 isoformas e inhibir la actividad de PFK. **Por lo tanto, un objetivo adicional o proyección de nuestro trabajo es determinar si NUAK1 fosforila a PFK1.** Cabe destacar que la treonina 313 (Thr-313, residuo en PFKP) y la serina 386 (Ser-386, residuo en PFKP) son conservados en las 3 isoformas de la PFK1 (Fig. 36B). Con respecto a lo anterior, la fosforilación de la Ser-386 es mediada por AKT y promueve su activación (J.-H. Lee y col., 2017). En contraste, hasta la fecha no se ha descrito una función para la fosforilación de la Thr-313, pero la fosforilación en este residuo ha sido detectada por espectrometría de masas (Anexo fig. 5). Por lo tanto, evaluamos a través de la estructura de la PFKP humana donde esta localizada la Thr-313. Los resultados obtenidos nos parecieron muy interesantes, ya que la Thr-313 se localiza en el centro del dímero y esta rodeada de aminoácidos con carga negativa (Fig. 36C). Por lo tanto, una fosforilación en ese residuo podría afectar la oligomerización de PFKP afectando su actividad. Esta idea nos llevo a sugerir que NUAK1 fosforila a la Thr-313 de la PFKP para inhibirla o bien fosforilar la Ser-386 para activarla como AKT.

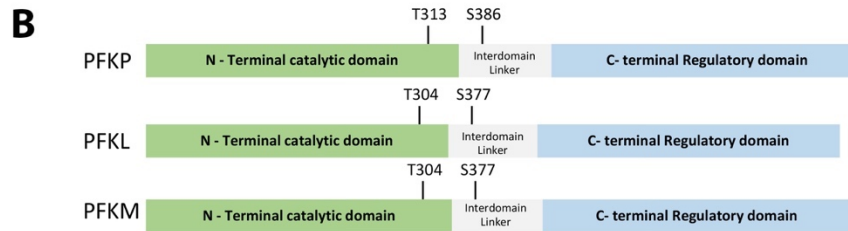
Para responder a este nuevo objetivo se espera realizar 3 aproximaciones experimentales. i) **Espectrometría de masas**, ii) **Phos-tag**, iii) **Interacción directa y ensayo quinasa *in-vitro***. En el caso de espectrometría de masas y *Phos-tag* se espera utilizar modelos celulares estables e inducibles para FLAG-hNUAK1 WT o FLAG-hNUAK1 K84A (quinasa muerta) que fueron generados y validados previo a la entrega del escrito (Anexo Fig. 6) y el inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015). Utilizando estos modelos se espera

colectar muestras que serán analizadas por **espectrometría de masas en colaboración con el Dr. Jerry Workman** y otras muestras analizadas por *western blot* utilizando **Phos-tag**, una molécula que se une a grupos fosfato y aumenta el peso molecular de las proteínas fosforiladas. Por último, se espera purificar hNUAK1 (WT y K84A) y PFKP desde bacterias y evaluar su **interacción directa**, así como también la fosforilación de PFK1 a través del **ensayo quinasa in-vitro**. En esta área hemos logrado sub-clonar y purificar GST-PFKP y 6xHis NUAK1 (Anexo Fig. 7). Lo que un futuro próximo nos ayudará a realizar estos estudios.



A

	Potenciales interactores	Sitios de fosforilación	Conservación
Citoplasma	PFKP	GHVQRGGT <u>T</u> PSAFDRI (T313) AVRLRGR <u>S</u> FAGNLNT (Ser386) QRGLVLRNE <u>S</u> CSENYT (Ser640)	Humano/ratón Humano/ratón Sólo humano
	PFKM	GHVQRGGT <u>T</u> PSAFDRI (T304) ALKLRGR <u>S</u> FMNNWEV (Ser377)	Humano/ratón Humano/ratón
	PFKL	GHVQRGGT <u>T</u> PSAFDRI (T304) ATQLRGG <u>S</u> FENNWNI (Ser377)	Humano/ratón Humano/ratón



C PFKP Tetrámero (T313- Rojo)

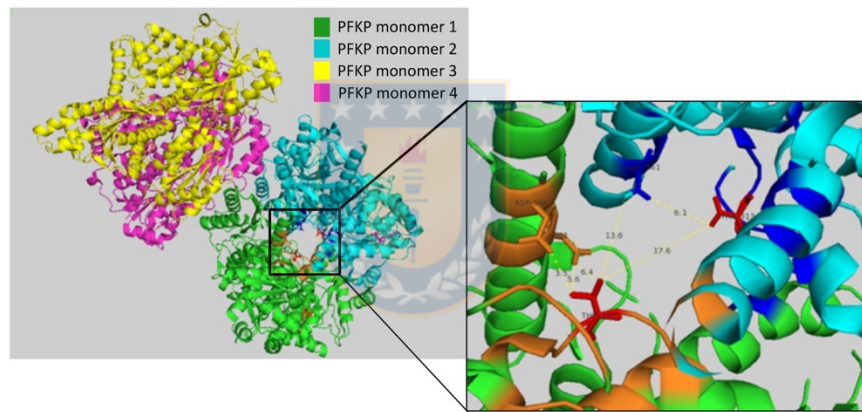


Figura 36. PFK1 es un potencial blanco de la quinasa NUAK1. A.- Tabla resumen de los potenciales sitios de fosforilación para NUAK1 en PFK1. **B.-** Representación esquemática de los dos principales sitios de fosforilación para NUAK1 conservado en las 3 isoformas de PFK1. **C.-** Modelamiento de la estructura de la Thr-313 el tetrámero de PFKP. En rojo, se representa la Thr-313. Fuente: Elaboración propia.

4.3.- Objetivo 3: Evaluar el efecto de NUA1 en la actividad y/o función de los interactores asociados a promover la progresión tumoral.

Como se mencionó anteriormente la regulación de la Fosfofructoquinasa-1 es fundamental para su actividad afectando la proliferación o supervivencia celular dependiendo del contexto celular (Fig. 31). Basado en nuestros resultados, NUA1 interacciona con la PFK1 mayoritariamente en condiciones de estrés. Estos datos nos sugieren que NUA1 afecta la actividad de la PFK1 en este contexto celular. Por lo tanto, para completar la hipótesis de la regulación del metabolismo celular a través de NUA1 es que este objetivo se focalizó en evaluar el efecto de NUA1 en la actividad y función de la PFK1.

4.3.1.- NUA1 inhibe la actividad de la Fosfofructoquinasa.

Para evaluar el efecto de NUA1 en la actividad de PFK1 se utilizó un kit comercial (Fig. 37A). El primer diseño experimental utilizado fue sobre-expresar FLAG-hNUA1 WT en células MDA-MB-231. Posteriormente, las células fueron tratadas con el inhibidor farmacológico de NUA1 (HTH-01-015) en condiciones normales y se midió la actividad de PFK. En estos experimentos no se observaron diferencias en la actividad de PFK (Fig. 37B). Sin embargo, al repetir el experimento en condiciones de privación de glucosa se determinó que en las células MDA-MB-231 la sobre-expresión de NUA1 disminuyó la actividad de la PFK (Fig. 37C). Este efecto fue revertido al tratar las células con el inhibidor de NUA1 (Fig. 37C). Adicionalmente, en células MCF7 silenciadas para NUA1 (Fig. 37D) se determinó que la actividad de PFK aumenta cuando NUA1 es silenciado (Fig. 37E) y también cuando se utiliza el inhibidor específico de la actividad de NUA1 (HTH-01-015) (Fig. 37F). **En resumen, estos resultados determinaron que NUA1 inhibe la actividad de PFK.**

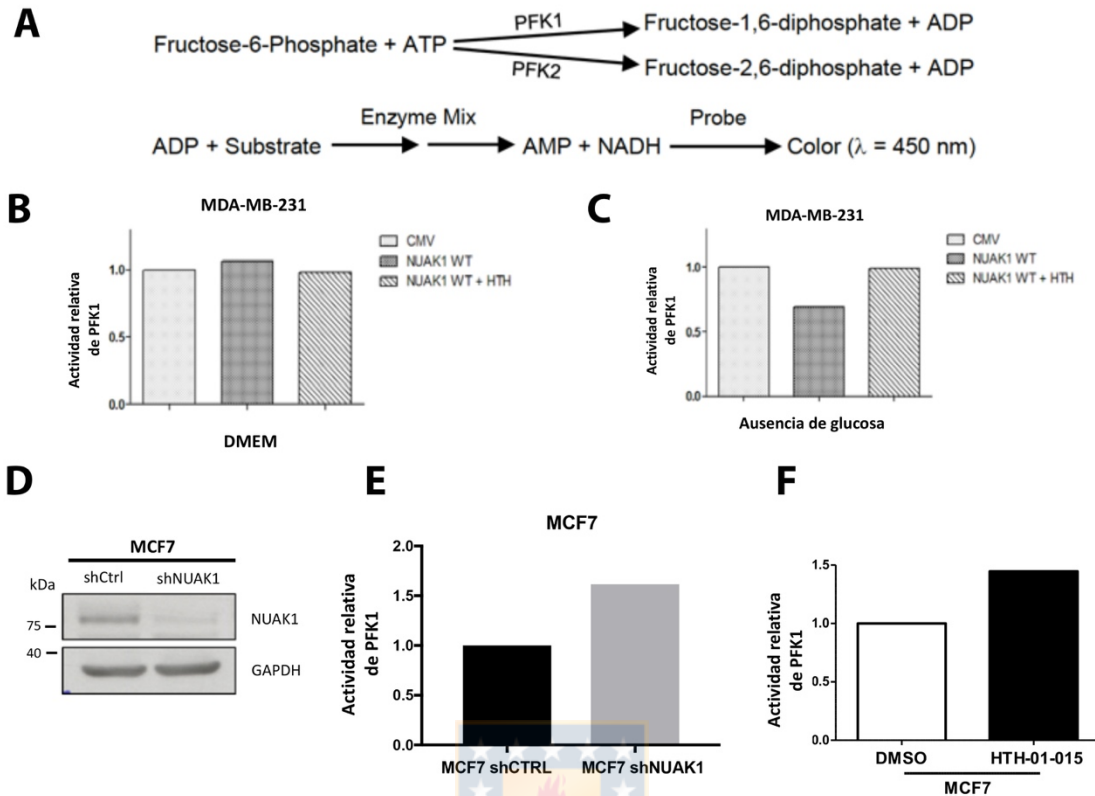


Figura 37. NUAK1 inhibe la actividad de la Fosfofructoquinasa (PFK). **A.-** Esquema del kit utilizado para medir la actividad de la PFK. **B.-** Análisis de la actividad de la PFK en células MDA-MB-231 expresando FLAG-hNUAK1 WT tratadas con el inhibidor HTH-01-015 y su respectivo control (DMSO) (n=1). **C.-** Análisis de la actividad de la PFK en células MDA-MB-231 expresando FLAG-hNUAK1 WT tratadas con HTH-01-015 y su respectivo control (DMSO) en ausencia de glucosa (n=2). **D.-** *Western blot* del silenciamiento de NUAK1 en células MCF7. **E.-** Análisis de la actividad de la PFK en células MCF7 silenciadas para NUAK1 y su respectivo control (n=1). **F.-** Análisis de la actividad de la PFK en células MCF7 tratadas con HTH-01-015 y su respectivo control (DMSO) (n=2). Fuente: Elaboración propia.

4.3.2.- NUA1 afecta los niveles de NAPDH.

Los resultados obtenidos han determinado que PFK1 es un nuevo interactante citoplasmático de NUA1. Esta interacción disminuye en presencia de factores de crecimiento, pero aumenta en condiciones de estrés, lo que produciría la inhibición de PFK y consecuencia afectaría el metabolismo de la glucosa. En esta área uno de los principales efectos de la inhibición de la PFK1 es reprogramar el metabolismo de la glucosa induciendo la vía de las pentosas (N. H. Kim y col., 2017; Li y col., 2016; Wang y col., 2017). La vía de las pentosas consta de dos etapas: **la oxidativa y no oxidativa** (Fig. 45A). La fase oxidativa tiene como finalidad producir **NAPDH y ribulosa-5- fosfato** (Patra y col., 2014) (Anexo fig. 8A). La fase no oxidativa tiene el objetivo de reciclar la ribosa-5-fosfato a través de gliceraldehído-3-fosfato y/o fructosa-6-fosfato que pueden volver a la glicólisis (Anexo fig. 8A). Por lo tanto, basado en estas evidencias evaluamos el efecto de NUA1 en los niveles de NAPDH. Estos experimentos se realizaron en células MDA-MB-231 y MCF7 tratadas con el inhibidor de NUA1 (HTH-01-015) por 2 horas. **Los resultados obtenidos determinaron que en ambos modelos celulares la inhibición de NUA1 disminuye los niveles de NAPDH (Fig. 38).**

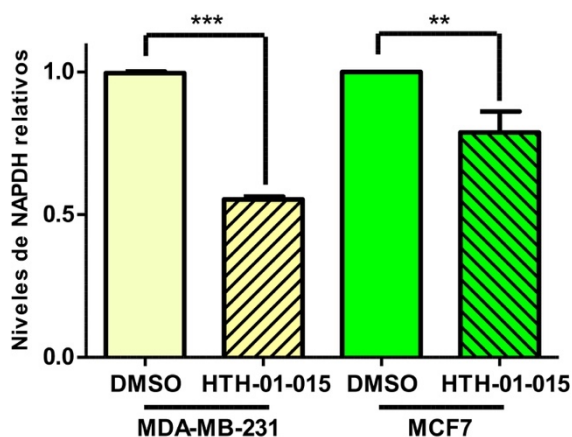


Figura 38. NUA1 afecta los niveles de NAPDH. Cuantificación de los niveles de NAPDH en células MDA-MB-231 y MCF7 tratadas con el inhibidor HTH-01-015 por 2 horas y su respectivo control (DMSO). Fuente: Elaboración propia.

4.3.3.- NUAK1 regula el estrés oxidativo.

Debido a los resultados previos que determinaron que NUAK1 interacciona, inhibe a la PFK y afecta los niveles de NADPH, esperamos que NUAK1 afecte los niveles de estrés oxidativo. Para ello, células MCF7 fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015) y el estrés oxidativo fue medido por citometría de flujo. **Con estos experimentos determinamos que NUAK1 disminuye o regula los niveles de estrés oxidativo. Ya que al utilizar el inhibidor de NUAK1 los niveles de estrés oxidativo aumentan (Fig. 39). En su conjunto, los resultados obtenidos sugirieron un nuevo mecanismo molecular cómo la quinasa NUAK1 regula el metabolismo celular y estrés oxidativo a través de la PFK1.**

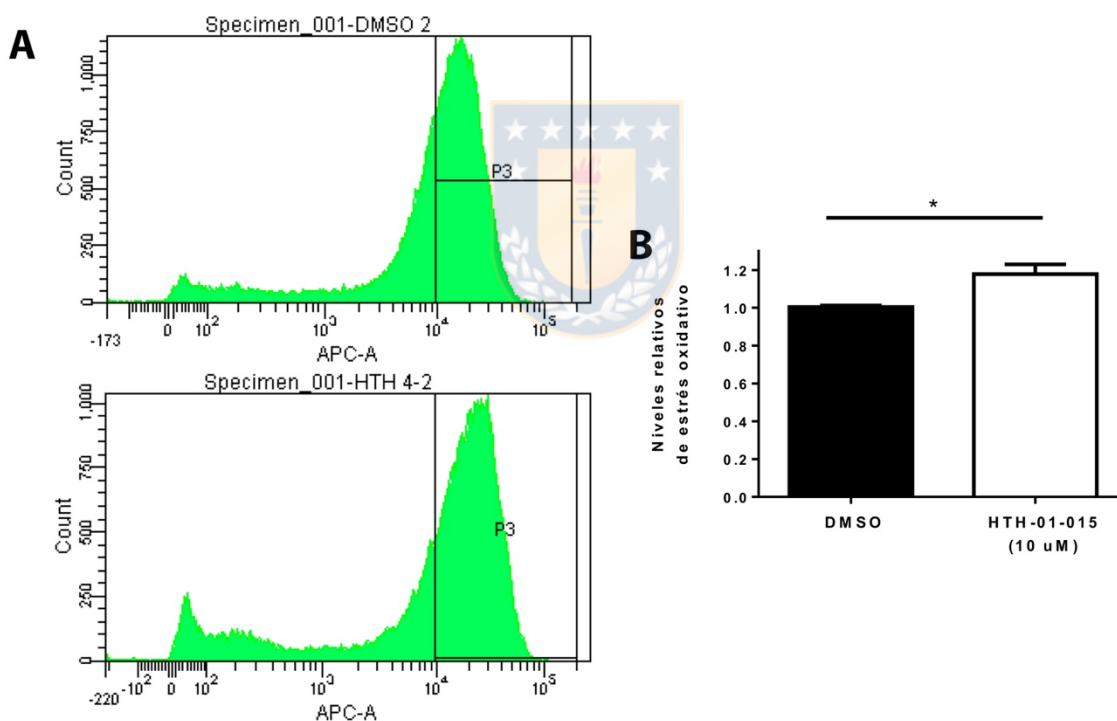


Figura 39. NUAK1 regula los niveles de estrés oxidativo. A.- Detección de los niveles de estrés oxidativo a través de citometría de flujo utilizando la sonda *Cell ROX Deep Red* en células MCF7 control (DMSO) (Superior) y tratadas con el inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015) (Inferior) por 4 horas. **B.-** Cuantificación de los niveles de estrés oxidativo obtenidos en (A) (n=2, 50.000 eventos por condición). Cada barra presenta la media y la desviación estándar. *p<0.05. *Test t-student*. Fuente: Elaboración propia.

4.4.- Resumen del objetivo 3

Los principales logros del objetivo 3 (4.3) fueron determinar que NUA1 inhibe la actividad de PFK1 afecta los niveles de NAPDH y el estrés oxidativo. Por lo tanto, el efecto de NUA1 sobre el metabolismo celular estaría mediado por la regulación de la PFK1 que afectaría el metabolismo de la glucosa hacia la vía de las pentosas para mantener los niveles de NAPDH, reducir el estrés oxidativo y promover la supervivencia celular (Fig. 40). Sin embargo, con estos datos no podemos descartar otros efectos de NUA1 en el metabolismo celular. Para testear esta idea se requieren mayores estudios que cuantifiquen el efecto de NUA1 en diferentes vías metabólicas, así como también la aplicación terapéutica de estos mecanismos. Ambas ideas son parte de una nueva hipótesis que será considerada como una proyección de nuestro trabajo que será discutida en la discusión.

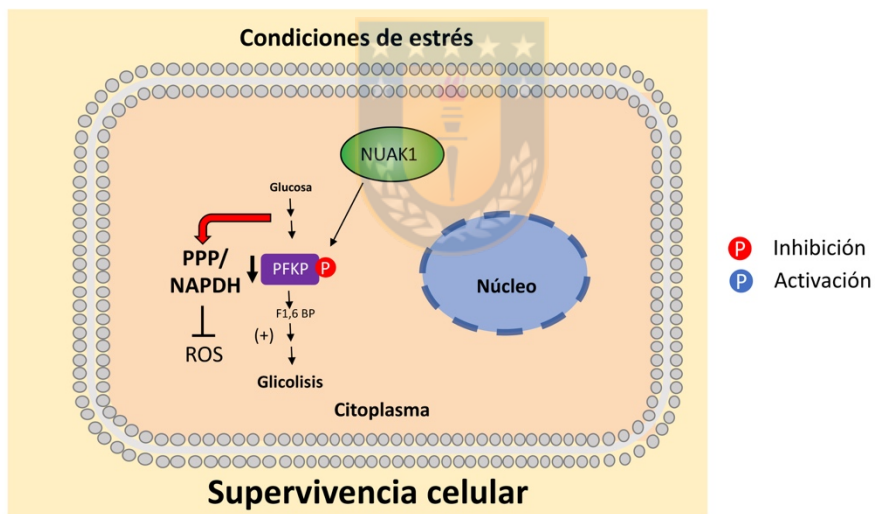


Figura 40. Esquema resumen del efecto de NUA1 en el metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo a través de la PFK1. En condiciones de estrés la quinasa NUA1 inhibe a la PFK1 afectando los niveles de NAPDH y de estrés oxidativo. Por lo tanto, proponemos que NUA1 fosforila a PFK1 la inhibe para regular el metabolismo de la glucosa hacia la vía de las pentosas cuyo objetivo sería para promover la supervivencia celular. Fuente: Elaboración propia.

5.- Discusión

Como ha sido descrito para diferentes enzimas su distribución sub-celular es crítica para la regulación de su actividad e interacción con diferentes sustratos permitiendo así su apropiada función (Huangyang & Simon, 2018). Por lo tanto, considerando que la quinasa NUA1 presenta una localización nuclear y citoplasmática se propuso que la identificación del mecanismo molecular involucrado en el transporte de NUA1 ayudará a comprender su regulación y función en diferentes contextos celulares. Utilizando análisis bioinformáticos, mutantes de NUA1, inhibidores de las importinas- β y silenciadores específicos de IPO7 y IPO9 determinamos que el transporte nuclear de NUA1 es mediado por un mecanismo de **transporte activo**. En esta área identificamos que la SLN-bipartita conservada en NUA1 murino y humano regula su transporte entre el núcleo-citosol. La SLN-bipartita presenta un *linker* de 23 aminoácidos. Las secuencias del tipo bipartita usualmente tienen un *linker* de 10-12 aminoácidos (Stewart, 2007). Sin embargo, evidencias recientes han descrito *linkers* mayores de 20 aminoácidos. Ejemplos son: la integrasa Ty1 (Lange y col., 2010), *Ribosomal RNA-Processing protein 4* (Rrp4) (Lange y col., 2010), la *Repair Scaffold XRCC1* (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*) (Kirby y col., 2015) y *Myocardin-related transcription factors* (MRTFs) (Pawłowski y col., 2010). En resumen, *linkers* mayores a 20 aminoácidos son funcionales y su existencia puede depender de su composición aminoacídica, la estructura lineal o su conformación, así como también de la(s) importina(s) involucradas.

Debido a que el dominio quinasa de NUA1 es altamente conservado en la familia de las quinasas relacionadas con AMPK, evaluamos si la SLN-bipartita es conservada en otros miembros de la familia. Cabe destacar que esta secuencia es solo conservada en NUA2 (Anexo fig. 9). En el caso de NUA2 esta tiene una SLN-monopartita que no es conservada en NUA1, por lo tanto, si la SLN-bipartita descrita para NUA1 es requerida

para el transporte nuclear de NUA2 es necesario realizar estudios adicionales. En caso de otros miembros de la familia de AMPK, es importante destacar que ha sido descrita una SLN-clásica (Suzuki y col., 2007) y una SEN en la región C-terminal de AMPK (Kazgan y col., 2010), sin embargo, no existe homología entre estas regiones y el resto de los miembros de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK (datos no se muestran). Por lo tanto, estas evidencias sustentan la relevancia de la SLN-bipartita determinada para NUA1 y además sugieren que al menos la regulación de NUA1 y NUA2 son similares.

Si nos focalizamos en la localización nuclear de NUA1, utilizando ensayos de inmunofluorescencia realizados en células HeLa determinamos que NUA1 presenta un patrón puntiforme con aparente exclusión del nucléolo. Los aminoácidos de NUA1 que confieren esta distribución nuclear no han sido descritos, sin embargo, derivado de nuestros experimentos realizados con las delecciones de NUA1 sugerimos que la región N-terminal de NUA1 estaría involucrada. Estudios previos determinaron que otras proteínas presentan un patrón similar. Ejemplos son: *Lysine Methyltransferase 2A* (ALL-1), proteínas del *spliceosoma* y proteínas del complejo *mammalian Polycomb* (Yang y col., 2015; Yano y col., 1997). Otra proteína más relacionada a NUA1 es otro miembro de la familia las quinasas relacionadas con AMPK, *Salt Inducible Kinase 1* (SIK1), la cual también presenta un patrón puntiforme nuclear en células HeLa (Al-Hakim y col., 2005). Estos antecedentes sugirieron que esta distribución nuclear no es un artefacto de la técnica utilizada y además que este patrón podría estar asociada a una función nuclear de NUA1 que hasta la fecha no ha sido determinada.

Basado en los análisis de espectrometría de masas de la purificación de FLAG-mNUA1 WT y su validación por ensayos de co-inmunoprecipitación determinamos que la importina- β 1, IPO7 y IPO9 son nuevos interactores de NUA1. La importina- β 1 es un factor

de transporte nuclear conservado que actúa en el importe nuclear (Harel & Forbes, 2004) y también como un regulador global de la mitosis (Ciciarello y col., 2004). La importina- $\beta 1$ media el importe nuclear como heterodímeros $\alpha\beta 1$ o $\beta 1\beta$ (Chook & Süel, 2011; Marfori y col., 2011). IPO7 es un miembro de las importinas- β que media el importe de varias proteínas ribosomales, histonas (Mühlhäusser y col., 2001), el activador neuronal p35 CDK5 (Qi y col., 2006), el proto-oncogen Jun (Waldmann, Wälde, & Kehlenbach, 2007) y HIF1- α (Görlich y col., 2009). IPO9 es otro miembro de las importinas- β que también media el importe de proteínas ribosomales, histonas (Mühlhäusser y col., 2001) y otras proteínas no relacionadas como; PP2A (Lubert & Sarge, 2003) y c-Jun (Waldmann y col., 2007). En esta área diversos estudios han determinado que diferentes miembros de las importinas- β reconocen cargos similares pudiendo unir las SLN como monómeros o heterodímeros ($\beta 1\beta$) evidenciando cierta conservación en el transporte nuclear. Las SLN-clásicas son principalmente reconocidas por el heterodímero- $\alpha\beta$, sin embargo, también pueden ser reconocidas por el heterodímero $\beta 1\beta$. En el caso de la IPO7 puede unir y mediar el importe del receptor de glucocorticoides (GR) a través de una SLN-clásica (Freedman & Yamamoto, 2004). Derivado de nuestros análisis de espectrometría de masas es importante descartar que no se determinaron miembros de las importinas- α en la purificación de NUA1 WT. Por lo tanto, el transporte nuclear de NUA1 es mediado por las importinas- β . Utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación, inhibidores de la importina- $\beta 1$ (IPZ) y silenciadores específicos para IPO7 o IPO9 determinamos que la importina- $\beta 1$, IPO7 y IPO9 son requeridos para el importe nuclear de NUA1, lo que a su vez nos sugirió que el heterodímero- $\beta 1\beta$ estaría involucrado en el reconocimiento de la SLN-bipartita.

El grupo del Dr. Daniel Murphy con el cual colaboramos determinó que NUA1 es requerida para el importe nuclear de NRF2 y la regulación del estrés oxidativo (Port y col., 2018). Adicionalmente, derivado de nuestros experimentos determinamos que el estrés oxidativo induce la acumulación citoplasmática de NUA1. Este efecto fue observado utilizando diversas condiciones para inducir estrés oxidativo y al menos en dos líneas celulares, lo que sustentó nuestras conclusiones. El efecto del estrés oxidativo en la localización sub-celular de NUA1 fue más dramático en las células HeLa que las MDA-MB-231, sugiriendo que el contexto genético también podría estar involucrado en la regulación de la distribución sub-celular de NUA1. Por otro lado, existen estudios donde la privación de glucosa induce la actividad de NUA1 promoviendo la supervivencia celular (Suzuki y col., 2003a). Por lo tanto, al igual que el tratamiento con peróxido de hidrogeno, la privación de glucosa indujo la acumulación citoplasmática de NUA1, efecto que fue promovido por el estrés oxidativo. No obstante, basado en estos datos no podemos excluir o descartar otras funciones de NUA1 bajo la ausencia de glucosa tales como la inhibición de la apoptosis (Suzuki y col., 2003b) o la potencial regulación del metabolismo como será discutido posteriormente.

Basado en la idea que la regulación y función de NUA1 es afectada en condiciones de estrés oxidativo es importante destacar que AMPK también facilita el importe nuclear de NRF2 pero a través de su fosforilación (Joo y col., 2016). Por lo tanto, especulamos la existencia de cooperación entre **NUA1 citoplasmático y AMPK nuclear**, promoviendo la **localización nuclear de NRF2** y la respuesta celular frente a estrés oxidativo. **Con estos datos, tampoco se puede descartar la existencia de otros mecanismos moleculares como NUA1 podría estar regulando la respuesta celular en condiciones de estrés oxidativo.**

Basado en la hipótesis que la acumulación de NUA1 en el citoplasma pueda ser un efecto específico o bien inespecífico del estrés oxidativo, es importante destacar que el transporte núcleo-citosol regulado por las importinas- β depende del ciclo de Ran o de la relación de RanGTP/RanGDP lo que afecta directamente el **transporte activo** (Harel & Forbes, 2004; Stewart, 2007). Al respecto se ha descrito que el estrés oxidativo inhibe el transporte de IPO7, afectando la localización nuclear del receptor de glucocorticoides (GR) (Hakim y col., 2013). Por lo tanto, no podemos descartar que el estrés oxidativo inhiba el importe nuclear de NUA1 por la reducción en la relación de RanGTP/RanGDP y en consecuencia inhibiendo el transporte mediado por las importinas- β .

Con respecto a un efecto genético en la distribución sub-celular de NUA1 nuestros estudios sugirieron que la expresión de la IPO7 y/o IPO9 puede afectar la localización de NUA1. Por lo tanto, en futuros estudios se puede analizar en tejidos normales/cancerosos la localización de NUA1 y la expresión de las importinas. Estos datos pueden ser de vital importancia para predecir la localización sub-celular de NUA1 y su relación en cáncer. Datos que en estudios futuros puede ser utilizados como un marcador tumoral.

En resumen, derivado del objetivo 1 se logró caracterizar el mecanismo molecular involucrado en la regulación de la localización nuclear de NUA1. Se identificó la SLN-bipartita y **3 nuevos interactores de NUA1** involucrados en su transporte nuclear. También se determinó el contexto celular involucrado en regular este transporte. Estos datos en su conjunto sugirieron que la regulación de la localización sub-celular de NUA1 es una nueva área para determinar la participación/función de NUA1 en cáncer. Con respecto a lo anterior, la localización sub-celular de NUA1 depende del tipo celular y el tejido analizado, sugiriendo funciones dependientes de la localización sub-celular de NUA1. NUA1 en el núcleo interacciona con p53 activándolo e induciendo la expresión

de p21, lo que lleva al arresto del ciclo celular (Hou y col., 2011). En caso contrario, NUA1 en el citoplasma interactúa con MYPT1, promoviendo el desprendimiento celular (Zagórska y col., 2010). Por lo tanto, utilizando las mutantes bipartitas de NUA1 validamos que NUA1 citoplasmático induce la migración celular, una de las principales funciones descritas para NUA1. Con estos datos se avaló la idea de la existencia de diferentes funciones de NUA1 dependiendo de su localización sub-celular.

En general, los datos obtenidos en los experimentos de la espectrometría de masas nos permitieron sugerir que la función y regulación de NUA1 es dependiente de su localización sub-celular. Utilizando estos datos determinamos nuevos interactores nucleares y citoplasmáticos de NUA1. Con estos datos sumado a diversos análisis bioinformáticos se pudo **predecir** diferentes funciones de NUA1 a través de sus interactores. También dependiendo de las necesidades de nuestra investigación se pueden realizar diferentes análisis de los datos de espectrometría de masas para determinar cómo varían los potenciales interactores de NUA1 en condiciones normales versus condiciones de estrés o bien cómo cambian los interactores dependiendo de la localización sub-celular de NUA1. **Por lo tanto, de nuestros datos se espera validar y/o caracterizar varios nuevos interactores de NUA1 lo que generará diferentes proyectos de investigación para nuestro laboratorio.**

En el caso de los interactores nucleares validados, **hnRNPK** se encuentra asociada al procesamiento del ARN y otras funciones (Bomsztyk y col., 2004). Esta función no ha sido descrita para NUA1. A pesar de ello, el patrón puntiforme de NUA1 nuclear ha sido observado en otras proteínas que participan en el *splicing* e incluso en el análisis de la localización de ARN poly (A) (Pawellek y col., 2017). En esta área SIK1 que también tiene este patrón puntiforme en el núcleo regula la actividad de StAR regulando el procesamiento

del ARN (J. Lee y col., 2016). Además, derivado de nuestros análisis determinamos que hnRNPK podría ser un nuevo blanco de NUA1. Actualmente, existe evidencia que la fosforilación en el residuo serina 302 (ser-302) de hnRNPK, promueve su interacción con diferentes *partners* afectando su actividad (Yongjie y col., 2019). En cuanto a la fosforilación del residuo serina 89 (ser-89) se desconoce su función, sin embargo, se localiza en el dominio KH1 (dominio de unión al ARN), por lo tanto, se puede inferir que afectaría su función. Por otro lado, es importante destacar que hnRNPU2 también fue sugerido como un potencial interactor y blanco de NUA1. No obstante, se requiere de su validación. En efecto, el procesamiento del ARN es crucial para promover la tumorigénesis (El Marabti & Younis, 2018). **Por estos motivos validar el efecto de NUA1 en el procesamiento del ARN a través de hnRNPK y/o hnRNPU2, así como su potencial fosforilación es una nueva área de investigación para nuestro laboratorio que será analizado en futuros estudios.**



Con respecto a los interactores citoplasmáticos se determinó que NUA1 afecta el metabolismo de la glucosa. Como se mencionó anteriormente, existe solo una evidencia que determinó que NUA1 promueve la actividad mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo molecular involucrado no ha sido determinado. Por lo tanto, la validación de los interactores asociados al metabolismo de la glucosa describió la primera evidencia experimental de mecanismos moleculares que involucran a NUA1 con la regulación de metabolismo celular, lo que podría estar directamente relacionado al efecto de NUA1 en la actividad mitocondrial. Con respecto a los interactores asociados al metabolismo de la glucosa es importante destacar que la regulación y funciones no-canónicas de PGK1 no han sido muy estudiadas. A pesar de ello, la fosforilación y regulación de esta enzima cada vez cobra mayor importancia, ya que determinan la regulación de su localización sub-celular, así como también sus funciones no-canónicas (Huangyang & Simon, 2018; X. Li y col., 2016). Basado

en nuestros datos determinamos que NUAk1 interacciona con PGK1 y que potencialmente podría fosforilarla en el residuo serina 174 (ser-174). La fosforilación en este residuo ha sido previamente detectada (*phosphosite*), pero se desconoce su efecto sobre PGK1. Por lo tanto, en estudios futuros se espera determinar si NUAk1 fosforila a PGK1 y afecta su localización y/o actividad.

En el caso de PFK1 determinamos que NUAk1 interacciona con las 3 isoformas, las inhibe y tiene potenciales sitios de fosforilación. **Estos datos resultaron de gran importancia ya que nos sugiere que la regulación de NUAk1 sobre la PFK1 es independiente de la isoforma, sino que depende del contexto celular.** Con respecto a lo anterior, nuestros datos determinaron que la interacción de NUAk1 con PFK1 es modulada por la condición celular que regula la localización sub-celular de NUAk1. En esta área la privación de glucosa activa a NUAk1 (Suzuki y col., 2003a) y afecta su localización. Lo que contrasta con la reconstitución de glucosa que inhibe a NUAk1 en células secretoras de insulina (Santo-Domingo y col., 2019). Complementario a estas evidencias, en músculo *KO (Knockout)* para NUAk1 se inhibe el consumo de glucosa a través de la regulación negativa de la vía de la insulina (Inazuka y col., 2012). **En conjunto, todas estas evidencias sustentan nuestros resultados sugiriendo que NUAk1 afecta el metabolismo de la glucosa a través de la regulación de la PFK1. Esta regulación dependería de la condición celular que afecta la activación y/o la localización sub-celular de NUAk1.**

La regulación de la PFK1 ha sido mayormente asociada a alosterismo (Hasawi, Alkandari, & Luqmani, 2014), sin embargo, la fosforilación e inhibición de esta proteína en estrés o bien la fosforilación y estimulación por factores de crecimiento cada vez cobra mayor importancia. Basado en lo anterior, ULK1 fosforila e inhibe a la Fosfofructoquinasa-

1 frente a la ausencia de aminoácidos (T. Y. Li y col., 2016). En cuanto a CDK6, fosforila e inhibe a la PFK1 debido a que afecta su oligomerización (Wang y col., 2017). Basado en las predicciones de fosforilación y el efecto de NUAK1 sobre la PFK1 proponemos que NUAK1 podría fosforilar a PFK1 en la Thr-313. **Según nuestros análisis este residuo podría ser crucial para la oligomerización de PFK1 y su actividad.** A diferencia de la ser-386 que la activa. Por lo tanto, en estudios futuros se espera determinar si NUAK1 afecta la fosforilación de la Thr-313 y oligomerización de PFK1. Otro aspecto importante a considerar en la regulación PFK1 es su localización sub-celular. En esta área, se ha descrito que la asociación de PFK1 con el citoesqueleto es crucial para su función (Hasawi y col., 2014). Así como también su localización en la mitocondria (Zhou y col., 2018). Por lo tanto, no podemos descartar que NUAK1 regule la actividad de PFK1 afectando su localización. Todos estos aspectos esperan ser evaluados para caracterizar el mecanismo molecular como NUAK1 regula el metabolismo celular a través de la PFK1.

Con respecto al efecto de otros miembros de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK en la regulación metabolismo de la glucosa, es necesario destacar el efecto de AMPK a través de la fosforilación de PFK2. PFK2 o 6-Fosfofructo-2-quinasa es una enzima responsable de la síntesis de Fructosa 2,6-bifosfato, un potente estimulador de la glicolisis (Marsin y col., 2000). La fosforilación de AMPK ocurre en la serina 466 (Ser-466) induciendo su actividad fosfatasa, por lo tanto, inhibiendo la síntesis de Fructosa 2,6-bifosfato el activador alostérico de PFK1 (Marsin y col., 2000). Este efecto es indirecto y diferente a lo que se propone para NUAK1 que es una **regulación directa sobre PFK1**. No obstante, al igual que lo planteado en la regulación del estrés oxidativo proponemos la existencia de una cooperación entre NUAK1 y AMPK para inhibir la PFK1 a través de diferentes mecanismos lo que permitirá regular la homeostasis en condiciones de estrés y de este modo promover la supervivencia celular. De hecho, la inhibición de la PFK1 por AMPK (indirecta) o NUAK1 (directa) son otros mecanismos para regular el estrés oxidativo.

Los datos obtenidos en el objetivo 3 determinaron un efecto de NUA1 en la actividad y función de PFK1, sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para evaluar y cuantificar el efecto de NUA1 en el metabolismo de la glucosa. Dependiendo del tipo de experimento se pueden cuantificar los metabolitos o bien cuantificar la activación de diferentes vías metabólicas. Para cuantificar la activación de las diferentes vías metabólicas se debe utilizar glucosa u otro metabolito marcado radioactivamente. No obstante, ambos experimentos forman parte de una nueva área de investigación conocida como **metabolómica**, que se caracteriza por el uso de espectrometría de masas acoplada a HPLC (Jang, Chen, & Rabinowitz, 2018). En nuestro caso estos experimentos se realizarán en colaboración con el Dr. Daniel Murphy, Universidad de Glasgow, Reino Unido, utilizando los modelos estables inducibles (Anexo fig. 6) y el inhibidor de NUA1 (HTH-01-015). Con estos modelos se analizará como se afecta el metabolismo de glucosa hacia la vía de las pentosas a través del uso de 1,2-¹³C Glucosa.

En esta área de manera indirecta y no focalizada en el metabolismo de la glucosa sino mas bien como control del efecto de NUA1 en la actividad mitocondrial nuestro colaborador el Dr. Daniel Murphy determinó que NUA1 no tiene un efecto significativo en los niveles de glucosa, piruvato ni lactato (Anexo fig. 8B). Sin embargo, los niveles de 6-fosfogluconato y glicerol-3-fosfato disminuyen por el silenciamiento de NUA1 en células U2OS (Anexo fig. 8B). Estos datos sustentan nuestros resultados y hipótesis. A pesar de ello, es necesario realizar estos experimentos en nuestros modelos y utilizando **1,2-¹³C Glucosa** que permitirá la cuantificación de la glicólisis y la vía de las pentosas simultáneamente. En resumen, toda la evidencia entregada sugiere que NUA1 es un nuevo regulador del metabolismo de la glucosa y la vía de las pentosas. La vía de las pentosas consta de dos etapas, la oxidativa y no oxidativa (Fig. 41A). Por lo tanto, evaluamos si en los datos de espectrometría de masas se detectaron péptidos de proteínas

que participan en la vía de las pentosas. Con respecto a lo anterior, se identificó que 6-fosfoglucolactonasa (6PGL o *Pgls*, nombre del gen) y la transketolasa (TKT) son potenciales interactores de NUAK1 (Fig. 45B). 6PGL, participa en la vía oxidativa y TKT en la no oxidativa (Fig. 41A). Adicionalmente, ambas presentan potenciales sitios de fosforilación para NUAK1 (Fig. 41C). Con estos datos en estudios futuros se espera determinar si NUAK1 interacciona y/o regula la actividad de 6PGL y/o TKT, determinando un efecto directo sobre la vía de las pentosas complementario a nuestros datos. Por lo tanto, en estudio futuros se espera evaluar la interacción y efecto de NUAK1 sobre estas enzimas. Estos datos sustentarían la relevancia de NUAK1 en la regulación de esta vía metabólica.

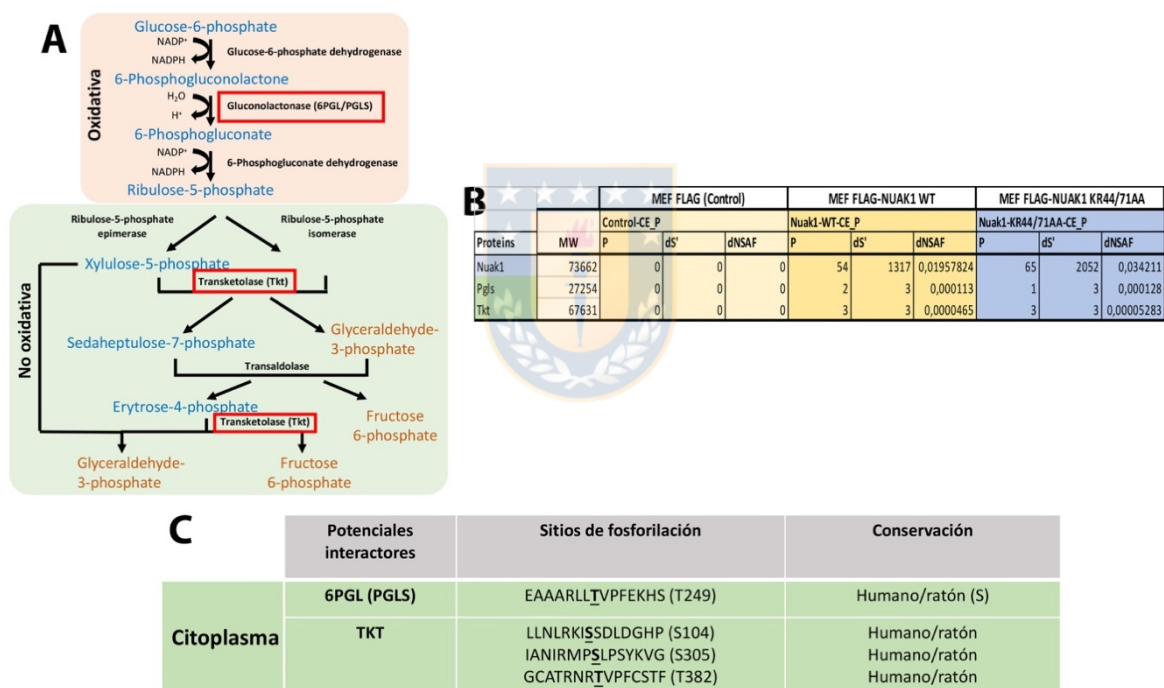


Figura 41. 6PGL (*Pgls*) y TKT son nuevos potenciales interactores y blancos de NUAK1 asociados a la vía de las pentosas. A.- Representación esquemática de la vía de las pentosas. En naranja, la etapa oxidativa. En verde, la etapa no oxidativa. **B.-** Tabla que muestra el conteo total de péptidos (P), el conteo de la distribución espectral (dS) y la distribución del factor de abundancia espectral normalizado (dNSAF) para cada proteína que participa en la vía de las pentosas identificada en la purificación de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA murino (n=3). CE: Extracto citoplasmático **C.-** Representación esquemática de los dos principales sitios de fosforilación para NUAK1 en 6PGL (*Pgls*) y TKT. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, nuestros resultados nos sugieren que NUA1 tiene un efecto similar a CDK6 sobre PFK1 y el metabolismo celular. En esta área CDK6 es una quinasa reguladora del ciclo celular que inhibe a la PFK1 a través de su fosforilación reprogramando el metabolismo de la glucosa a la vía de las pentosas, aumentando los niveles de NADPH, reduciendo los niveles de estrés oxidativo y promoviendo la supervivencia celular (N. H. Kim y col., 2017; Li y col., 2016; Wang y col., 2017). **Por lo tanto, las funciones de NUA1 y CDK6 son similares, sin embargo, los modelos utilizados son diferentes.** En este sentido, la inhibición de CDK6 y su efecto de sobre PFK1 que afecta la reprogramación metabólica fue determinado en células de leucemia (Wang y col., 2017). Este efecto no ocurre en células de cáncer de mama ni glioblastoma (Wang y col., 2017). En cambio, la interacción de NUA1 y PFKP, así como su regulación la hemos descrito en cáncer de mama. Complementario a lo anterior, análisis de expresión de NUA1 y CDK6 en diferentes líneas celulares de cáncer realizados en *Cancer cell line encyclopedia* (CCLE), sugieren que existen líneas celulares que expresan sólo NUA1, sólo CDK6 o ambas (Fig. 42A-B). Al clasificar los datos se puede observar que NUA1 se expresa principalmente en células de cáncer de mama y CDK6 en leucemia (Fig. 42C-E). En cambio, en otras células (la mayoría) derivadas de otros tipos de canceres como cáncer colorectal o glioblastoma expresan ambas proteínas (Fig. 42F).

Por estos motivos como proyección sugerimos que la función de NUA1 y/o CDK6 son crucial(es) para la regulación de PFK1 y la reprogramación metabólica dependiendo del tipo de cáncer. **Lo que podría ser utilizado como una posible aproximación terapéutica.** Sustentando lo anterior, existe un inhibidor conocido como **ON-123300** que inhibe a CDK4/CDK6 y NUA1 (Perumal y col., 2016; X. Zhang y col., 2014). Este inhibidor ha sido eficiente en inducir la muerte celular en glioblastoma y en leucemia (Perumal y col., 2016; X. Zhang y col., 2014). **Por lo tanto, nos preguntamos si la inhibición de NUA1,**

CDK6 o ambas es una mejor aproximación terapéutica o bien si el uso de uno u otro depende del tipo de cáncer o del contexto celular. Actualmente, el uso de terapias combinadas a los inhibidores de CDK4/CDK6 han cobrado gran importancia en la comunidad científica debido al alto número de tipos de cánceres que presentan resistencia al tratamiento (Knudsen & Witkiewicz, 2017). Por lo tanto, esta idea nos sugiere nuevas hipótesis y proyecciones a nuestro trabajo focalizada en la aplicación terapéutica de la inhibición de NUA1 y/o CDK6 en cáncer a través de la modulación del metabolismo celular lo que dependería del tipo de cáncer analizado. Complementario a lo anterior, la relevancia fisiológica de las funciones de NUA1 tampoco han sido ampliamente estudiadas, por lo tanto, con nuestros análisis se espera determinar las funciones de NUA1 en condiciones normales las que se podrían ser similares o bien contrastar con las funciones en cáncer.



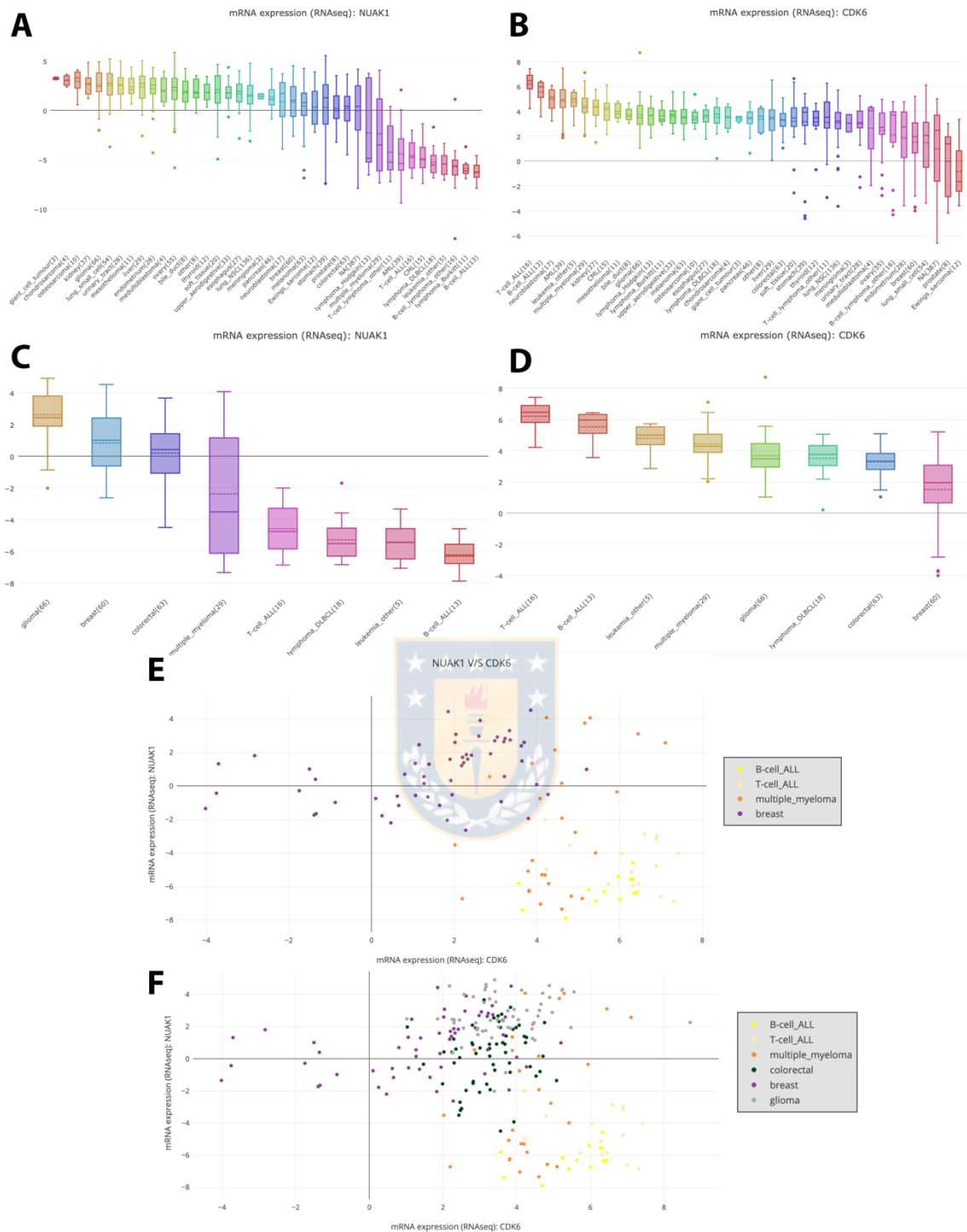


Figura 42. Análisis de la expresión de NUA1 y CDK6 en diferentes líneas celulares de cáncer. A-D.- Niveles de expresión de ARN mensajero de NUA1 y CDK6 en diferentes líneas celulares de cánceres. **E-F.-** Correlación de los niveles de expresión de NUA1 y CDK6 en B-cell, T-cell, Mielona múltiple y Cáncer de mama (E), Cáncer colorectal y Glioma (F). Fuente: Elaboración propia.

6.- Conclusiones generales

En resumen, nuestro trabajo determinó nuevos mecanismos moleculares involucrados en la regulación y función de la quinasa NUA1. Estos datos en su conjunto ayudarán a determinar la relevancia de NUA1 en cáncer, así como su potencial aplicación terapéutica asociada a la inhibición de NUA1 y/o CDK6. A continuación, se enumeran las principales conclusiones de cada objetivo.

Objetivo 1:

- 1.- NUA1 tiene una SLN-bipartita conservada que medía su importe al núcleo.
- 2.- La importina- β 1, IPO7 y IPO9 son nuevos interactores de NUA1 involucrados en reconocer y mediar su transporte nuclear.
- 3.- El estrés oxidativo induce la acumulación citoplasmática de NUA1.
- 4.- La expresión de IPO7 y/o IPO9 podrían regular la localización sub-celular de NUA1 en cáncer.

Objetivo 2

- 5.- NUA1 dependiendo de su localización puede promover diferentes funciones como el procesamiento del ARN y el metabolismo de la glucosa.
- 6.- hnRNPK es un nuevo interactor nuclear y potencial blanco de NUA1.
- 7.- NUA1 nuclear puede regular el procesamiento del ARN a través de hnRNPK.
- 8.- PGK1 es un nuevo interactor citoplasmático de NUA1.
- 9.- Las 3 isoformas de la Fosfofructoquinasa-1 (PFKP, PFKM y PFKM) son nuevos interactores y potenciales blancos citoplasmáticos de NUA1.
- 10.- La interacción de PFKP y NUA1 es regulada por el contexto celular que afecta la localización sub-celular de NUA1.

Objetivo 3

- 11.- NUA1 inhibe la actividad de la Fosfofructoquinasa y afecta los niveles de NAPDH.
- 12.- NUA1 es un nuevo regulador del metabolismo celular.
- 13.- NUA1 afecta los niveles de estrés oxidativo.

7.- Agradecimientos

Primero, agradecer a los diferentes fondos de financiamiento que permitieron el desarrollo de esta tesis. Entre ellos se encuentran los proyectos FONDECYT regulares N° 1160731 y N° 1151031, adjudicados por el Dr. Ariel Castro y la Dra. Roxana Pincheira, respectivamente. A CONICYT por los fondos que permitieron la manutención, la compra de reactivos a través de los gastos operacionales N° 21140548, la beca de asistencia a eventos y también la beca de pasantía internacional. A la dirección de postgrado por su apoyo para la asistencia a congresos internacionales y manutención durante los últimos meses.

En el ámbito profesional agradecer a todos los miembros del laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer (TSC lab). En especial al tutor de esta tesis el Dr. Ariel Castro, por todo su apoyo y guía entregada en esta etapa de formación. A la Dra. Tamaki Suganuma y el Dr. Jerry Workman por brindarme la oportunidad de trabajar y conocer otra realidad científica, así como también ayudar en mi formación profesional.

En el ámbito personal, agradecer principalmente a mi familia por su apoyo y soporte en esta etapa. En especial a mis padres y a Elizabeth por su apoyo incondicional en los momentos buenos y malos. Sin su sustento y apoyo finalizar esta etapa con éxito no hubiera sido posible. Por lo tanto, este logro y todos mis logros también son suyos.

8.- Bibliografia

- Al-Hakim, A. K., Göransson, O., Deak, M., Toth, R., Campbell, D. G., Morrice, N. A., ... Alessi, D. R. (2005). 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *Journal of Cell Science*, *118*(23), 5661 LP-5673. <https://doi.org/10.1242/jcs.02670>
- Bell, R. E., Khaled, M., Netanel, D., Schubert, S., Golan, T., Buxbaum, A., ... Levy, C. (2014). Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUAK1. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(2), 441–451. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.340>
- Bomsztyk, K., Denisenko, O., & Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: One protein multiple processes. *BioEssays*, *26*(6), 629–638. <https://doi.org/10.1002/bies.20048>
- Bright, N. J., Thornton, C., & Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *196*(1), 15–26. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01971.x>
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, *11*, 85. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Chang, X.-Z., Yu, J., Liu, H.-Y., Dong, R.-H., & Cao, X.-C. (2012). ARK5 is associated with the invasive and metastatic potential of human breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *138*(2), 247–254. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-1102-1>
- Chen, P., Li, K., Liang, Y., Li, L., & Zhu, X. (2013). High NUAK1 expression correlates with poor prognosis and involved in NSCLC cells migration and invasion. *Experimental Lung Research*, *39*(1), 9–17. <https://doi.org/10.3109/01902148.2012.744115>
- Chook, Y. M., & Suel, K. E. (2011). Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta*, *1813*(9), 1593–1606. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.014>
- Chook, Y. M., & Süel, K. E. (2011). Nuclear import by karyopherin-βs: recognition and inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1813*(9), 1593–1606. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.014>
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Thibier, C., Guarguaglini, G., Marchetti, E., Di Fiore, B., & Lavia, P. (2004). Importin β is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, *117*(26), 6511 LP-6522. <https://doi.org/10.1242/jcs.01569>
- Cui, J., Yu, Y., Lu, G.-F., Liu, C., Liu, X., Xu, Y.-X., & Zheng, P.-Y. (2013). Overexpression

- of ARK5 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(3), 1913–1918. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0735-x>
- Da Cruz, S., & Cleveland, D. W. (2016). Disrupted nuclear import/export in neurodegeneration. *HHS Public Access*, 351(6269), 125–126. <https://doi.org/10.1126/science.aad9872>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- El Marabti, E., & Younis, I. (2018). The Cancer Spliceome: Reprogramming of Alternative Splicing in Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 80. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00080>
- Florens, L., & Washburn, M. P. (2006). Proteomic Analysis by Multidimensional Protein Identification Technology. In *New and Emerging Proteomic Techniques* (pp. 159–175). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-026-X:159>
- Flores, K., & Seger, R. (2013). Stimulated nuclear import by β -like importins. *F1000prime Reports*, 5, 41. <https://doi.org/10.12703/P5-41>
- Freedman, N. D., & Yamamoto, K. R. (2004). Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2276–2286. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0839>
- Gallardo, M., Hornbaker, M. J., Zhang, X., Hu, P., Bueso-Ramos, C., & Post, S. M. (2016). Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(12), 1552–1557. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1164372>
- Görlich, D., Mingot, J.-M., Chachami, G., Simos, G., Paraskeva, E., & Braliou, G. G. (2009). Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(2), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.093>
- Hakim, A., Barnes, P. J., Adcock, I. M., & Usmani, O. S. (2013). Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity. *The FASEB Journal*, 27(11), 4510–4519. <https://doi.org/10.1096/fj.12-222604>
- Hanahan D & Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. **144** (2011).
- Hardie, D. G., Ross, F. a, & Hawley, S. a. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>

- Harel, A., & Forbes, D. J. (2004). Importin Beta: Conducting a Much Larger Cellular Symphony. *Molecular Cell*, 16(3), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.026>
- Hasawi, N. Al, Alkandari, M. F., & Luqmani, Y. A. (2014). Phosphofructokinase: A mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 92(3), 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.05.007>
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Mäkelä, T. P., ... Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, 2(4), 28. <https://doi.org/10.1186/1475-4924-2-28>
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews. Cancer*, 16(10), 635–649. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>
- Hou, X., Liu, J.-E., Liu, W., Liu, C.-Y., Liu, Z.-Y., & Sun, Z.-Y. (2011). A new role of NUA1: directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation. *Oncogene*, 30, 2933. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/onc.2011.19>
- Huangyang, P., & Simon, M. C. (2018). Hidden features: exploring the non-canonical functions of metabolic enzymes. *Disease Models & Mechanisms*, 11(8). <https://doi.org/10.1242/dmm.033365>
- Inazuka, F., Sugiyama, N., Tomita, M., Abe, T., Shioi, G., & Esumi, H. (2012). Muscle-specific knock-out of NUA family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16379–16389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302687>
- Jang, C., Chen, L., & Rabinowitz, J. D. (2018). Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*, 173(4), 822–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.055>
- Jeon, S.-M., Chandel, N. S., & Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485(7400), 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature11066>
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537–548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>
- Joo, M. S., Kim, W. D., Lee, K. Y., Kim, J. H., Koo, J. H., & Kim, S. G. (2016). AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Molecular and Cellular Biology*, 36(14), 1931–1942. <https://doi.org/10.1128/MCB.00118-16>

- Kazgan, N., Williams, T., Forsberg, L. J., & Brenman, J. E. (2010). Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 21(19), 3433–3442. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-04-0347>
- Kim, N. H., Cha, Y. H., Lee, J., Lee, S.-H., Yang, J. H., Yun, J. S., ... Kim, H. S. (2017). Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. *Nature Communications*, 8, 14374. <https://doi.org/10.1038/ncomms14374>
- Kim, Y. H., Han, M.-E., & Oh, S.-O. (2017). The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anatomy & Cell Biology*, 50(2), 77. <https://doi.org/10.5115/acb.2017.50.2.77>
- Kirby, T. W., Gassman, N. R., Smith, C. E., Pedersen, L. C., Gabel, S. A., Sobhany, M., ... London, R. E. (2015). Nuclear Localization of the DNA Repair Scaffold XRCC1: Uncovering the Functional Role of a Bipartite NLS. *Scientific Reports*, 5, 13405. <https://doi.org/10.1038/srep13405>
- Knudsen, E. S., & Witkiewicz, A. K. (2017). The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. *Trends in Cancer*, 3(1), 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.006>
- Kobayashi, J., & Matsuura, Y. (2013). Structural Basis for Cell-Cycle-Dependent Nuclear Import Mediated by the Karyopherin Kap121p. *Journal of Molecular Biology*, 425(11), 1852–1868. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.035>
- Kodiha, M., Chu, A., Matusiewicz, N., & Stochaj, U. (2004). Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress. *Cell Death And Differentiation*, 11, 862. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401432>
- Kuga, W., Tsuchihara, K., Ogura, T., Kanehara, S., Saito, M., Suzuki, A., & Esumi, H. (2008). Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(4), 1062–1066. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.143>
- Lai, M. C., Lin, R. I., & Tarn, W. Y. (2001). Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10154–10159. <https://doi.org/10.1073/pnas.181354098>
- Lange, A., McLane, L. M., Mills, R. E., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2010). Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. *Traffic (Copenhagen,*

- Denmark), 11(3), 311–323. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01028.x>
- Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Süel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z., & Chook, Y. M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell*, 126(3), 543–558. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.049>
- Lee, J.-H., Liu, R., Li, J., Wang, Y., Tan, L., Li, X.-J., ... Lu, Z. (2018). EGFR-Phosphorylated Platelet Isoform of Phosphofructokinase 1 Promotes PI3K Activation. *Molecular Cell*, 70(2), 197–210.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.018>
- Lee, J.-H., Liu, R., Li, J., Zhang, C., Wang, Y., Cai, Q., ... Lu, Z. (2017). Stabilization of phosphofructokinase 1 platelet isoform by AKT promotes tumorigenesis. *Nature Communications*, 8(1), 949. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00906-9>
- Lee, J., Tong, T., Duan, H., Foong, Y. H., Musaitif, I., Yamazaki, T., & Jefcoate, C. (2016). Regulation of StAR by the N-terminal Domain and Coinduction of SIK1 and TIS11b/Znf3611 in Single Cells. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 107. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00107>
- Li, T. Y., Sun, Y., Liang, Y., Liu, Q., Shi, Y., Zhang, C.-S., ... Lin, S.-C. (2016). ULK1/2 Constitute a Bifurcate Node Controlling Glucose Metabolic Fluxes in Addition to Autophagy. *Molecular Cell*, 62(3), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.009>
- Li, X., Jiang, Y., Meisenhelder, J., Yang, W., Hawke, D. H., Zheng, Y., ... Lu, Z. (2016). Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Molecular Cell*, 61(5), 705–719. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.009>
- Liu, L., Ulbrich, J., Müller, J., Wüstefeld, T., Aeberhard, L., Kress, T. R., ... Murphy, D. J. (2012). Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5. *Nature*, 483(7391), 608–612. <https://doi.org/10.1038/nature10927>
- Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., ... Alessi, D. R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO Journal*, 23(4), 833–843. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600110>
- Lu, J., & Gao, F.-H. (2016). Role and molecular mechanism of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development and progression. *Biomedical Reports*, 4(6), 657–663. <https://doi.org/10.3892/br.2016.642>
- Lu, S., Niu, N., Guo, H., Tang, J., Guo, W., Liu, Z., ... Zhang, B. (2013a). ARK5 promotes glioma cell invasion, and its elevated expression is correlated with poor clinical

- outcome. *European Journal of Cancer*, 49(3), 752–763.
<https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2012.09.018>
- Lubert, E. J., & Sarge, K. D. (2003). Interaction between protein phosphatase 2A and members of the importin β superfamily. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(3), 908–913. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00434-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00434-0)
- Luengo, A., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G. (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chemical Biology*, 24(9), 1161–1180.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.028>
- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F. W., Curmi, P. M., ... Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1562–1577. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.013>
- Marsin, A.-S., Bertrand†, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent‡, M. F., ... Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology*, 10(20), 1247–1255.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00742-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00742-9)
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14, 113. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.1>
- Mor, I., Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2011). Control of Glycolysis through Regulation of PFK1: Old Friends and Recent Additions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 211–216. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010868>
- Obayashi, M., Yoshida, M., Tsunematsu, T., Ogawa, I., Sasahira, T., Kuniyasu, H., ... Takata, T. (2016). microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer. *Oncotarget*, 7(7), 8223–8239. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6972>
- Palma M, Riffo EN, Sukanuma T, Washburn MP, Workman JL, Pincheira R., & Castro AF. (2019). Identification of a nuclear localization signal and importin beta members mediating NUA1 nuclear import inhibited by oxidative stress. *J Cell Biochem*, 1-20.
<https://doi.org/10.1002/jcb.28890>
- Patra, K. C., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.005>

- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pawellek, A., Ryder, U., Tammsalu, T., King, L. J., Kreinin, H., Ly, T., ... Lamond, A. I. (2017). Characterisation of the biflavonoid hinokiflavone as a pre-mRNA splicing modulator that inhibits SENP. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.27402>
- Pawłowski, R., Rajakylä, E. K., Vartiainen, M. K., & Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO Journal*, 29(20), 3448–3458. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.216>
- Perumal, D., Kuo, P.-Y., Leshchenko, V. V., Jiang, Z., Divakar, S. K. A., Cho, H. J., ... Parekh, S. (2016). Dual Targeting of CDK4 and ARK5 Using a Novel Kinase Inhibitor ON123300 Exerts Potent Anticancer Activity against Multiple Myeloma. *Cancer Research*, 76(5), 1225–1236. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2934>
- Phippen, N. T., Bateman, N. W., Wang, G., Conrads, K. A., Ao, W., Teng, P.-N., ... Conrads, T. P. (2016). NUA1 (ARK5) Is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6, 213. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00213>
- Port, J., Muthalagu, N., Raja, M., Ceteci, F., Monteverde, T., Kruspig, B., ... Murphy, D. J. (2018). Colorectal Tumors Require NUA1 for Protection from Oxidative Stress. *Cancer Discovery*, 8(5), 632–647. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0533>
- Qi, R. Z., Cheung, N. S., Choi, Y.-K., Fu, X., Yu, Y., & Qu, D. (2006). Identification of Nuclear Import Mechanisms for the Neuronal Cdk5 Activator. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39014–39021. <https://doi.org/10.1074/jbc.m512663200>
- Raymond W. Ruddon (2007). **Cancer Biology**. 4ª Edición. Oxford University. ISBN-13: 978-0-19-517543-1
- Santo-Domingo, J., Galindo, A. N., Cominetti, O., De Marchi, U., Cutillas, P., Dayon, L., & Wiederkehr, A. (2019). Glucose-dependent phosphorylation signaling pathways and crosstalk to mitochondrial respiration in insulin secreting cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 17(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0326-6>
- Shi, L., Zhang, B., Sun, X., Lu, S., Liu, Z., Liu, Y., ... Zhao, C. (2014). MiR-204 inhibits human NSCLC metastasis through suppression of NUA1. *British Journal of Cancer*, 111(12), 2316–2327. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.580>
- Soderholm, J. F., Bird, S. L., Kalab, P., Sampathkumar, Y., Hasegawa, K., Uehara-Bingen, M., ... Heald, R. (2011). Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β . *ACS Chemical Biology*, 6(7), 700–708. <https://doi.org/10.1021/cb2000296>

- Stewart, M. (2007a). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 195–208. <https://doi.org/10.1038/nrm2114>
- STOCHAJ, U., RASSADI, R., & CHIU, J. (2000). Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p. *The FASEB Journal*, 14(14), 2130–2132. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0751fje>
- Suzuki, A., Kusakai, G.-I., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., & Esumi, H. (2003). ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene*, 22(40), 6177–6182. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206899>
- Suzuki, A., Kusakai, G. I., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., Lavin, M. F., & Esumi, H. (2003). Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 48–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206025200>
- Suzuki, A., Okamoto, S., Lee, S., Saito, K., Shiuchi, T., & Minokoshi, Y. (2007). Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), 4317–4327. <https://doi.org/10.1128/MCB.02222-06>
- Tran, M. T. N., Tanaka, J., Hamada, M., Sugiyama, Y., Sakaguchi, S., Nakamura, M., ... Miwa, Y. (2014). In vivo image analysis using iRFP transgenic mice. *Experimental Animals*, 63(3), 311–319. <https://doi.org/10.1538/expanim.63.311>
- van der Watt, P. J., Ngarande, E., & Leaner, V. D. (2011). Overexpression of Kpnβ1 and Kpnα2 importin proteins in cancer derives from deregulated E2F activity. *PloS One*, 6(11), e27723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027723>
- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168(4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Waldmann, I., Wälde, S., & Kehlenbach, R. H. (2007). Nuclear Import of c-Jun Is Mediated by Multiple Transport Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27685–27692. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/282/38/27685.abstract>
- Wang, H., Nicolay, B. N., Chick, J. M., Gao, X., Geng, Y., Ren, H., ... Sicinski, P. (2017). The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*, 546(7658), 426–430. <https://doi.org/10.1038/nature22797>

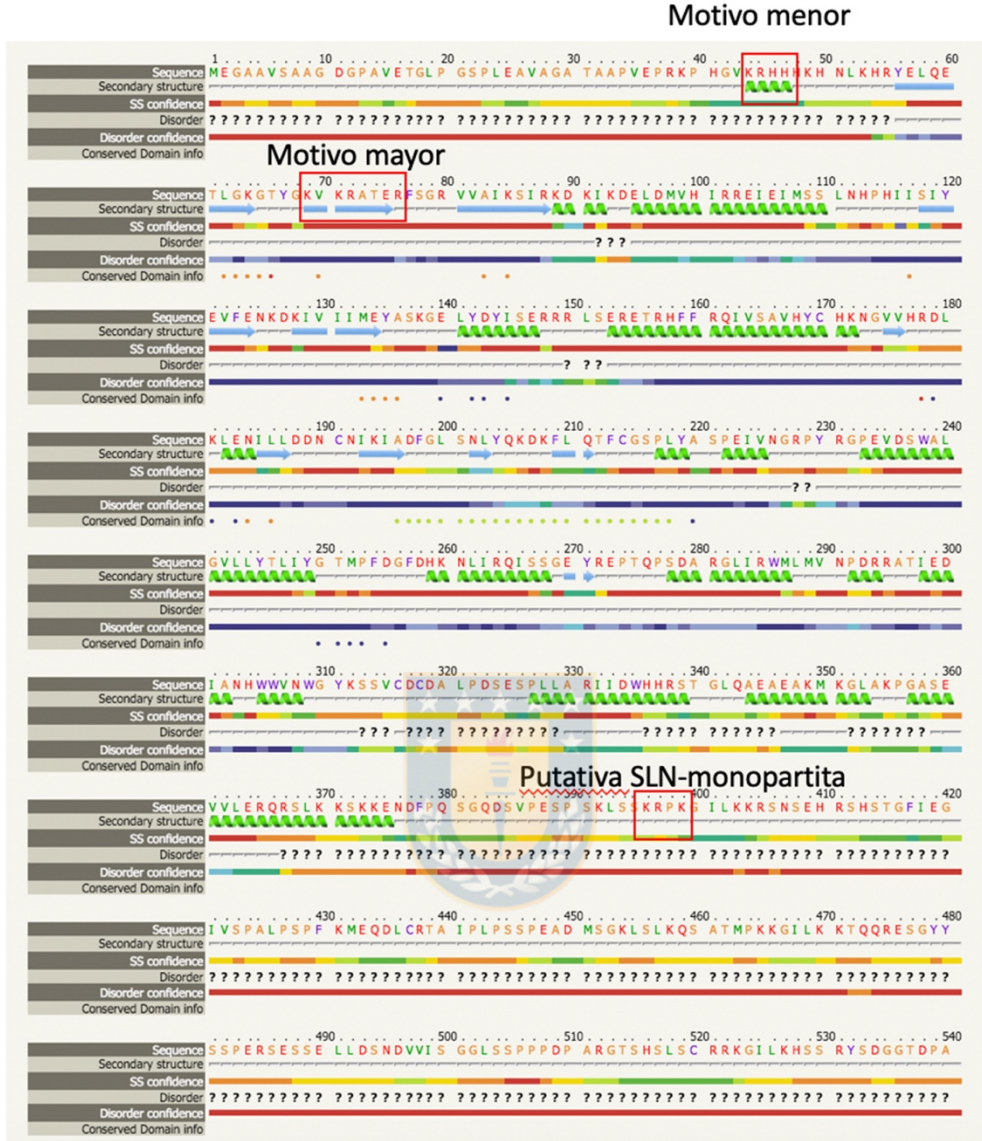
- Washburn, M. P., Wolters, D., & Yates III, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*, 19, 242. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/85686>
- Xu, T., Park, S. K., Venable, J. D., Wohlschlegel, J. A., Diedrich, J. K., Cociorva, D., ... Yates, J. R. 3rd. (2015). ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. *Journal of Proteomics*, 129, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.001>
- Yang, L., Zhang, J., Kamelgarn, M., Niu, C., Gal, J., Gong, W., & Zhu, H. (2015). Subcellular localization and RNAs determine FUS architecture in different cellular compartments. *Human Molecular Genetics*, 24(18), 5174–5183. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv239>
- Yano, T., Nakamura, T., Blechman, J., Sorio, C., Dang, C. V., Geiger, B., & Canaani, E. (1997). Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7286–7291. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7286>
- Yongjie, X., Wei, W., Qiu, H., Yaling, W., Cencen, L., Pengpeng, Z., & Haixia, X. (2019). Post-translational modification control of RNA-binding protein hnRNP function. *Open Biology*, 9(3), 180239. <https://doi.org/10.1098/rsob.180239>
- Yu, Y., Sun, D., Pu, L., Cheng, F., Chai, H., Shan, W., & Xiong, X. (2015). MiR-145 functions as a tumor suppressor targeting NUA1 in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(2), 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.013>
- Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D. G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., ... Alessi, D. R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Science Signaling*, 3(115), ra25. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000616>
- Zhang, X., Lv, H., Zhou, Q., Elkholi, R., Chipuk, J. E., Reddy, M. V. R., ... Gallo, J. M. (2014). Preclinical pharmacological evaluation of a novel multiple kinase inhibitor, ON123300, in brain tumor models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(5), 1105–1116. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0847>
- Zhang, Y., Wen, Z., Washburn, M. P., & Florens, L. (2010). Refinements to Label Free Proteome Quantitation: How to Deal with Peptides Shared by Multiple Proteins. *Analytical Chemistry*, 82(6), 2272–2281. <https://doi.org/10.1021/ac9023999>
- Zhou, K., Yao, Y.-L., He, Z.-C., Chen, C., Zhang, X.-N., Yang, K.-D., ... Ping, Y.-F. (2018). VDACC2 interacts with PFKFB3 to regulate glucose metabolism and phenotypic

reprogramming of glioma stem cells. *Cell Death & Disease*, 9(10), 988.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1015-x>

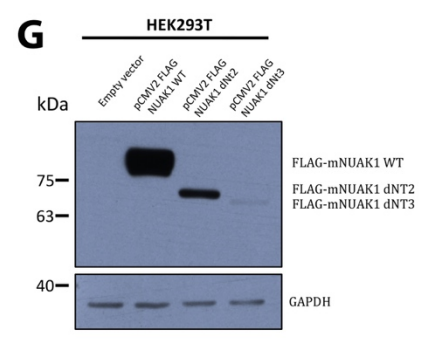
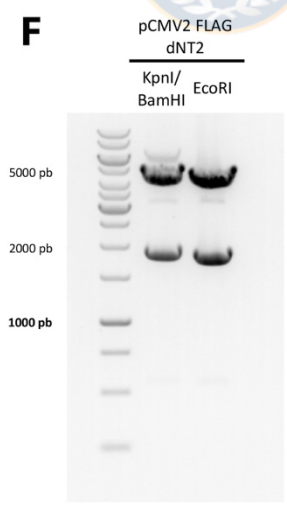
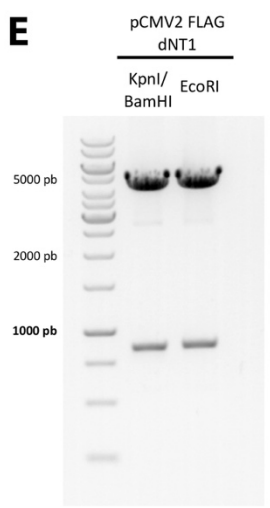
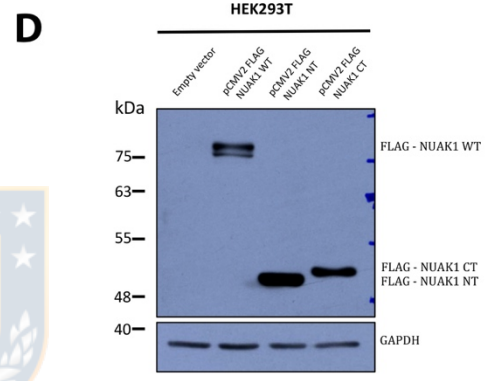
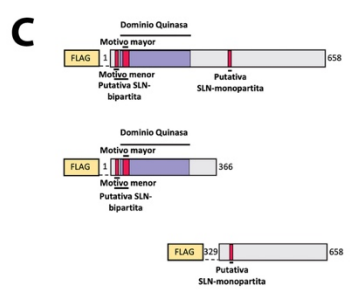
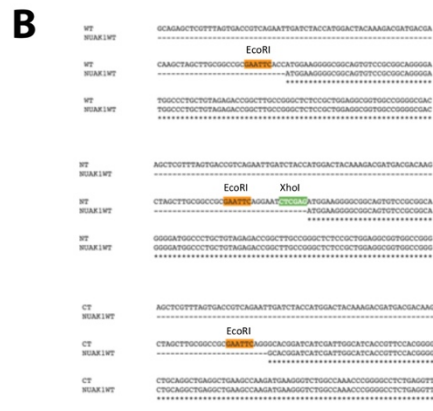
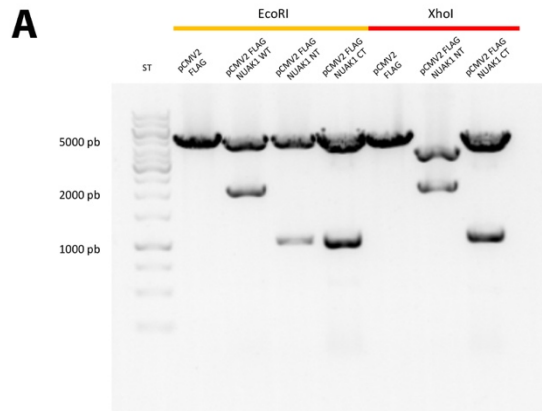
Zhu, J. Y., Rice, P. W. & Cole, C. N. The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *Journal of virology*. **65**, 6872–80 (1991).



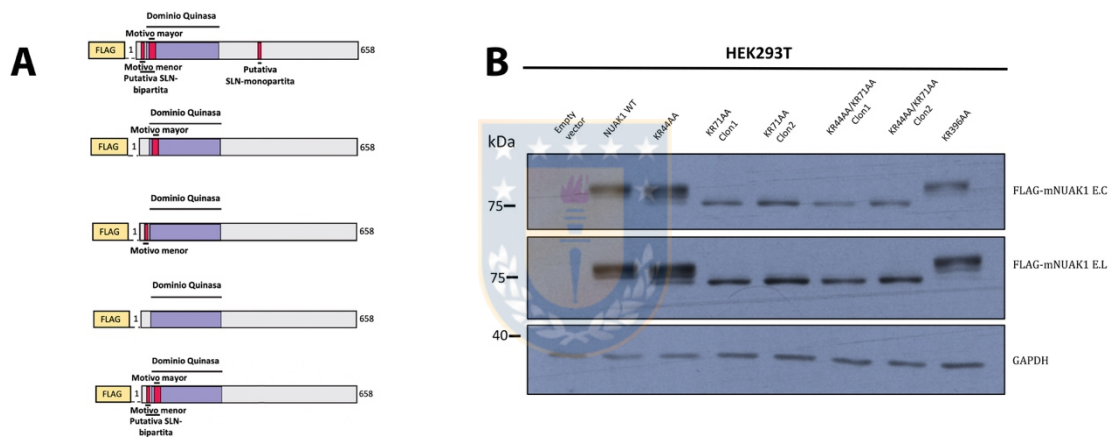
9.- Anexo



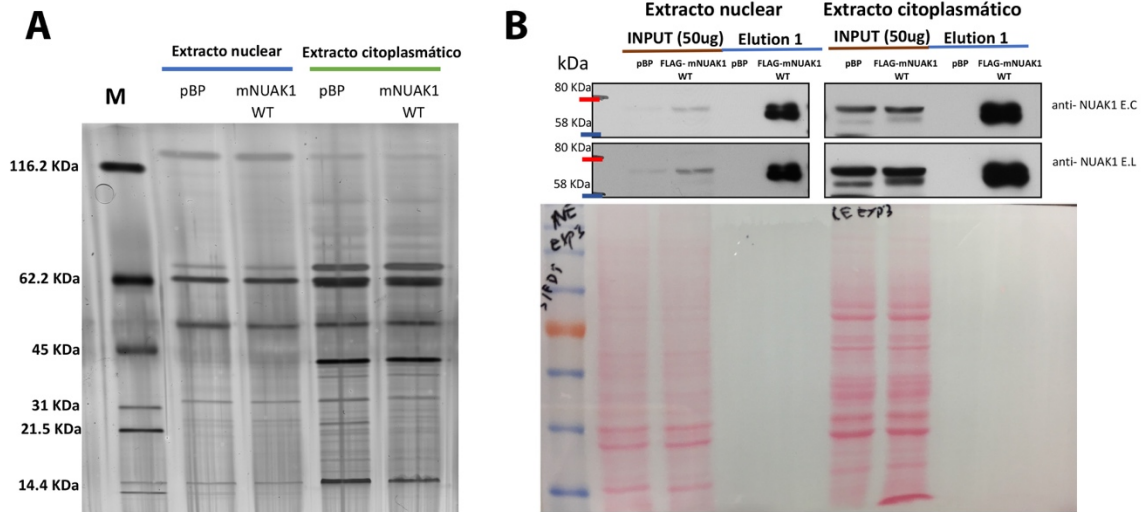
Anexo figura 1. Predicción de la estructura secundaria de NUAK1 murino. En verde se esquematizan las α -helices. En azul las β -plegadas y los guiones (-) representan *loops*. En general NUAK1 tiene mayoritariamente una estructura desordenada principalmente con *loops*. A pesar de ello, la putativa SLN-bipartita presenta una putativa estructura secundaria. El motivo menor a una α -helice y el motivo mayor una β -plegada. Fuente: Elaboración propia.



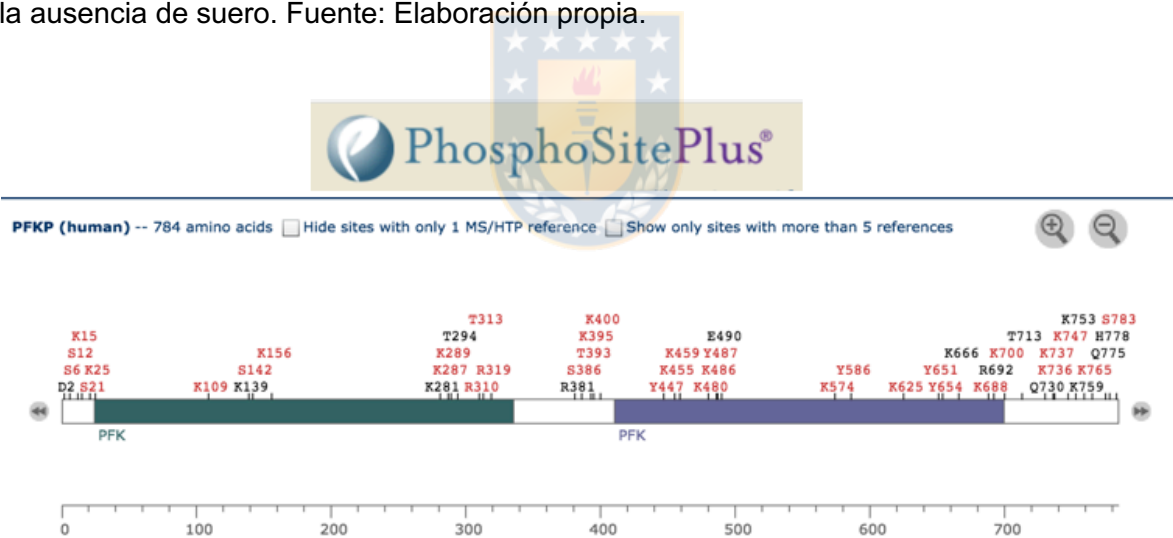
Anexo figura 2. Generación y validación de las deleciones de NUAK1 murino. A.- Validación del sub-clonamiento de FLAG-mNUAK1 WT, FLAG-mNUAK1 NT y FLAG-mNUAK1 CT en el vector pCMV2 FLAG (NH). La liberación del fragmento se realizó con la enzima de restricción EcoRI. La validación de los fragmentos (NT y CT) y su orientación se realizó utilizando la enzima XhoI. **B.-** Alineamiento de mNUAK1 WT con la secuenciación de los constructos FLAG-mNUAK1 WT, FLAG-mNUAK1 NT y FLAG-mNUAK1 CT. **C.-** Representación esquemática de las deleciones de NUAK1. **D.-** *Western blot* de la expresión de FLAG-mNUAK1 WT y las deleciones; FLAG-mNUAK1 NT y FLAG-mNUAK1 CT. **E-F.-** Validación del subclonamiento de FLAG-mNUAK1 dNT1 (E) y FLAG-mNUAK1 dNT2 (F). **G.-** *Western blot* de la expresión de FLAG-mNUAK1 WT y las deleciones; FLAG-mNUAK1 dNT1 y FLAG-mNUAK1 dNT2 y FLAG-mNUAK1 dNT3. Fuente: Elaboración propia.



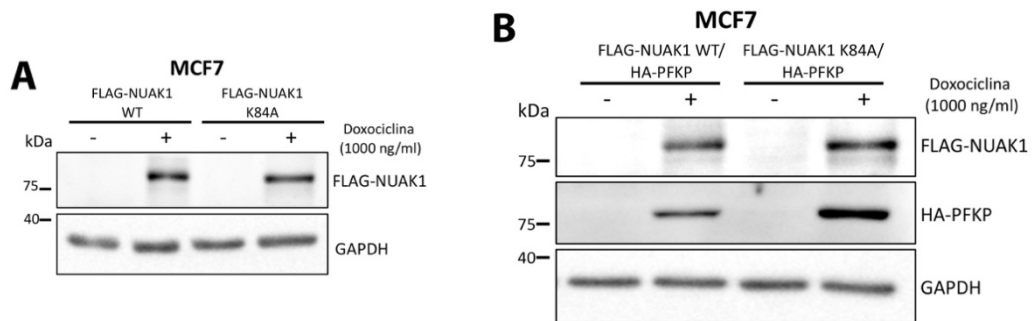
Anexo figura 3. Validación de la expresión de las mutantes de las putativas SLN de NUAK1 murino. A.- Esquemas de las mutantes de las putativas SLN predichas en NUAK1. **B.-** *Western blot* de la expresión de las mutantes de putativas SLN de NUAK1 murino. Fuente: Elaboración propia.



Anexo figura 4. Validación de la purificación de FLAG-mNUAK1 WT frente a la ausencia de suero. A.- Tinción con plata de la purificación de FLAG-mNUAK1 WT frente a la ausencia de suero **B.-** Western blot de la purificación de FLAG-mNUAK1 WT frente a la ausencia de suero. Fuente: Elaboración propia.

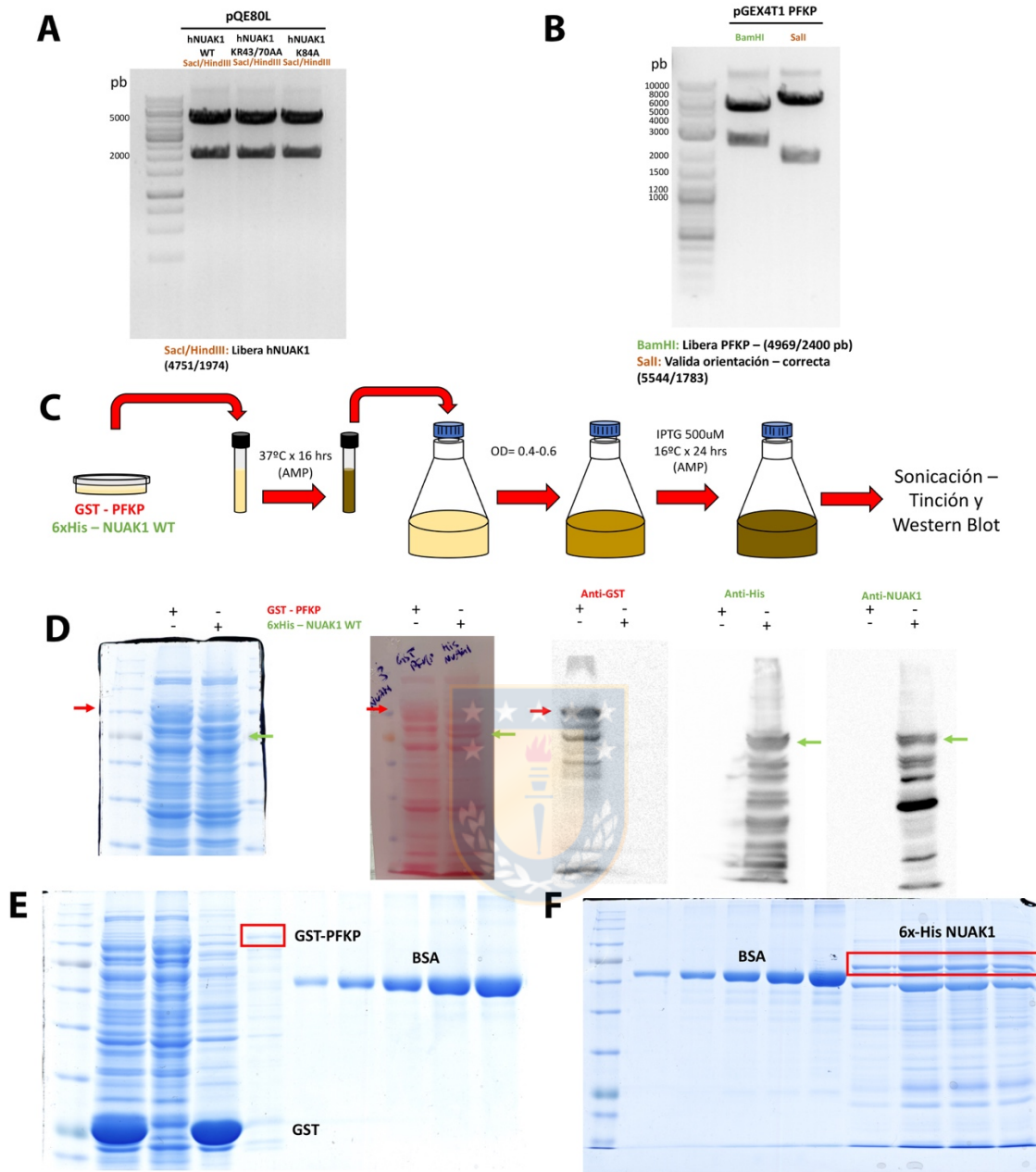


Anexo figura 5. Análisis de los residuos que presentan modificaciones post-traduccionales identificadas en la PFKP. La determinación de los residuos fue obtenida desde *PhosphositePlus*. Fuente: Elaboración propia.

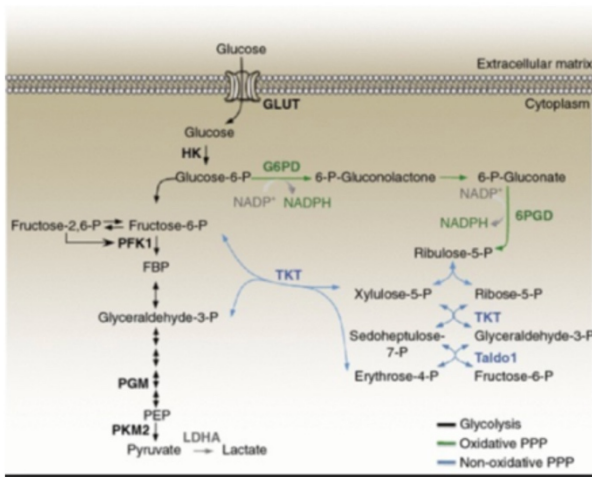


Anexo figura 6. Validación de los modelos inducibles estable en células MCF7. A.- *Western blot* de la validación de la inducción de FLAGhNUAK1 WT y FLAG-hNUAK1 K84A con doxociclina 1000 ng/ml por 24 horas en células MCF7. **B.-** *Western blot* de la validación de la co-inducción de FLAGhNUAK1 WT/HA-PFKP y FLAG-hNUAK1 K84A/HA-PFKP con doxociclina 1000 ng/ml por 24 horas en células MCF7. Fuente: Elaboración propia.





Anexo figura 7. Estandarización de la purificación de GST-PFKP y 6xHis-NUAK1. A.- Sub-clonamiento de hNUAK1 (WT, KR43/70AA y K84A) en el plásmido pQE80L. **B.-** Sub-clonamiento de PFKP en el plásmido pGEX4T1. **C.-** Protocolo de purificación de 6xHis NUAK1 WT y GST-PFKP. **D.-** Validación de la expresión de 6xHis-NUAK1 WT y GST PFKP. **E.-** Purificación de GST-PFKP. **F.-** Purificación de 6xHis NUAK1 WT. Fuente: Elaboración propia.

A**B****U2OS** ¹³C Glucose

Metabolite	sh Ark5		Control		p
	mean	SD	mean	SD	
Citrate	1.69	0.60	2.01	0.39	0.33
Glutaric acid, 2-oxo	0.61	0.48	1.09	0.72	0.21
Succinate	0.00	0.00	0.00	0.00	NA
Fumarate	-0.24	0.00	1.00	1.85	0.13
Malate	1.45	0.71	2.88	0.96	0.04
Glyceric acid-3-phosphate	25.45	8.32	42.52	6.42	0.00
Pyruvate	9.47	3.44	12.46	4.51	0.24
Lactate	8.85	2.40	9.93	3.99	0.58
Serine	2.62	4.66	3.08	1.50	0.82
Pyroglutamate	0.14	0.02	0.87	0.99	0.19
6-phosphogluconate	22.62	4.10	31.66	7.17	0.04
Alanine	6.39	6.25	9.71	3.01	0.28
Glycerol-3-phosphate	34.46	2.95	41.24	3.43	0.00
Glucose-6-phosphate	60.85	7.86	55.49	12.52	0.40

Anexo figura 8. NUAK1 y su potencial efecto en la vía de las pentosas. **A.-** representación esquemática del metabolismo de la glucosa y la vía de las pentosas. En verde la fase oxidativa. En azul la fase no oxidativa. **B.-** Experimento de rastreo de isótopos (*isotope-tracing experiments*) de ¹³U-C glucosa en células U2OS. Los niveles de glucosa-6-fosfato, piruvato y lactato no son significativamente afectados. En cambio, 6-fosfogluconato y gliceraldehído-3-fosfato disminuyen al silenciar a NUAK1 (ARK5) (Liu y col., 2012). Fuente: Elaboración propia.

```

NUAK1      MEGAAAPVAGDRPDLGLG-----APGSPREAVAGATAALEPRKPHGVKRRHHK
NUAK2      MESLVFARRSGPT-----PSAAELARPLAELIRSPKPLMKQAVKRRHHK
AMPKa1     -----MRRLLSSWRKMATAEKQKHDGR
AMPKa2     -----MAEKQKHDGR
BRK1      -----MSSGAKEGGGGSPAYLHPHPHPQHA
BRK2      -----MTSTGDKGGAQHA
SNRK      -----MAGFKRKYDG
MARK1     -MSARTPLPTVNERDNTENHTSVGYTEPHIQPTKSSSRQNI PRCRNSITATDEQP---
MARK4     -MSSRTVLAPGNDRSDHTGLGSGRSDDKGP-SWSSRSLGARCRNSIASCPEEQ---
MARK2     -MSSARTPLPTLNERDTE-----QPTLGHLDKSPKSKSNMIRGRNSATSADDEQ
MARK3     -MSTRTPPTVNERDNTENHTSHGDGR---QEVTSRTRSRSRGARCRNSIASCADDEQ---
SIK3      MAAAASGAGGAAGAGTGGAGPAGRLLPPPAPGSPAAPAAVSPAAGQPRPPAPASRGPMF
SIK1      -----MVIMSEFSADPAGQGGQKQP
SIK2      -----MVNADGPHLQKRP

```

```

NUAK1      HNLKHYELOETLKGTYGKVKRATERFSGRVVAIKSIRKDKIKDEQDMVHIRREIEIMS
NUAK2      HNLKHYEFLKTYGKVKKARES-SGRLVVAIKSIRKDKIKDEQDLMHIRREIEIMS
AMPKa1     VKIGH-YILGDTLGVGTFGKVKVGHKLTGHKVAVKILNRQKIRSLDVVVGKIKREIQNLK
AMPKa2     VKIGH-YVLGDTLGVGTFGKVKVGHKLTGHKVAVKILNRQKIRSLDVVVGKIKREIQNLK
BRK1      QYVGP-YRLEKTLGKQGTGLVKLVGHVCTQKVAIKIVNREKL-SESVLMKVEREIALLK
BRK2      QYVGP-YRLEKTLGKQGTGLVKLVGHVCTQKVAIKIVNREKL-SESVLMKVEREIALLK
SNRK      KIAGL-YDLKTLGRGHFAVVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-DTLATGHLFQEVRCMK
MARK1     -HIGN-YRLQKTIKGNFAVKVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-NPTSLQKLFREVRIMK
MARK4     -HIGN-YRLQKTIKGNFAVKVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-NPTSLQKLFREVRIMK
MARK2     -HIGN-YRLQKTIKGNFAVKVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-NPTSLQKLFREVRIMK
MARK3     -HIGN-YRLQKTIKGNFAVKVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-NPTSLQKLFREVRIMK
SIK3      ARIGY-YEIDRTIKGNFAVVKRATHLVTKQVAIKIIDKTQL-DEENLEKIYREVQIMK
SIK1      LRVGF-YDIEGTLGKGNFAVVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-DEENLEKIYREVQIMK
SIK2      VRVGF-YDIEGTLGKGNFAVVKLARHVLTGKEVAVKIIDKTQL-DAVNEKIYREVQIMK

```

Anexo figura 9. Alineamiento de la región N-terminal de los miembros de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK. En rojo de destaca la SLN-bipartita que es solo conservada en NUAK1 y NUAK2. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos usados para generar las deleciones de NUAK1 murino

Nombre	Secuencia 5'→3'	Orientación
mNUAK1_F	ATGGAAGGGGCGGCA	Forward
mNUAK1_R	GTTGAGCTTGCTGCAGATCT	Reverse
mNUAK1 NT	ATGCCAATCGATGATCCGTGC	Forward
mNUAK1 CT	GCACGGATCATCGATTGGCAT	Forward
mNUAK1 dNT3_EcoRI	CAATGAATTCGAGAGGTTTTTCAGGCCG	Forward
mNUAK1_R_BamHI	GACTGGATCCGTTGAGCTTGCTGCAGATCT	Reverse

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos usados para generar las mutantes de NUAK1 murino

Nombre	Secuencia 5'→3'	Orientación
mNUAK1 KR44AA_F	AAGCCGCACGGGGTGGCCGCCCATCACCACAAACACAAC	Forward
mNUAK1 KR44AA_R	GTTTGTGTTTGTGGTGATGGGCGGCCACCCCGTGCGGCTT	Reverse
mNUAK1 KR71AA_F	AAAGGTACCTACGGCAAAGTCGCCGCCGCCACCGAGAGGTTT	Forward
mNUAK1 KR71AA_R	AAACCTCTCGGTGGCGGCGGCGACTTTGCCGTAGGTACCTTT	Reverse
mNUAK1_F_KR396AA	CATCCAAGCTGAGTTCCGCGGCCCAAGGGCATCCTGAAG	Forward
mNUAK1_R_KR396AA	CTTCAGGATGCCCTTGGGCGCCGCGGAACTCAGCTTGGATG	Reverse

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos usados para generar las mutantes de NUAK1 humano

Nombre	Secuencia 5'→3'	Orientación
hNUAK1 KR43AA_F	AAGCCGCACGGGGTGGCCGCCCATCACCACAAGCACAAC	Forward
hNUAK1 KR43AA_R	GTTGTGCTTGTGGTGATGGGCGGCCACCCCGTGCGGCTT	Reverse
hNUAK1 KR70AA_F	AAAGGCACCTACGGCAAAGTCGCCGCCGCCACCGAGAGGTTT	Forward
hNUAK1 KR70AA_R	AAACCTCTCGGTGGCGGCGGCGACTTTGCCGTAGGTGCCTTT	Reverse

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos usados para sub-clonar PFKP en el plásmido pGEX4T1 y NUA1 humano en pQE80L

Nombre	Secuencia 5'→3	Orientación
SacI-hNUAK1_F	GCAGGAGCTCGAAGGGGCCGCCGCGCCTGT	Forward
hNUAK1-HindIII_R	GTGCAAGCTTCTAGTTGAGCTTGCTGCAGA	Reverse
BamHI-PFKP	TGCAGGGATCCGACGCGGACGACTCCC	Forward
PFKP-BamHI_R	GTCAGGATCCTCAGACACTCCAGGGC	Reverse

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos usados para sub-clonar NUA1 murino y PFKP en los plásmidos pCW57 MCS1-MCS2 puro y pCW57 MCS1-MCS2 hygro.

Nombre	Secuencia 5'→3	Orientación
NheI-FLAG_F	GCAGGCTAGCATGGACTACAAAGACGATG	Forward
hNUAK1-AgeI_R	GCAGACCGGTCTAGTTGAGCTTGCTGCAGA	Reverse
AvrII-HA_F	GCAGCCTAGGATGTATCCTTACGACGTGCC	Forward
PFKP-BamHI_R	GTCAGGATCCTCAGACACTCCAGGGC	Reverse

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos usados para sub-clonar iRFP en el plásmido pCW57 MCS1 – HA PFKP hygro

Nombre	Secuencia 5'→3	Orientación
NheI_IRFP_F	GCAGGCTAGCATGGCGGAAGGATCCGTCGC	Forward
AgeI_IRFP_R	GCAGACCGGTTCACTCTTCCATCACGCCGATC	Reverse