



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Magíster en Bioquímica y Bioinformática

## **Efecto de NUAK1 en el splicing de *G6PD* dependiente de hnRNPK en células de cáncer colorrectal**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

VIVIANA IVELISE COLIBORO DANNICH  
CONCEPCIÓN-CHILE 2023

Profesor Guía: Ariel Castro Alma  
Roxana Pincheira Barrera  
Dpto. de 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.

Profesor tutor:

---

Dr.  
Ariel Castro Alma  
Facultad de Ciencias Biológicas

Profesora Co-tutora:

---

Dra.  
Roxana Pincheira Barrera  
Facultad de Ciencias Biológicas

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr.  
José Martínez Oyanedel  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr.  
Fernando Sepúlveda Briceño  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr.  
Ricardo Soto Rizzo  
Universidad de Chile

Directora del programa:

---

Dra.  
Amparo Uribe Pérez  
Directora Programa Magíster en Bioquímica y Bioinformática

## RESUMEN

El cáncer es una patología con elevada incidencia y mortalidad a nivel mundial, donde destaca el cáncer colorrectal. A nivel molecular, las células tumorales requieren reprogramar su metabolismo para poder sobrevivir a condiciones de estrés o permitir la patológica tasa de crecimiento y proliferación. En consecuencia, las células tumorales presentan elevada tasa biosintética, bioenergética alterada y necesidad de balance redox. En particular, se encuentra alterada la vía de las pentosas fosfato, que se ha descrito como fundamental en la transformación neoplásica. Esta vía es regulada principalmente a través de los niveles de *G6PD*, la enzima limitante. Esta enzima incrementa su expresión frente a distintos contextos, como el estrés oxidativo o el factor de crecimiento insulina. Adicionalmente se ha descrito como blanco de múltiples oncogenes. Un tipo de regulación para *G6PD* ocurre a nivel post-transcripcional, donde la ribonucleoproteína hnRNPK regula negativamente sus niveles de ARNm maduro al unirse al exón 12 y promover la retención de intrones. De manera interesante, en nuestro laboratorio encontramos que hnRNPK es un interactor nuclear de la quinasa NUAK1 y presenta potenciales sitios de fosforilación para esta quinasa, en los residuos de serina89 y serina417. NUAK1 es una serina/treonina quinasa de la familia de las AMP quinasa que está sobre expresada en diferentes tipos de cáncer y que se ha relacionado con una menor supervivencia y un peor pronóstico en general. Según los antecedentes, propusimos que NUAK1 favorece la respuesta proliferativa al fosforilar a hnRNPK, inactivándola e interfiriendo con su acción en el *splicing* de *G6PD*. Para dilucidar esta relación, estudiamos el rol de NUAK1 en el procesamiento de *G6PD* mediado por hnRNPK. Realizamos modelamientos moleculares para evaluar si la fosforilación de residuos serina89 y serina417 puede inducir un efecto inhibitorio en la unión de hnRNPK al pre-ARNm de *G6PD*. Obtuvimos un cambio conformacional que impide a la hnRNPK unirse al exón 12 de *G6PD* de manera eficiente. Por otro lado, evaluamos el efecto de NUAK1 en el procesamiento de *G6PD*, en la unión de hnRNPK con el ARNm inmaduro de *G6PD* y adicionalmente diseñamos un reportero de *splicing* de doble luciferasa. Encontramos que en la línea HCT116*P53*<sup>-/-</sup>, NUAK1 favorece el procesamiento del ARNm inmaduro de *G6PD* asociado a su regulación sobre hnRNPK. Nuestros hallazgos indican que NUAK1 regula los niveles de *G6PD*, y lo proponen como un potencial promotor de la vía de las pentosas.

## SUMMARY

Cancer is a pathology with high incidence and mortality worldwide, where colorectal cancer stands out. At the molecular level, tumor cells must reprogram their metabolism to survive stress conditions or allow pathological growth and proliferation rates. Consequently, tumor cells present a high biosynthetic rate, altered bioenergetics, and a need for redox balance. One altered pathway corresponds to pentose phosphate, which is fundamental in neoplastic transformation. This pathway is mainly regulated through levels of *G6PD*, the rate-limiting enzyme. This enzyme increases its expression in different contexts, such as oxidative stress or insulin growth factor stimulation. Additionally, it has been described as a target of multiple oncogenes. At the post-transcriptional level, hnRNPK negatively regulates *G6PD* mature mRNA levels by binding to exon 12 and promoting intron retention. Interestingly, our laboratory found that hnRNPK is a nuclear interactor of NUA1, and it contains two potential NUA1 phosphorylation sites, serine89 and serine417 residues. NUA1 is a serine/threonine kinase of the AMP kinase family highly expressed in cancer, which has been associated with decreased survival and a poorer overall prognosis. We proposed that NUA1 promotes the proliferative response to growth factor by phosphorylating hnRNPK, inactivating it, and interfering with its action on *G6PD* splicing. To elucidate this hypothesis, we studied the role of NUA1 in *G6PD* processing through hnRNPK. We performed molecular modeling to study whether phosphorylation of potential residues for NUA1 can inhibit the binding of hnRNPK to the *G6PD* pre-mRNA. We obtained a conformational change that efficiently prevents the ribonucleoprotein from binding to *G6PD* exon 12. On the other hand, we evaluated the effect of NUA1 on *G6PD* processing, the binding of hnRNPK to immature *G6PD* mRNA, and additionally designed a double luciferase splicing reporter. In the HCT116P53<sup>-/-</sup> cell line, we found that NUA1 favors the processing of immature *G6PD* mRNA associated with its regulation of hnRNPK. Our findings found that NUA1 regulates *G6PD* levels, proposing it as a potential promoter of the pentose phosphate pathway.

## Tabla de Contenidos

<b>1. Introducción</b>	
1.1 Cáncer y sus sellos de identidad.....	10
1.2 Reprogramación metabólica del cáncer.....	11
1.3 Cáncer y vía de las pentosas fosfato .....	12
1.4 hnRNPK en cáncer.....	14
1.5 hnRNPK en la regulación de <i>G6PD</i> .....	15
1.6 NUA1 en cáncer y su potencial relación con <i>G6PD</i> .....	17
<b>2. Hipótesis y objetivos del trabajo</b>	
2.1 Hipótesis.....	20
2.2 Objetivo General.....	20
2.3 Objetivos específicos.....	20
<b>3. Materiales y métodos</b>	
<b>3.1 Materiales:</b>	
3.1.1 Anticuerpos.....	21
3.1.2 Reactivos.....	21
3.1.3 Cultivo celular.....	21
3.1.4 Plásmidos.....	22
<b>3.2 Métodos bioinformáticos:</b>	
3.2.1 Modelamiento de ARN.....	22
3.2.2 Modelamiento de hnRNPK: Fosforilación S89 y S417 y corrección de energía mínima.....	23
3.2.3 <i>Docking</i> Molecular.....	24
3.2.4 Análisis de los <i>docking</i> moleculares.....	24
<b>3.3 Métodos experimentales:</b>	
3.3.1 Fraccionamiento sub-celular.....	24
3.3.2 Western Blots.....	25
3.3.3 Inmunoprecipitación.....	25

3.3.4	Extracción de ARN .....	26
3.3.5	Inmunoprecipitación de ARN (RIP).....	26
3.3.6	Síntesis de cDNA.....	26
3.3.7	PCR en tiempo real .....	27
3.3.8	Electroforesis en gel de agarosa.....	27
3.3.9	Ensayo de reportero de splicing de doble luciferasa .....	28
3.3.10	Cuantificación y análisis estadísticos .....	28
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	
4.1	<b>Objetivo 1:</b> Analizar <i>in silico</i> el efecto estructural de la potencial fosforilación de hnRNPK dependiente de NUA1 en la interacción con el pre-ARNm de <i>G6PD</i> .....	29
4.2	<b>Objetivo 2:</b> Determinar el efecto de NUA1 sobre el splicing de <i>G6PD</i> .....	42
<b>5.</b>	<b>Discusión</b> .....	56
<b>6.</b>	<b>Conclusiones generales</b> .....	63
<b>7.</b>	<b>Agradecimientos</b> .....	64
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	65
<b>9.</b>	<b>Material suplementario:</b>	
9.1	Suplementarios bioinformáticos.....	76
9.2	Suplementarios experimentales y bibliográficos.....	81
<b>10.</b>	<b>Anexos:</b>	
10.1	Estandarización de partidores.....	83
10.2	Prueba de eficiencia de partidores.....	85

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Incidencia y mortalidad del cáncer.....	10
<b>Figura 2:</b> <i>Hallmarks</i> del cáncer definidos hasta el año 2021.....	11
<b>Figura 3:</b> Vía de las pentosas fosfato.....	13
<b>Figura 4:</b> Funciones celulares conocidas de hnRNPK.....	14
<b>Figura 5:</b> Rol de hnRNPK en la regulación del splicing de <i>G6PD</i> .....	15
<b>Figura 6:</b> hnRNPK es un interactor de NUAK1.....	16
<b>Figura 7:</b> NUAK1 fosforila potencialmente los residuos S89 y S417 de hnRNPK.....	18
<b>Figura 8:</b> Proyecto de investigación propuesto.....	19
<b>Figura 9:</b> Predicción de estructura secundaria del ARN del exón 12 de <i>G6PD</i> y evaluación termodinámica.....	31
<b>Figura 10:</b> Predicción de la estructura terciaria (tridimensional) del ARN del exón 12 de <i>G6PD</i> , obtenida con RNA composer.....	32
<b>Figura 11:</b> Modelamiento de hnRNPK.....	34
<b>Figura 12:</b> Modelos de <i>docking</i> molecular de mínima energía entre hnRNPK-WT/hnRNPK-pS89-pS417 y <i>G6PD</i> -exón12 realizado en HADDOCK.....	37
<b>Figura 13:</b> Modelo de <i>docking</i> molecular de mínima energía entre hnRNPK-pS89-pS417 y <i>G6PD</i> -exón12 realizado en HADDOCK.....	39
<b>Figura 14:</b> Estudio de la interacción hnRNPKWT/pS89-pS417- <i>G6PD</i> exón12:.....	41
<b>Figura 15:</b> hnRNPK interacciona y regula el procesamiento de <i>G6PD</i> en células HCT116p53-/- y DLD-1.....	44
<b>Figura 16:</b> NUAK1 interacciona con hnRNPK en células HCT116P53-/- y DLD-1.....	46
<b>Figura 17:</b> Efecto del peróxido de hidrógeno y factor de crecimiento en los niveles proteicos de <i>G6PD</i> .....	48
<b>Figura 18:</b> Efecto de la actividad de NUAK1 sobre el procesamiento de <i>G6PD</i> ante insulina 12 horas.....	50
<b>Figura 19:</b> NUAK1 inhibe la interacción de hnRNPK con el ARNm inmaduro de <i>G6PD</i> ....	51
<b>Figura 20:</b> Reportero de <i>G6PD</i> de doble luciferasa.....	54
<b>Figura S1:</b> Modelos de la estructura centroide del exón 12 de <i>G6PD</i> .....	76

<b>Figura S2:</b> Evaluación energética de modelos hnRNPk-WT y hnRNPk-pS89-pS417.....	77
<b>Figura S3:</b> Top 10 modelos de interacción hnRNPk-WT-exón 12 <i>G6PD</i> .....	78
<b>Figura S4:</b> Top 10 modelos de interacción hnRNPk-pS89-pS417-exón 12 <i>G6PD</i> .....	79
<b>Figura S5:</b> Resultado de PDBsum de los archivos PDB de ambos modelos de <i>docking</i> molecular. ....	80
<b>Figura S6:</b> Correlación entre la expresión de NUAk1 y <i>G6PD</i> en cáncer de mama, glioblastoma y colorrectal.....	81
<b>Figura S7:</b> Western blots del fraccionamiento sub-celular de HCT116 <i>P53</i> <sup>-/-</sup> y DLD-1.....	82
<b>Anexo 1:</b> Estandarización de partidores para la detección del transcrito inmaduro de <i>G6PD</i> .....	83
<b>Anexo 2:</b> Resultados de prueba de partidores en AriaMX Real-Time PCR.....	84
<b>Anexo 3:</b> Resultados de prueba de partidores en AriaMX Real-Time PCR.....	85

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo de esta tesis.....	27
---	----



## **ABREVIATURAS**

**NUAK1 /ARK5:** AMPK-related kinase 5

**HNRNPK:** Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K

**G6PD:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase

**PPP:** pentose phosphate pathway

**iMEFs:** immortalized Mouse embryonic fibroblasts

**IP:** Immunoprecipitation

**CoIP:** Coimmunoprecipitation

**RIP:** RNA immunoprecipitation

**HDAC:** Histone deacetylase

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**INS:** Insulin

**PBS:** Phosphate buffered saline

**APS:** Ammonium Persulfate

**DMEM,** "Dulbecco's Modified Eagle Medium"

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

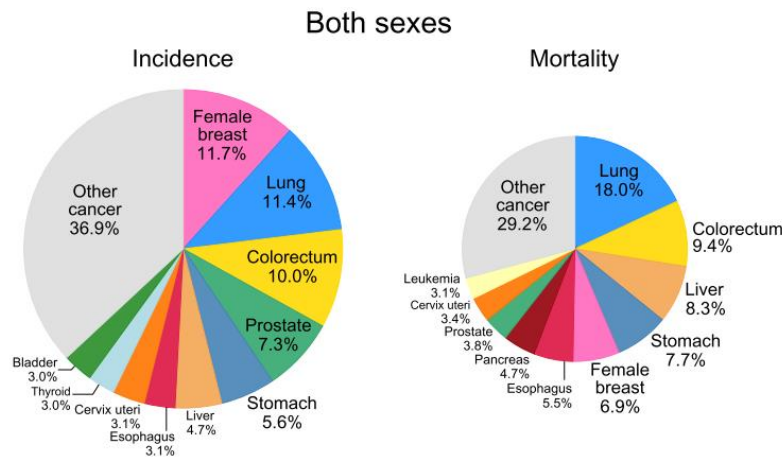
**DTT:** Dithiothreitol

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

## 1. Introducción

### 1.1 Cáncer y sus sellos de identidad

El cáncer es una de las patologías con mayor incidencia a nivel mundial y se sitúa como la primera o segunda causa de mortalidad en la mayoría de los países. Donde la mayor incidencia corresponde a: cáncer de mama (11,7%); cáncer de pulmón (11,4%) y cáncer colorrectal (10,0%). Mientras que el cáncer pulmonar y colorrectal ocupan el primer y segundo lugar en mortalidad, respectivamente, para ambos sexos (fig.1) (Sung et al., 2021).

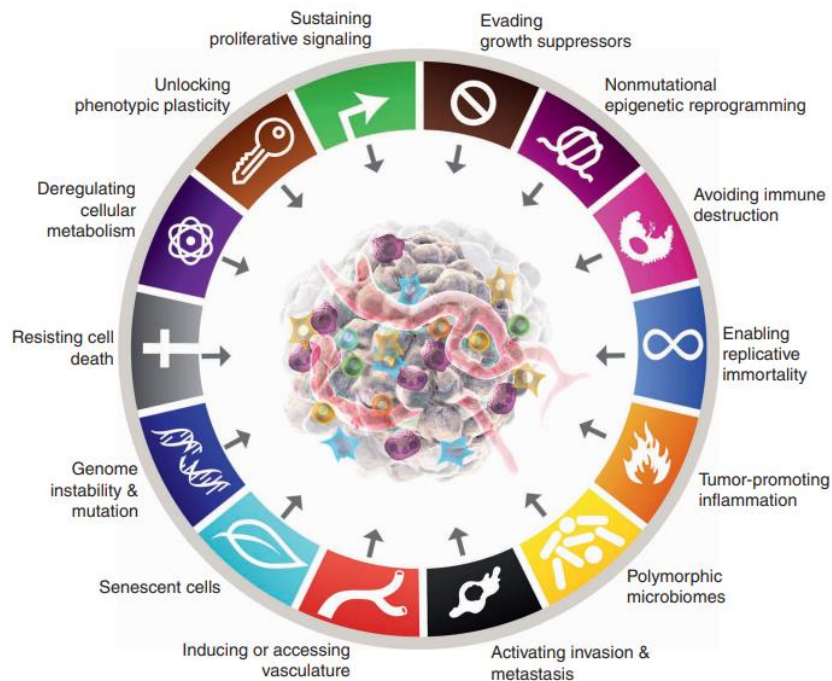


**Figura 1: Incidencia y mortalidad del cáncer.** Se muestran los primeros 10 tipos de cáncer más comunes hacia el año 2020 para ambos sexos. Modificado de (Sung et al., 2021)

El término “cáncer” se utiliza para definir aquellas patologías donde las células poseen una capacidad descontrolada de proliferación, causando el desarrollo de tumores que pueden afectar el correcto funcionamiento de los órganos donde proliferan, e invadir tejidos circundantes en un proceso denominado metástasis (Raymond et al., 2007).

El desarrollo celular aberrante se sustenta en una serie de capacidades adquiridas por las células durante el desarrollo tumoral, las cuales fueron descritas como “sellos de identidad” (o “*hallmarks*”) por primera vez en el año 2000. Estos constituyeron un principio que permitió organizar y racionalizar la complejidad neoplásica, e incluyeron: el mantenimiento de la señal proliferativa; evasión de supresores de crecimiento; resistencia a la muerte celular; activación de inmortalidad replicativa; favorecimiento de angiogénesis; y activación de metástasis e invasión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Conforme el avance de la

investigación y las nuevas tecnologías, fueron posteriormente reconocidos sellos adicionales como la evasión inmune y **la reprogramación del metabolismo energético**, entre otros (Hanahan & Weinberg, 2011) (Hanahan, 2022) (fig.2). Es importante destacar que la comprensión de los mecanismos moleculares que promueven esta reorganización de las células tumorales, permitirá el desarrollo de terapias más efectivas y menos tóxicas para el tratamiento del cáncer, a través de la identificación de nuevos blancos y/o marcadores.



**Figura 2: Hallmarks del cáncer definidos hasta el año 2021.** Se muestran los 14 sellos que caracterizan la patología del cáncer y son comunes para la mayoría de los tumores. Obtenido de (Hanahan, 2022).

## 1.2 Reprogramación metabólica del cáncer

Uno de los sellos que ha cobrado mayor relevancia en los últimos años corresponde a la capacidad celular de reprogramar su metabolismo energético. Esta reprogramación se define como un estado de alteración de la energética celular, con un redireccionamiento (potenciamiento o supresión) de una vía metabólica convencional respecto de su funcionamiento en tejido normal (De Berardinis & Chandel, 2016; Vander Heiden & DeBerardinis, 2017). Entre estos, se ha descrito el aumento del flujo glucolítico con

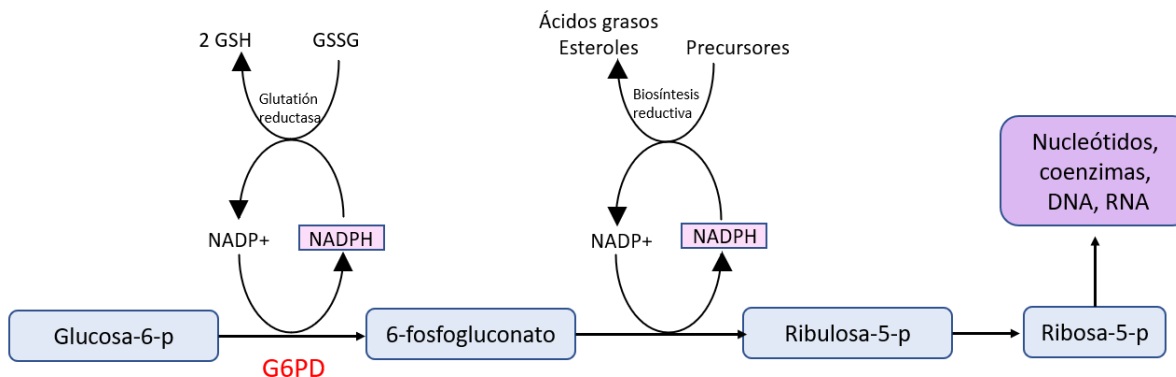
producción de lactato (“glucólisis aeróbica) (Warburg et al., 1927), aun en condiciones de disponibilidad de oxígeno e integridad mitocondrial, lo que se relacionaría con un favorecimiento de la biosíntesis y proliferación celular (Liberti & Locasale, 2016). Así mismo, se ha descrito que la activación intrínseca de vías de señalización como PI3K-Akt-mTOR promueve la proliferación al aumentar el flujo glucolítico y la síntesis de lípidos (Yuan TL; Cantley LC, 2008). También se ha estudiado el aumento del flujo glutaminolítico, metabolismo mitocondrial y **favorecimiento de la vía de las pentosas** (Phan et al., 2014). Esta respuesta metabólica ocurre como respuesta a la pérdida de supresores tumorales como P53 y la activación de oncogenes como MYC (De Berardinis & Chandel, 2016), funcionando como un mecanismo para sustentar la demanda biosintética y bioenergética, así como para mitigar el estrés oxidativo, y de esta manera, lograr la supervivencia de estas células (Martínez-Reyes & Chandel, 2021).

### **1.3 Cáncer y Vía de las pentosas fosfato**

La vía de las pentosas fosfato (PPP) es fundamental en el metabolismo celular para mantener la homeostasis del carbono; proveer de precursores para la síntesis de nucleótidos, lípidos, aminoácidos; y controlar el estrés oxidativo (Stincone et al., 2015). En su rama oxidativa produce ribulosa-5-fosfato y NADPH necesarios para detoxificar ROS, biosíntesis reductiva y biogénesis de ribosa (Horecker, 2002). Se ha estudiado que la desregulación de esta vía contribuye directamente a la proliferación celular (Jiang et al., 2014) y es esencial para la transformación neoplásica (Jin & Zhou, 2019). La enzima de PPP más estudiada es la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (*G6PD*), una oxidorreductasa dependiente de NADP<sup>+</sup> que cataliza la reacción irreversible de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato. Debido a que es la enzima limitante de la rama oxidativa del PPP (Horecker, 2002; Stincone et al., 2015), su actividad se relaciona directamente con el flujo metabólico redirigido hacia la vía (fig.3) (Jiang et al., 2014), donde la regulación de *G6PD* es mediada tanto a través de su expresión como por mecanismos postraduccionales (Patra & Hay, 2014).

En el contexto del cáncer colorrectal, se ha estudiado que condiciones como el estrés oxidativo induce un aumento en la expresión de *G6PD*, favoreciendo la quimiorresistencia (Ju et al., 2017), al aumentar la relación NADPH/NAD<sup>+</sup> y GSH/GSSG (disponibilidad de glutatión reducido) intracelular (Shibuya et al., 2015). Otros estímulos, como el de

proliferación inducida por factores de crecimiento también pueden favorecer los niveles de *G6PD*. Por ejemplo, se ha encontrado que la insulina media el incremento de los niveles de *G6PD* (Wagle et al., 1998).



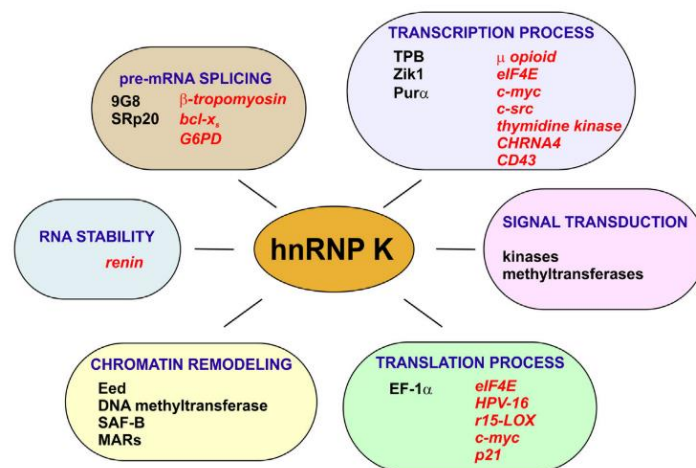
**Figura 3: Vía de las pentosas fosfato.** Mediada en primera instancia por *G6PD*, la rama oxidativa de la vía PPP permite la generación de NADPH, importante para la biosíntesis reductiva, así como la regeneración de GSH, un fundamental antioxidante intracelular. Al mismo tiempo favorece la síntesis de nucleótidos para ARN y ADN, en respuesta al estímulo proliferativo. *G6PD*: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. GSH: Glutación reducido; GSSG: Glutación oxidado GPX. Elaboración propia.

Dado que las células cancerígenas presentan una mayor expresión de *G6PD* respecto del tejido normal (Jiang et al., 2013; Q. Zhang et al., 2017); y que su expresión elevada se asocia con alto riesgo de metástasis y mal pronóstico en cáncer colorrectal (Ju et al., 2017), carcinoma de mama (Pu et al., 2015), carcinoma renal (Q. Zhang et al., 2017) y cáncer de vejiga (Chen et al., 2012), se espera que *G6PD* tenga un rol como blanco de oncogenes en el desarrollo tumoral. Consistentemente, se ha observado que múltiples vías de señalización oncogénicas se relacionan con la regulación de PPP por medio de *G6PD*. El supresor tumoral P53 se une a *G6PD* a nivel citoplasmático, inhibiendo su activación, disminuyendo el flujo a PPP y la generación de NADPH (Jiang et al., 2011). Por otro lado, la enzima polo-quinasa puede fosforilar directamente a *G6PD*, induciendo la dimerización y la promoción de la biosíntesis, lo que favorece el crecimiento y proliferación tumoral (X. Ma et al., 2017). Otros oncogenes como la tirosina quinasa *c-Src* favorecen la activación de *G6PD*, al fosforilar el residuo Tyr112, aumentando su afinidad por sustrato (H. Ma et al.,

2021). También se ha estudiado que la quinasa 4 activada por p21 (PAK4) incrementa *G6PD* al inhibir a P53 (X. Zhang et al., 2017). Debido a los antecedentes que indican que *G6PD* es clave en la regulación de PPP mediada por oncogenes, se requiere mayor investigación que permita identificar nuevos **potenciales reguladores de su actividad, los cuales favorecerían el proceso de carcinogénesis.**

#### 1.4 hnRNPK en cáncer

La ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNPK) es una proteína regulatoria perteneciente a la familia hnRNPs de proteínas de unión a ARN. Su estructura está compuesta por 463 aminoácidos y contiene tres dominios de homología K (KH1, KH2 y KH3) que permiten su interacción con los ácidos nucleicos, preferentemente en zonas ricas en citosina (Z. Wang et al., 2020). Participa en múltiples procesos tales como; regulación de expresión génica, remodelamiento de la cromatina, transcripción y traducción, estabilidad y *splicing* del ARNm (fig.4) (Bomsztyk et al., 2004; Peng et al., 2019; Yano et al., 2005).



**Figura 4: Funciones celulares conocidas de hnRNPK.** En azul: procesos en los que hnRNPK está involucrado. En negro: principales factores con los que interacciona en cada proceso. En rojo: genes activados/reprimidos a causa de la interacción. (Barboro et al., 2014).

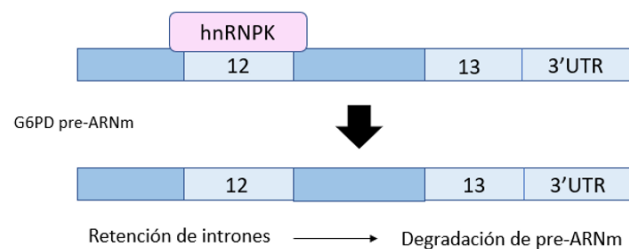
En cáncer, se ha descrito un rol dicotómico de hnRNPK, donde puede activar tanto vías oncogénicas como supresoras de tumores (Gallardo et al., 2016). Por ejemplo, en la oncogénesis, se ha observado que su expresión elevada favorece el desarrollo tumoral y la

metástasis, ya que induce genes relacionados con la angiogénesis, la matriz extracelular y la migración (Gao et al., 2013). Adicionalmente, se ha encontrado que induce de manera epigenética la proliferación de células cancerígenas al aumentar la transcripción de SPIN1, un lector de histonas oncogénicas (D. Li et al., 2023). No obstante, también se ha visto que en células de cáncer gástrico inhibe la proliferación celular, al activar la vía P53/p21/CCND1 (Huang et al., 2017).

Aunque el rol de hnRNPk en la promoción del cáncer no está del todo dilucidado, se ha observado que en tumores colorrectales, se sobreexpresa y relaciona con un peor pronóstico (Carpenter et al., 2006). Otro aspecto funcional importante que relaciona hnRNPk con el cáncer es la regulación del *splicing*, ya que este proceso favorece la carcinogénesis (Venables, 2004). En este contexto, se ha documentado que en cáncer gástrico hnRNPk potencia una isoforma de la proteína CD44 favoreciendo la tumorigénesis (Peng et al., 2019). **Esto propone la existencia de otros mecanismos que asocien su rol en la regulación del *splicing* con la promoción de la carcinogénesis.**

### 1.5 hnRNPk en la regulación de *G6PD*

En 2006, Griffith y colaboradores demostraron que hnRNPk puede unirse al exón 12 del transcrito primario de *G6PD*, relacionándose con una menor concentración de la proteína (Griffith et al., 2006). Posteriormente, se validó que en condiciones de privación nutricional hnRNPk actúa como un regulador negativo del *splicing* de *G6PD*, ya que al unirse al exón 12 del pre-ARNm, induce la retención de intrones y promueve su degradación, causando una disminución en los niveles de *G6PD* (fig. 5) (Cyphert et al., 2013).

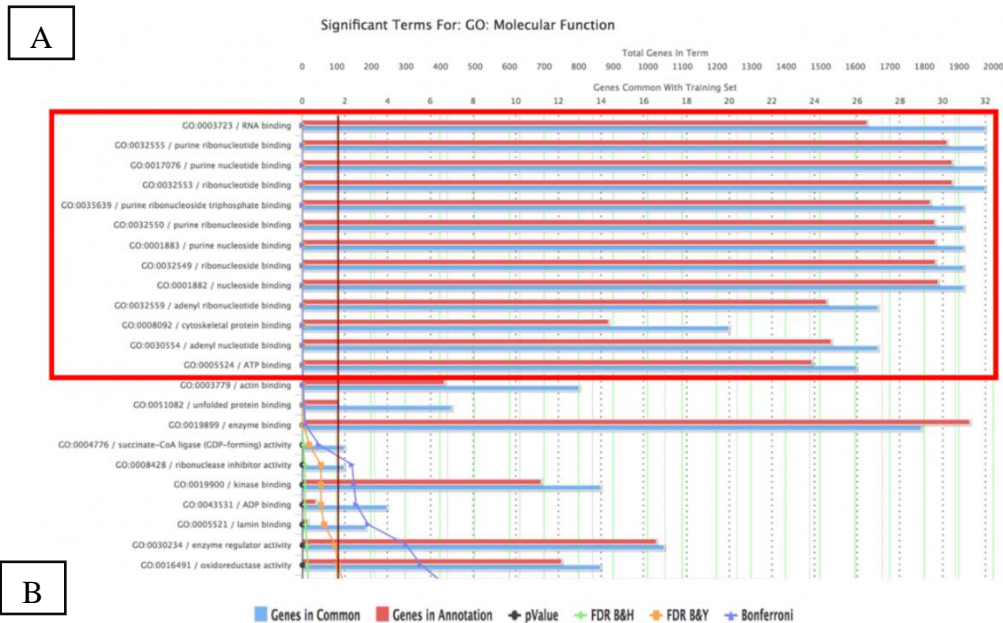


**Figura 5: Rol de hnRNPk en la regulación del *splicing* de *G6PD*.** Elaboración propia.

Por su parte, hnRNPk puede ser regulada de manera postraduccional a través de fosforilación (Ostrowski et al., 2000; Xie et al., 2003), sumoilación (T. Li et al., 2004) y metilación (Ostareck-Lederer et al., 2006). Se ha encontrado que la fosforilación mediada

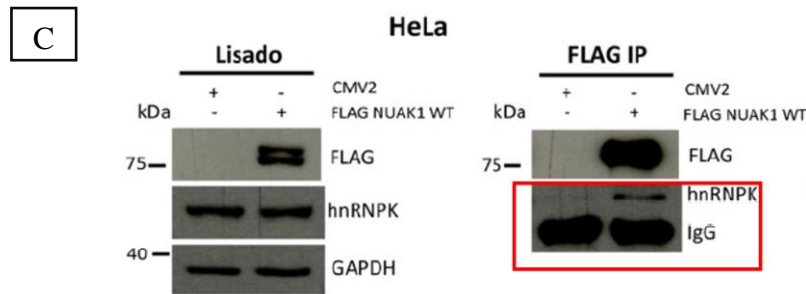
por quinasas, mitógenos o estrés oxidativo, puede afectar su estabilidad, su localización subcelular o su afinidad por ARN/ADN (Xu et al., 2019). Dentro de lo último, se ha descrito que Tcl1 puede interactuar con hnRNPK e inhibir su unión al pre-ARNm de *G6PD*, aumentando sus niveles y favoreciendo la hepatocarcinogénesis (Hong et al., 2014). **Esto propone a hnRNPK como un target de otras proteínas oncogénicas.**

Recientemente, nuestro laboratorio realizó un análisis de MudPIT (*del inglés: multi-dimensional protein identification technology*) e identificó múltiples potenciales interactores de NUA1 en la fracción nuclear de células iMEF de ratón. De manera interesante, por ontología de genes, estos interactores se asociaron mayoritariamente a funciones moleculares como unión al RNA (fig. 6A). Más relevante aún, es que se determinó a distintas hnRNPs como potenciales interactores de NUA1, entre ellas a hnRNPK (fig. 6B). Esta asociación fue posteriormente validada por ensayos de coimmunoprecipitación en células de adenocarcinoma cervical humano HeLa (fig. 6C) (Palma & Castro, 2019).



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	0	45	542	0,0317	54	1317	0,0195782	53	1080	0,039253	65	2052	0,034211
Hnmpul2	84940	0	0	0	0	0	0	5	7	0,000358	0	0	0	5	7	0,0002247	0	0	0
Hnmpk	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
Hnmpf	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	0,001648
Srsf2 (SC-35)	25476	1	2	0,00032	0	0	0	2	6	0,00103	0	0	0	1	2	0,00022	0	0	0
Hnmpm	73741	5	9	0,00047	0	0	0	14	30	0,00165	0	0	0	14	29	0,00101	0	0	0





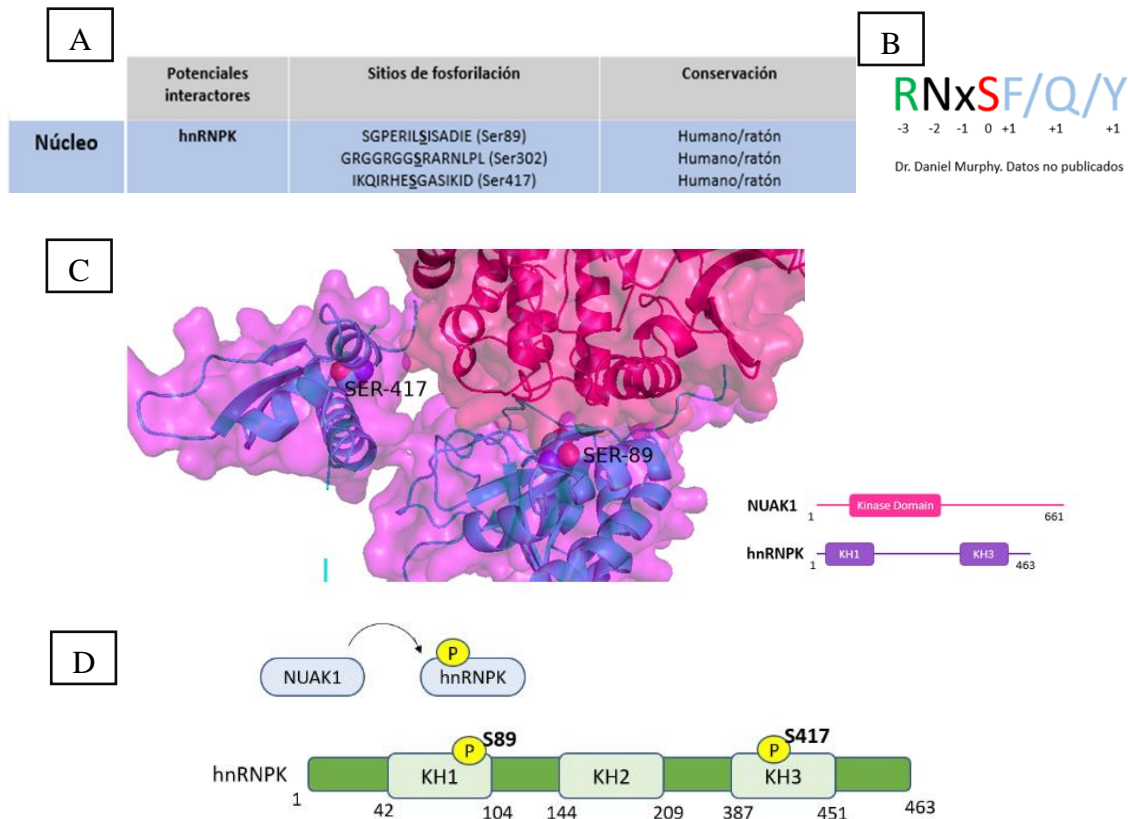
**Figura 6: hnRNPk es un interactor de NUAk1.** (A) Resultado de análisis de ontología de genes realizado a todos los potenciales interactores de NUAk1, donde se observa unión a ARN como uno de los principales roles. (B) MudPIT a partir de fracciones nucleares y citoplasmáticas de fibroblastos de embrión de ratón inmortalizados (iMEF) que expresan FLAGmNUAK1 WT o FLAGmNUAK1 KR44/71AA (mutante citoplasmático). La tabla muestra el recuento total de péptidos (P), el recuento de espectros distribuidos (dS) y el factor de abundancia espectral normalizado distribuido (dNSAF) observados para cada proteína identificada en las purificaciones FLAG de control, FLAG-NUAK1 WT murina y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA (n= 3). NE=Extracto Nuclear; CE= Extracto Citoplasmático. (C) Las células HeLa se transfectaron con Lipofectamina 2000 durante 48 horas con pCMV2-hNUAK1 o pCMV5-3X HA-hNUAK1. Posteriormente, las células se lisaron y se incubaron con anticuerpos anti-FLAG y anti-HA durante la noche. La precipitación se llevó a cabo con resina A/GPlus.

### 1.6 NUAk1 en cáncer y su potencial relación con G6PD

NUAK1, también denominada ARK5 (AMPK related kinase member 5) es una serina/treonina quinasa de 75 kDa, miembro de las 14 proteínas relacionadas a AMPK, con las que comparte un dominio quinasa conservado (Jaleel et al., 2006). NUAk1 se ha encontrado ampliamente sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, donde además se correlacionó con un peor pronóstico y una menor supervivencia en pacientes (Chang et al., 2012; Cui et al., 2013; S. Lu et al., 2013; Phippen et al., 2016). De manera concordante, estudios han demostrado que NUAk1 promueve la supervivencia, transformación, migración, invasión y metástasis de las células cancerígenas (Bell et al., 2014; Chang et al., 2012; Phippen et al., 2016; Suzuki et al., 2003). Adicionalmente, favorece la respuesta al estrés oxidativo al promover el importe del factor de transcripción NRF2 en células de cáncer colorrectal (Port et al., 2018). Estos antecedentes han permitido postular a la quinasa NUAk1 como un potencial blanco terapéutico. Sin embargo, muchos de los mecanismos por los cuales ejerce esta función continúan siendo desconocidos.

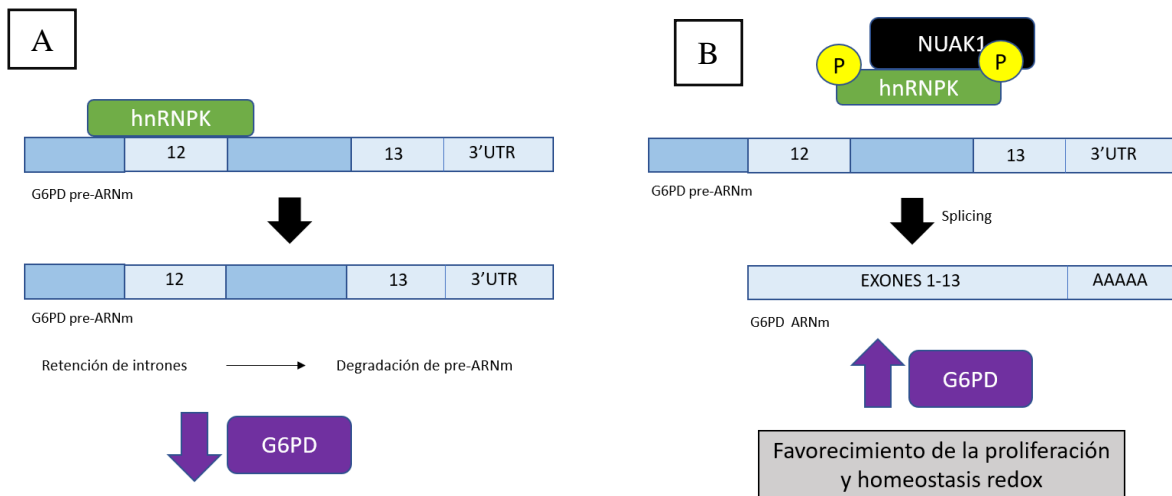
Con el antecedente de la asociación NUA1-hnRNP, se sugirió que NUA1 podría fosforilar directamente a hnRNP. Para evaluar aquello se realizó una búsqueda de potenciales residuos de fosforilación para NUA1 en la estructura de hnRNP en el servidor *GPS*, encontrándose motivos que involucran tanto la Serina-89 como la Serina-417, que forman parte de los dominios KH1 y KH3, respectivamente (fig.7A). Cabe destacar que estos motivos de fosforilación son altamente coincidentes con el motivo obtenido de manera experimental por el Dr. Daniel Murphy (Universidad de Glasgow, Reino Unido) (fig.7B)

Para obtener una referencia acerca de la disposición de ambas proteínas en conjunto, se realizó un acoplamiento (o “*docking*”) molecular, que permitió determinar que el dominio quinasa de NUA1 se encuentra cercano a los dominios KH1 y KH3 (con los respectivos residuos de serina) (Azócar & Castro, 2022). Dado que la estructura de los dominios KH es determinante para su interacción con ARN blanco (Paziewska et al., 2004), una fosforilación mediada por NUA1 podría perjudicar su función en la regulación del *splicing* de *G6PD* (fig.7C).



**Figura 7: NUAK1 fosforila potencialmente los residuos S89 y S417 de hnRNPK. (A)**Tabla de sitios de fosforilación putativos para NUAK1 en hnRNPK, realizada con el servidor del sistema de predicción basado en grupos (GPS 5.0). (B) Motivo de fosforilación de NUAK1 del Dr. Murphy. (C) El acoplamiento molecular entre NUAK1 y hnRNPK se realizó utilizando el modelo de homología NUAK1 (servidor web MODELLER) y la estructura predicha AlphaFold de hnRNPK (P61978) en el servidor HDOCK (algoritmo de acoplamiento híbrido de modelado basado en plantillas y acoplamiento libre). (D) Esquema de la potencial fosforilación de NUAK1 sobre los dominios KH de hnRNPK.

Dados los antecedentes, el siguiente trabajo propone a la quinasa NUAK1 como un potencial regulador negativo de la actividad de hnRNPK sobre la inhibición del *splicing* de *G6PD*. En consecuencia, NUAK1 estaría favoreciendo de manera indirecta los niveles de *G6PD*, proponiendo un nuevo mecanismo por el cual NUAK1 lleva a cabo sus funciones en la promoción de la progresión tumoral, al favorecer la respuesta a estímulos de proliferación y homeostasis redox, mediados por la primera enzima de la vía de las pentosas, *G6PD*.



**Figura 8: Proyecto de investigación propuesto:** (A) Esquema del efecto conocido de hnRNPK uniéndose al exón 12 de *G6PD* y generando retención de intrones, con disminución de copias de ARNm maduro de *G6PD*. (B) Esquema del efecto de NUAK1 sobre hnRNPK, donde impide que esta se una a la zona regulatoria del exón 12 de *G6PD*, aumentando indirectamente el número de copias de ARNm maduro de *G6PD*. Elaboración propia.

## **2. Hipótesis y objetivos del trabajo**

### **2.1 Hipótesis**

NUAK1 aumenta el *splicing* de *G6PD* a través de la inhibición de hnRNPk, favoreciendo su expresión como respuesta ante factor de crecimiento en células de cáncer colorrectal.

### **2.2 Objetivo General**

Determinar el efecto de NUAK1 sobre la expresión de *G6PD* mediada por hnRNPk, en células de cáncer colorrectal en un contexto de factor de crecimiento.

### **2.3 Objetivos específicos**

1. Analizar *in silico* el efecto estructural de la potencial fosforilación de hnRNPk dependiente de NUAK1 en la interacción con el pre-ARNm de *G6PD*.
2. Determinar el efecto de NUAK1 sobre el *splicing* de *G6PD* mediado por hnRNPk.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Anticuerpos**

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: *G6PD* G-6 (sc-373887), hnRNPK (D-6), GAPDH (6C5), HDAC1 (C19), ERK1/2 (C-9) y p-ERK (12D4) de *Santa Cruz Biotechnology* (Dallas, TX). Histona H3 (1791) de *Abcam* (Cambridge, UK). Anti-FLAG (M2) y anti-HA (clone 7) de *Sigma* (St. Louis, MO, USA). Anti-pS473 Akt (4060), Anti-pan Akt (4691) y Anti-ARK5 (4458) de *Cell Signaling* (Danvers, MA, USA). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (anti-mouse, anti-rabbit y anti-goat) fueron adquiridos de *BioRad* (*Hercules, CA*).

##### **3.1.2 Reactivos**

Los Inhibidores de proteasa y fosfatasa fueron adquiridos *en Sigma-Aldrich* (*St. Louis, MO, USA*). Para los ensayos de transfección se utilizó Lipofectamina 2000 de *Invitrogen* (Carlsbad, CA). La resina A/G Plus se obtuvo de *Santa Cruz Biotechnology* (*Dallas, TX*). El TRizol™ Reagent (#15596018) fue adquirido de *Thermo Fisher Scientific*. Se utilizó el kit M-MLV Reverse Transcriptase, y los oligo-DT/random primers de *Promega* para retrotranscripción. Se utilizó el kit KAPPA SYBR FAST (KK KK4601) de *Sigma Aldrich* para qPCR. Se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix (M712) de *Promega* para PCR convencional El inhibidor específico de NIAK1, HTH-01-015 fue adquirido en *Cayman Chemical* (*Ann Arbor, MI*). Insulina (I2643-25MG) de *Sigma-Aldrich*.

##### **3.1.3 Cultivo celular**

Se utilizaron las líneas celulares HCT116 *p53*<sup>-/-</sup>, HEK293T y DLD-1, las cuales fueron mantenidas en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, USA) y en Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Hyclone, Logan, UT, USA), ambos suplementados con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone), y 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en estufa húmeda de 37°C con atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares fueron criopreservados en 10% DMSO y 90% de FBS en nitrógeno líquido. Todas las células utilizadas en este estudio fueron regularmente testeadas (6 meses) de potencial contaminación de micoplasma usando el Kit: EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries).

### 3.1.4 Plásmidos

Para la transfección se utilizaron los plásmidos pCMV-FLAG-hNUAK1-WT; pCMV-FLAG-empty; pCMV-HA-NUAK1-WT, pCMV-HA-empty y pCMV-myc-his-hnRNPK. Para el ensayo de reportero de luciferasa se utilizó el plásmido pSGDlucV3.0 (Plasmid #119760) de Addgene. Se utilizaron las enzimas de restricción XHOI y APAI (*New England Biolabs*) para subclonar el fragmento de *G6PD* (E11-I11-E12) del vector pCDNA.3.1*G6PD*.E.I.E (sintetizado en GenScript, China). entre ambas luciferasas del vector pSGDlucV3.0.

## 3.2 Métodos bioinformáticos

### 3.2.1 Modelamiento de ARN

Puesto que la estructura de interés corresponde al exón 12 de *G6PD* (que a su vez contiene los nucleótidos 43-72 de regulación de hnRNPK), cuya conformación tridimensional no se encuentra disponible en ninguna base de datos, fue requerido el modelamiento de este ARN (secuencia: CGACGAGCUCCGUGAGGCCUGGCGUAUUUUCACCCCACUGCUGCACCAGAUUGAGCUGGAGAAGCCCAAGCCCAUCCCCUAUAUUAUGGCAG). En primer lugar, se obtuvo la predicción de su estructura secundaria, para ello se utilizó el paquete *ViennaRNA Package 2.0 RNA\_fold* descargado desde el sitio web de la universidad de Vienna (<https://www.tbi.univie.ac.at/RNA/index.html#download>). Este programa permite realizar la predicción de la estructura de ADN y ARN basado en tres algoritmos de programación dinámica: el algoritmo de energía libre mínima, que produce una estructura óptima única; el algoritmo de función de partición que calcula las probabilidades de pares de bases en el conjunto termodinámico, y el algoritmo de plegamiento subóptimo, que genera todas las estructuras subóptimas dentro de un rango de energía dado de la energía óptima (Lorenz et al., 2011). La ventaja de este paquete es que permite la predicción a partir de la secuencia de nucleótidos sin requerir información experimental del ARN en cuestión.

Para el modelamiento de la estructura terciaria se utilizó el output del programa *RNA fold* en formato de puntos y paréntesis (*dots and brackets*) en el webserver RNA Composer (*Automated RNA structure 3D modelling server*) del *Institute of Bioorganic Chemistry, Polish*

*Academy of Sciences* y del *Institute of Computing Science, Poznan University of Technology*. El método de modelamiento se basa en el principio de traducción automática y opera en la base de datos *FRABASE* de ARN que actúa como el diccionario que relaciona la estructura secundaria del ARN y los elementos de la estructura terciaria. El archivo de salida consiste en un archivo en formato PDB que contiene las coordenadas de los nucleótidos y que puede ser visualizado en PyMol, Chimera, etc. (Biesiada et al., 2016).

### **3.2.2 Modelamiento de hnRNPK**

Para el caso de la ribonucleoproteína, se utilizó el modelo calculado por el programa AlphaFold (AF-P61978-F1-model\_v2), que describe a hnRNPK en los dominios de unión al ARN de interés (KH1 y KH3). Este programa es altamente eficiente en la predicción de estructura terciaria de proteína a partir de su cadena de aminoácidos, el cual es comparable con resultados obtenidos de manera experimental (Jumper et al., 2021). Para efectos de esta tesis, fue necesario modificar los residuos de serina89 y serina417 a fosfoserinas (potenciales blancos de la quinasa NUAK1). Para ello, se descargó y utilizó la extensión PyPTms (*post-translational modifications*) de PyMol (<https://pymol.org/2/>), mediante el uso de comandos en lenguaje Python, obteniendo un archivo de salida en formato PDB.

Una vez modificados los residuos de interés, fue necesario realizar una corrección de la energía libre, que compensara la adición de fosfoserinas en la estructura tridimensional de hnRNPK. Esto también se realizó en la estructura “nativa” o WT. Para ello, se utilizó el software Yasara, que ejecuta simulaciones de dinámica molecular para estructuras en solventes específicos, utilizando un método de campo de fuerza basado en Amber, que están optimizados para minimizar el daño causado a las estructuras cristalinas de proteínas (Krieger et al., 2009). El archivo de salida corresponde a un formato “sce” visualizable únicamente con la extensión Yasara View del programa. En esta extensión, se realizó la conversión del archivo a PDB, para su uso en trabajos posteriores. Para evaluar la calidad energética de ambos modelos de hnRNPK, se utilizó el servidor ProSA y para determinar el grado de diferencia entre la estructura WT y fosforilada, se hizo una superposición, alineamiento y cálculo de RMSD en PyMol.

### 3.2.3 Docking Molecular

Con el ARN del exón 12 de *G6PD* modelado y la proteína hnRNPk con sus modificaciones postraduccionales agregadas y corregidas, se procedió a realizar los *docking* moleculares de: hnRNPk-WT-*G6PD*-exón12 y hnRNPk-pS89-pS417-*G6PD*-exón12. Para esto se utilizó el programa HADDOCK de libre descarga, proporcionado por el *Computational Structural Biology group focusing on dissecting, understanding and predicting biomolecular interactions at the molecular level.* (Schmitz et al., 2012). Se realizaron *docking* de enfoque semi-flexible con un total de salidas de 100 distintos modelos donde primaron 10 modelos de menor energía libre para cada *docking* molecular. Para todos los modelos, se indujo únicamente la unión forzada en el sitio de interacción de la zona del exón 12 de *G6PD* que por literatura se conoce que interacciona con hnRNPk (Cyphert et al., 2013).

### 3.2.4 Análisis del *docking* molecular:

Para evaluar la calidad de los modelos de *docking* entre las distintas estructuras se utilizaron parámetros entregados por HADDOCK, como el RMSD del ligando, el score calculado para el *docking* y el score de confianza. Adicionalmente, se utilizaron DR-sasa, PDBsum (*PROCHECK* análisis) y PLIP, (*Protein-ligand Interaction profiler*) para evaluar calidad, zonas y tipos de interacción en cada modelo.

## 3.3 Métodos experimentales

### 3.3.1 Fraccionamiento sub-celular

Para el fraccionamiento de las porciones de núcleo y citoplasma, las células fueron colectadas en PBS 1X a 4°C. Luego fueron centrifugadas a 500 g/10 minutos y obtenido el pellet. Dependiendo del volumen de este se agregaron 5 volúmenes equivalentes de buffer de extracción de citoplasma (10mM HEPES (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl) con inhibidor de proteasa (1X) e inhibidor de fosfatasa (1X). Luego, las células fueron resuspendidas suavemente e incubadas en hielo por 10 minutos. A continuación, se les agregó NP-40 al 1% (v/v), se agitaron en vortex por 15-20 segundos y se reincubaron en hielo por 5 minutos (con entremedios de cortas agitaciones en vortex). Posteriormente, se centrifugaron a 2.400 g/5 minutos. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática y el pellet a la fracción nuclear. Una vez obtenido el citoplasma, se realizaron 3 lavados con



1 mL de buffer de extracción de citoplasma (sin inhibidor) para mejorar la pureza de la fracción nuclear. Para lisar los núcleos, se agregaron 3 volúmenes (relativos al volumen inicial del pellet) de buffer de extracción de núcleo (20mM HEPES (pH 7.9), 25% (v/v) glicerol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA). Se realizó la resuspensión con pipeta por 20 segundos. A continuación, los tubos se incubaron por 1 hora en hielo, agitando en vortex cada 10 minutos. Por último, se obtuvo el extracto nuclear al centrifugar a 18.800 g/10 minutos.

### **3.3.2 Western Blot**

Para obtener los lisados, las células fueron colectadas con PBS 1X a 4°C, se les agregó buffer de lisis (25mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA, 1% NP40, 5% Glicerol y 2mM MgCl<sub>2</sub>) más inhibidores de proteasa (1X) y fosfatasa (1X). Las células fueron resuspendidas y dejadas en agitación a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, fueron centrifugadas a 18.800 g/15 minutos y el sobrenadante (concentrado de proteínas) fue cuantificado por el método de Bradford. Las muestras fueron preparadas para tener una concentración de 50 µg en 30 µL con buffer de carga 6X. Las proteínas en las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y luego transferidas por 16 horas a 30 Volt a una membrana de PVDF (*Immobilion, Millipore*). Luego, las membranas fueron incubadas por 1 hora con leche descremada 5% disuelta en TBS-tween (TBS con 0.1% de tween), lavadas 3 veces por 5 minutos con TBS-tween e incubadas con la dilución del anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-tween y se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia con el reactivo ECL (*General Electric Healthcare, Amersham, UK*) y un fotodocumentador.

### **3.3.3 Inmunoprecipitación**

Los lisados celulares fueron obtenidos utilizando el buffer de lisis (25mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA, 1% NP40, 5% Glicerol y 2mM MgCl<sub>2</sub>) con inhibidores de proteasa (1X) y fosfatasa (1X). Luego fueron cuantificados y llevados a la misma concentración utilizando buffer de lisis como solvente. Para el “*pre-clearing*” se utilizó resina A/G Plus por 1 hora a 4°C en agitación. La inmunoprecipitación se realizó al incubar con el anticuerpo correspondiente por toda la noche a 4°C en agitación. Para inmunoprecipitar HA se utilizó el anticuerpo anti-HA (clone 7, *Sigma*) y para inmunoprecipitar FLAG se utilizó

anti-FLAG (M2, *Sigma*). Las coimmunoprecipitaciones (CoIP) fueron analizadas por *Western blot* con anticuerpos específicos para cada experimento.

### **3.3.4 Inmunoprecipitación de ARN (RIP)**

Los lisados celulares fueron obtenidos utilizando el buffer de lisis (25mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA, 1% NP40, 5% Glicerol y 2mM MgCl<sub>2</sub>) con inhibidores de proteasa (1X) y fosfatasa (1X), en agitación a 4°C. Se obtuvo entre 5-10 mg de proteína por muestra en 1 mL. Luego, del lisado total, se obtuvieron 100 µL (10%) para el *input* de ARN (se le agregaron 400 µL de Trizol) y 50 µg para el *input* de proteína, los que fueron transferidos a un tubo eppendorf independiente. Posteriormente, con el resto del lisado total se realizó el “preclearing”, se utilizó resina A/G Plus por 1 hora a 4°C en agitación. Para la fase de inmunoprecipitación, se utilizó el anticuerpo anti-myc toda la noche a 4°C. Luego de lavar la resina 3 veces (muy suavemente), se separó un 20% del volumen conteniendo la resina control de inmunoprecipitación (para control de precipitación de myc-hnRNPK por western blot) y al 80% de resina restante se le agregó Trizol (fracción desde donde se obtuvo el ARN para su extracción y detección por RT-qPCR).

### **3.3.5 Extracción de ARN**

Para la obtención del ARN, las células cultivadas fueron lavadas con PBS 1X a 4°C, raspadas con TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*) y congeladas a -80°C. La extracción de ARN total se realizó con el método fenol-cloroformo y alcohol isopropílico 75% en agua DEPC. Una vez extraído el ARN, fue resuspendido en agua DEPC. Para eliminar ADN genómico, se realizó el tratamiento con la enzima DNAsa del kit TURBO DNAsa (*Invitrogen*). La cuantificación se realizó a 260 nm con el equipo TECAN Infinite 200 PRO, donde una densidad óptica de 1 corresponde a 40 µg de ARN. La pureza del ARN extraído fue evaluada con el cálculo del índice 260/280, donde un valor ideal corresponde a 2, con un mínimo de aceptabilidad de 1,7. Para evitar su degradación, se realizó la síntesis de cDNA inmediatamente después de la extracción.

### **3.3.6 Síntesis de cDNA**

Un total de 1 µg de ARN de cada muestra en volumen final de 20 µL fue transcrito inversamente a cDNA utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) en el

termociclador Veriti de *Applied Biosystems*, utilizando random primers u oligo-DT, para la obtención de un pool de cDNA proveniente de ARN inmaduro y otro pool desde ARN maduro.

### 3.3.7 PCR en tiempo real

El análisis de PCR cuantitativa se realizó con el kit SYBRfast mix en el equipo AriaMX Real-Time PCR Agilent. Los partidores para la detección de los productos se describen en la tabla 1. Todos los partidores fueron utilizados en una concentración de 10µM y sometidos a una prueba de eficiencia con diluciones seriadas de producto de PCR/cDNA (Material Anexo 2,3). Los datos de expresión fueron normalizados para el gen de β-actina. Algunos set de partidores requirieron estandarización (Anexo 1) con temperatura de alineamiento de 60°C y uso de 5% de DMSO, el cual sólo favorece la especificidad de la reacción de PCR en tiempo real, al disminuir la formación de estructuras terciarias en los templados, sin afectar los resultados experimentales (Kang et al., 2005; Winship, 1989).

**Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo de esta tesis.**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Orientación
F_EXON_11 <i>G6PD</i>	TCATCCTGGACGTCTTCTGC	Forward
F_INTRON_11 <i>G6PD</i>	AAGCCATACCATGTCCCCTC	Forward
R_EXON_12 <i>G6PD</i>	ATAAATATAGGGGATGGGCTTGGGC	Reverse
F2_INTRON_11 <i>G6PD</i>	ATACCTGTGGGCTATGGGGT	Forward
R2_EXON_12 <i>G6PD</i>	GCAGTGGGGTGAAAATACGC	Reverse
hACTB_F	GATGAGATTGGCATGGCTTT	Forward
hACTB_R	CACCTTCACCGTTCCAGTTT	Reverse

### 3.3.8 Electroforesis en gel de agarosa

El producto de PCR fue preparado con el colorante de carga de ADN TriTrack (*Thermo Scientific*) 6X diluido a 1X, homogeneizado y cargado en cubetas de 20 µL-60 µL de un gel de agarosa en concentración de 1 o 2% en 1X buffer TAE. La electroforesis fue llevada a cabo por 25 minutos para productos de qPCR y de PCR convencional, a 100 mV en buffer TAE 1X para ambos casos. Como marcador se utilizó el reactivo DNA Ladder de 100 a 1000 pares de bases de *Thermofisher*. Para la determinación de integridad de ARN, se hizo

recambio del buffer de la cámara electroforética por TAE 1X diluido en agua DEPC estéril. La visualización de los geles se realizó con el equipo transiluminador UV.

### **3.3.9 Ensayo de reportero de splicing de doble luciferasa**

Para este ensayo se sembraron 200.000 células en placas *six-well*, tras 24 horas fueron transfectadas con el vector pSGDlucV3.0-*G6PD*-exon11-intrón11-exón12 por toda la noche. Posteriormente, las células HCT116P53-/- o HEK293T (confluencia 80%) fueron lavadas con PBS 1X a 4°C y raspadas con buffer de lisis del kit de doble luciferasa de *Promega*. Luego el lisado fue transferido a placas blancas de luminiscencia de 96 pocillos, se agregó el reactivo A y se midió en primer lugar la actividad de Rluciferasa (renilla), para luego agregar reactivo stop-and-Glo y medir la actividad de luciferasa de luciérnaga en equipo TECAN.

### **3.3.10 Cuantificación y análisis estadísticos**

Las densitometrías de *western blots* fueron realizadas en ImageJ y colectadas en archivos excel. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados en GraphPad Prism 8. La significancia estadística fue determinada por la prueba t-Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 4. Resultados

### 4.1 Objetivo específico 1: Analizar *in silico* el efecto estructural de la potencial fosforilación de hnRNPK dependiente de NUA1 en la interacción con el pre-ARNm de *G6PD*

#### 4.1.1 Modelamiento de ARN: Predicción de estructura secundaria de ARN exón 12 *G6PD*

Para obtener una estructura del ARNm del exón 12 de *G6PD* (nucleótidos del 1 al 100), en primer lugar, se realizó una predicción de estructura secundaria en el paquete RNA del programa Vienna, bajo los parámetros descritos en métodos. Esta estructura se obtiene en la nomenclatura Vienna de puntos y paréntesis, donde los puntos representan las bases de nucleótidos no apareados en la secuencia y los paréntesis aquellos que si lo están. En el segundo caso, un paréntesis cerrado indica que la base está apareada con una base ubicada anterior en la secuencia, permitiendo la representación de doble hélices, bucles internos, bucle de bulto, bucle de horquilla y bucle de múltiples ramas. Para este caso, la representación contiene 1 bucle múltiple, 3 hélices dobles con 2 bucles internos y 2 bucles en horquilla (fig. 9A).

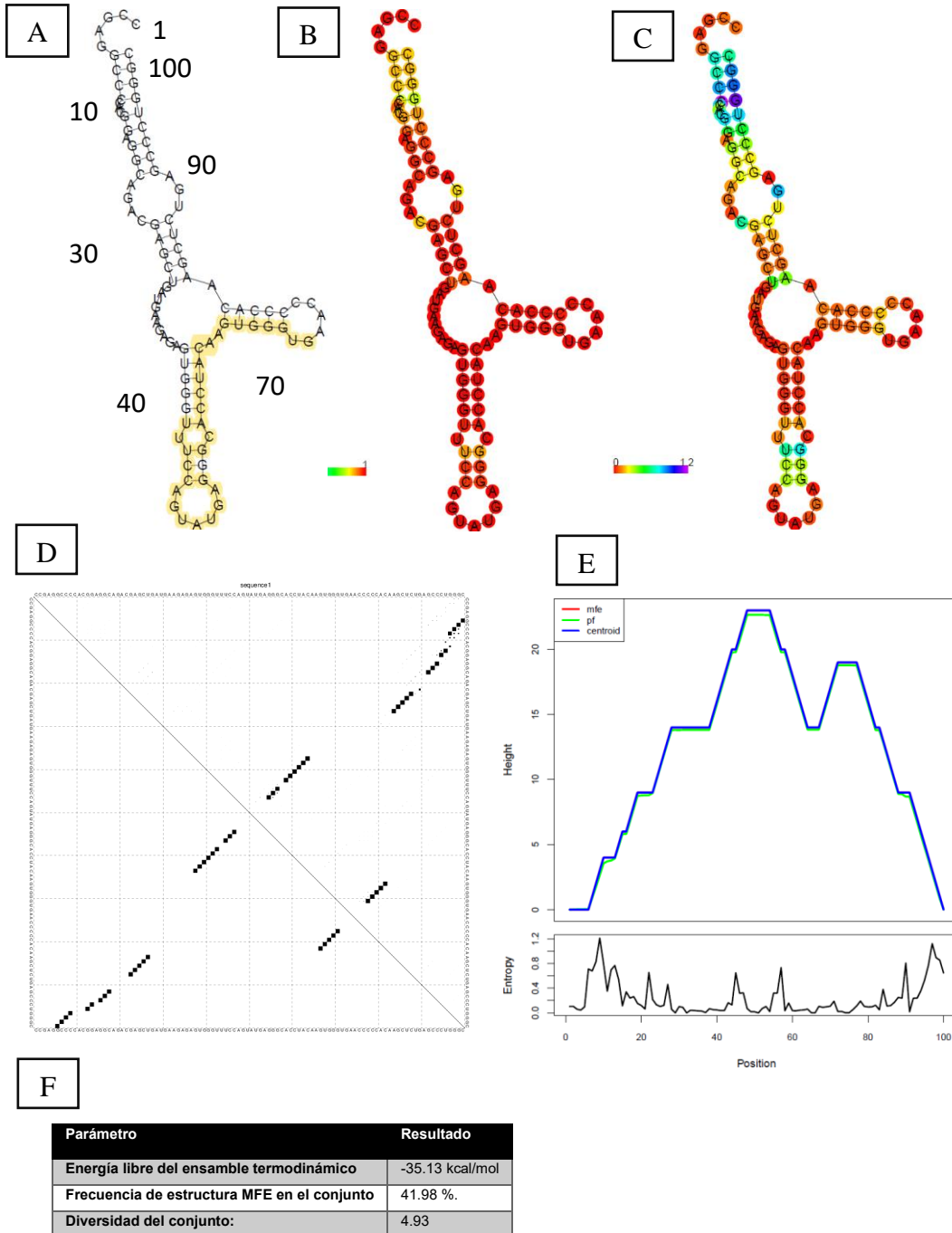
Respecto a la fiabilidad de la disposición de los nucleótidos en la predicción, se obtuvieron 3 representaciones. La representación de la estructura con menor energía libre (MFE: *del inglés: minimum folding energy*), calculada según los algoritmos del programa (fig. 9A), donde se destaca en amarillo el área conocida de interacción con hnRNPK. La representación según probabilidades de pares de bases (fig. 9B), donde los valores fluctúan entre 0 y 1 (azul y rojo), siendo el rojo el color que representa aquellas bases apareadas entre sí de manera más termodinámicamente favorable. Por último, la representación de entropía posicional (fig. 9C), que varía entre 0 y 1.2 (rojo-azul), que permite determinar regiones más confiables dentro de la misma estructura, donde aquellas más favorables son las que contienen menor entropía (colores cercanos al rojo). Estos parámetros son útiles en la evaluación de la confiabilidad del modelo, permitiendo dar cuenta que la mayoría de la estructura predictiva del exón 12 de *G6PD* presenta condiciones de fiabilidad suficientes, sobre todo en los nucleótidos que pertenecen a la zona de interacción conocida de hnRNPK.

Para una evaluación más profunda de la calidad de la estructura, se utilizó el diagrama de puntos (fig. 9D) que muestra las probabilidades de los pares dentro del conjunto de equilibrio en una matriz  $n \times n$  y permite visualizar estructuras alternativas. En el gráfico, un cuadrado en la fila  $i$  y la columna  $j$  indica un par de bases, y el área de un cuadrado en la mitad superior derecha de la matriz es proporcional a la probabilidad del par de bases  $(i,j)$ , mientras que la mitad izquierda inferior muestra todos los pares (o dobles hélices) que pertenecen a la estructura MFE. Para el caso de la porción del exón de *G6PD* modelado, ambas porciones del gráfico son coincidentes, indicando que el apareamiento de bases es altamente confiable y también, que hay una muy baja probabilidad de formación de otras estructuras que no hayan sido representadas en la estructura MFE.

Por otro lado, se obtuvo el diagrama de montaña, más útil en secuencias de ARN largas. Este es un gráfico  $xy$  que traza el número de pares de bases que encierran una posición de secuencia versus la posición. En él se muestran 3 curvas, una derivada de la estructura MFE, otro de la estructura centroide (descrito en material suplementario S1), y un tercero de entropía posicional. Adicionalmente, el diagrama muestra el cálculo de la entropía dentro de toda la secuencia de ARN, donde los “peaks” indican una mayor entropía, y las zonas planas, una zona con menor entropía y, por lo tanto, más estable. En la predicción de ARN, se encuentra una superposición de las curvas en el gráfico, indicando una alta compatibilidad entre los parámetros calculados; así mismo, se encuentra que la zona de interacción de hnRNPk, se encuentra mayoritariamente bien definida (fig. 9E).

Adicionalmente, la estructura puede ser evaluada de acuerdo a los parámetros de: energía libre del ensamble termodinámico (fig.9F), donde se obtuvo un valor de  $-35.13$  kcal/mol, el cual es indicativo de una predicción confiable. También se evalúa por la frecuencia de estructura MFE en el conjunto, que representa la similitud entre la predicción MFE y las predicciones alternativas (por probabilidad de apareamiento de pares), donde se obtuvo un valor de 41.98 %, dentro del rango aceptable de entre 40-70%. Por último, el parámetro de la diversidad del conjunto, corresponde a disimilitud entre la predicción y las estructuras alternativas, con un valor de 4,93%, donde un porcentaje aceptable fluctúa entre 0 y 10% (fig. 9F) (Lorenz et al., 2011).

CCGAGGCCCCACGGAGGCAGACGAGCUGAUGAAGAGAGUGGGUUUCCAGUAUGAGGG  
 CACCUACAAGUGGGUGAACCCCCACAAGCUCUGAGCCCUGGGC

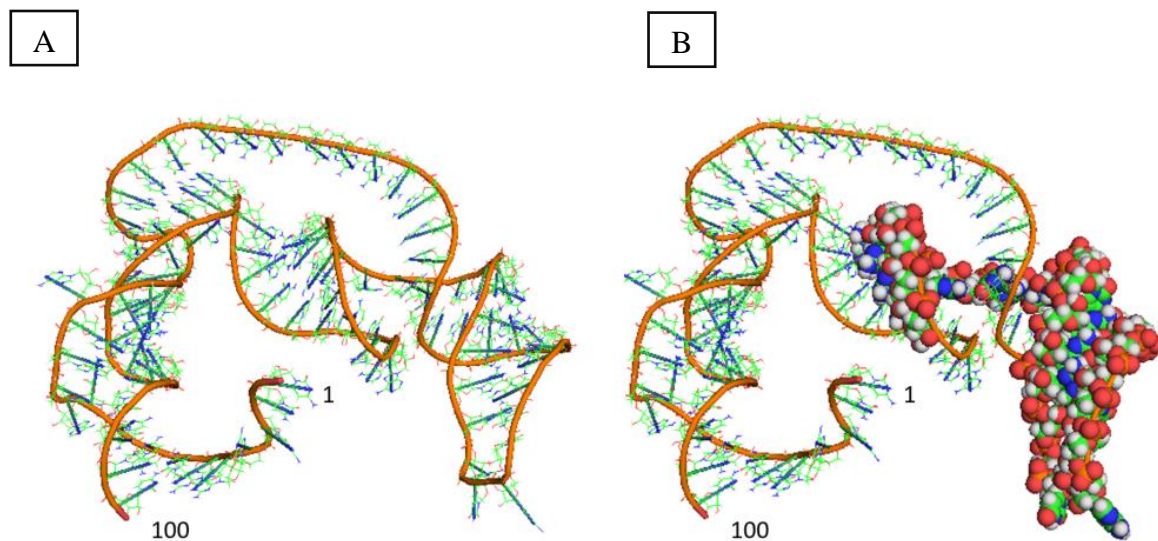


**Figura 9: Predicción de estructura secundaria del ARN del exón 12 de *G6PD* y evaluación termodinámica.** (A) Estructura de mínima energía (MFE) obtenida, en amarillo se destaca la zona de interacción de hnRNPk. (B) Probabilidades de apareamiento entre pares de bases en la

estructura MFE, donde azul y rojo representan una baja y alta probabilidad, respectivamente. (C) Esquema de entropía posicional de cada nucleótido, donde menor entropía (rojo-amarillo) equivale a mayor estabilidad estructural. (D) Diagrama de puntos del ARN (E) Diagrama de montaña del ARN (F) Tabla de parámetros termodinámicos del ensamble de la estructura secundaria.

#### 4.1.2 Modelamiento de ARN: Estructura terciaria de ARN exón 12 *G6PD*

La predicción de la estructura secundaria permitió el modelamiento tridimensional del ARN a partir de la secuencia y el formato de puntos y paréntesis calculados. Como archivo de salida se obtuvo la conformación 3D en formato PDB, que contenía cada uno de los nucleótidos junto a su disposición en los planos x, y, z en el espacio. El resultado se muestra en la figura 10. Dado que esta estructura corresponde a la representación terciaria de la estructura secundaria evaluada anteriormente, no se realizaron análisis a nivel del ensamble terciario. Por esta razón, se definió como la estructura a utilizar en los posteriores *docking* moleculares.



**Figura 10:** Predicción de la estructura terciaria (tridimensional) del ARN del exón 12 de *G6PD*, obtenida con *RNA composer*. (A) Se encuentra la estructura resultante del modelamiento tridimensional en estilo de líneas. Se muestra el inicio (1) y término (100) de la cadena nucleotídica. (B) Se destaca la zona regulatoria del *splicing* en estilo de esferas.

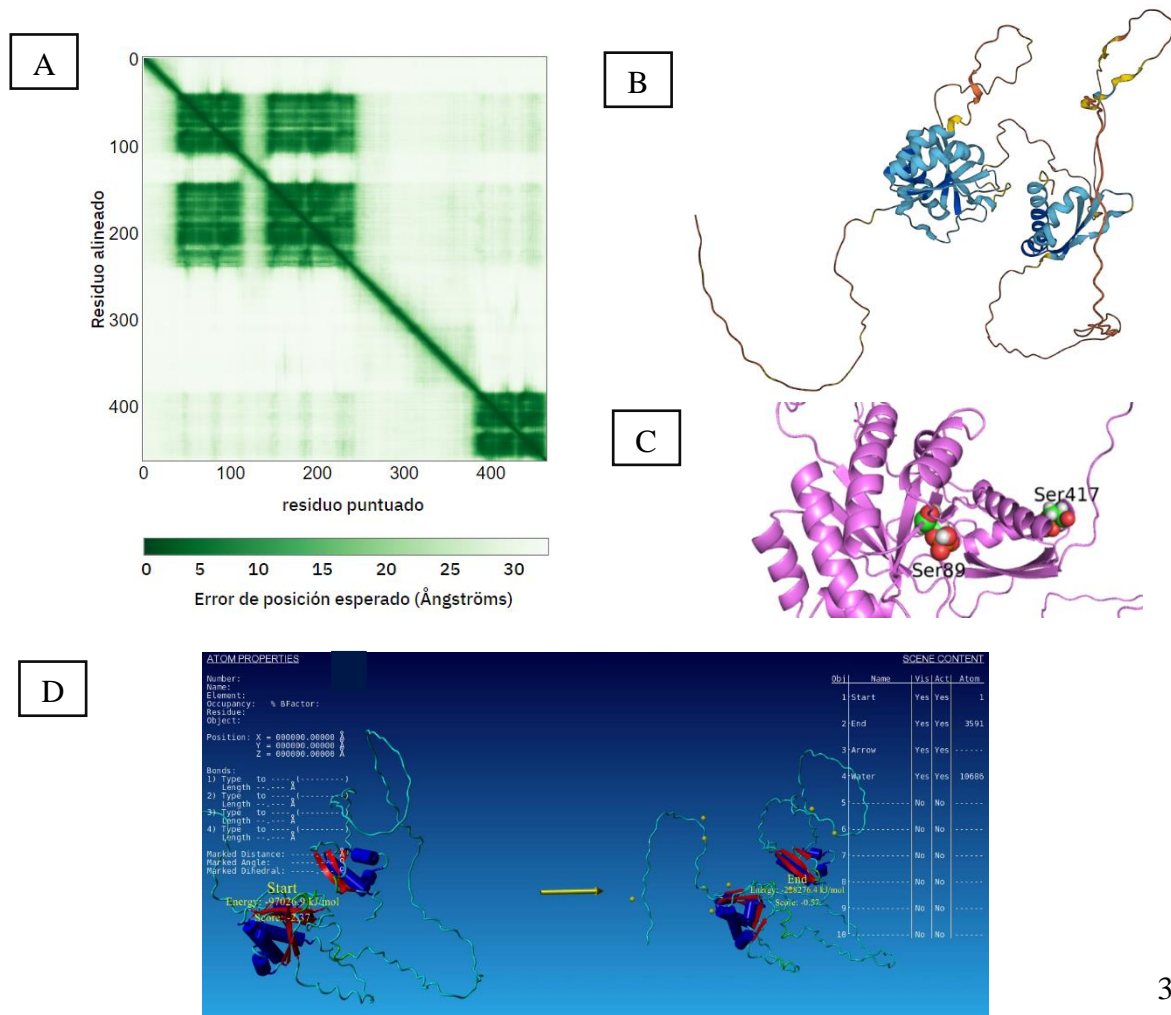


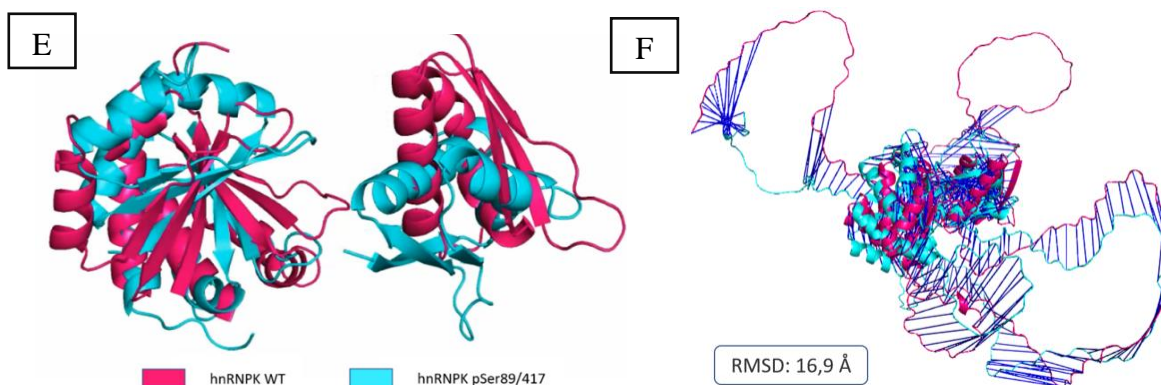
### 4.1.3 Modelamiento de hnRNPK: Fosforilación S89 y S417 y corrección de energía mínima

Debido a que la proteína hnRNPK no presenta una estructura cristalográfica disponible que defina experimentalmente la totalidad de su cadena aminoacídica, se utilizó la base de datos de inteligencia artificial AlphaFold, desde la cual se obtuvo el modelo predictivo de la configuración tridimensional de hnRNPK. Este programa es reconocido por su capacidad de predecir modelos altamente fiables al incorporar arquitecturas de redes neuronales y ciclos de entrenamiento basado en las características evolutivas, físicas y geométricas de las estructuras proteicas. En particular, AlphaFold utiliza la secuencia aminoacídica de interés y construye un alineamiento de secuencia múltiple (MSA) con datos de secuencias obtenidas a partir múltiples métodos (resonancia magnética nuclear, cristalografía de rayos X y microscopía crioelectrónica, etc.) en distintas bases de datos de proteínas (Jumper et al., 2021). La estructura disponible de hnRNPK presenta un gráfico de error de alineamiento de los dominios, el cual se expresa como error de la posición de un residuo esperado por AlphaFold en el residuo “x”, cuando las estructuras predictivas y verdaderas están alineadas en el residuo “y”. En otras palabras, permite evaluar la precisión entre dominios, donde un color verde oscuro (como el de dominios KH en este caso) indica que estos se encuentran cercanamente dispuestos entre sí, con un bajo error de posición (fig. 11A). Por otro lado, en términos de score de confianza representados por color, donde el azul representa los más confiables y los naranjos, los menos confiables (fig. 11B), se observa que la estructura disponible para hnRNPK **presenta alta confiabilidad** en términos de KH1 (residuos 42-104), KH2 (144-209) y KH3 (387-451).

Una vez obtenida la estructura “nativa” o WT de hnRNPK, se procedió a introducir *in silico* las fosforilaciones en los residuos Ser89 y 417 (fig. 11C), que representan potenciales blancos de la quinasa NUAK1. Para esto, se instaló la extensión pyTMS de PyMol, generando las modificaciones deseadas en base a *scripts*. No obstante, este programa no contiene un algoritmo que permita recalcular y redistribuir los residuos de aminoácidos de acuerdo a la adición de grupos fosfato, como es el caso. Por esta razón, fue necesario realizar una corrección de la energía mínima de la estructura. Para esto se utilizó el software Yasara minimization tool, que predice los mejores rotámeros de las cadenas de aminoácidos, al utilizar una capa de solvatación que reajusta los estados de protonación en

pH 7,4 y corrige los enlaces peptídicos e isómeros de cadena lateral incorrectos, minimizando la energía conformacional y preparando la molécula para una posterior simulación (Krieger et al., 2009). Para su comparación posterior, tanto la estructura WT como fosforilada de hnRNPK fueron sometidas a minimización de energía. El resultado fue una reducción de la energía libre de la proteína WT desde -155.909,3 a -227.949,2 y para la proteína fosforilada desde -97.026,9 KJ/mol hasta -228.276,4 KJ/mol (fig. 11D). Para determinar la calidad energética de ambos modelos, se utilizó *ProSA* (Wiederstein & Sippl, 2007) encontrando que ambos son energéticamente confiables (resultados descritos en fig. S2). Por último, para evaluar el cambio en la organización tridimensional de la cadena polipeptídica de hnRNPK, se realizó la superposición de las estructuras WT/fosforilada y un alineamiento con cálculo de RMSD. Se obtuvo un cambio conformacional en los dominios KH1, KH2 y KH3 en la proteína fosforilada respecto de la WT, con un RMSD de 16.9 Å, indicativo de que ambos modelos difieren estructuralmente. Este resultado es concordante con la hipótesis de que estas fosforilaciones afectan la capacidad de hnRNPK de unir sus ARN blancos en un acoplamiento molecular (*docking*), revisado a continuación.





**Figura 11: Modelamiento de hnRNP-K:** (A) Gráfico de error de alineamiento de hnRNP-K obtenido desde AlphaFold. (B) Modelo tridimensional de hnRNP-K obtenido por AlphaFold. Los colores azulados indican mayor confiabilidad del residuo, los naranjos, menor. (C) Introducción de residuos de fosfofosforina en S89 y S417 de hnRNP-K con la herramienta PyPTMs de PyMol. En rosado se muestran los dominios KH1-KH3 de hnRNP-K y en esferas los residuos modificados. (D) Resultado representativo de la minimización de energía en la estructura fosforilada de hnRNP-K realizado con el software Yasara y visualizado en Yasara View. (E) Superposición del modelo WT de hnRNP-K (rosado) y posterior (celeste) a la fosforilación y el ajuste de mínima energía. (F) Alineamiento de las estructuras y cálculo de RMSD en PyMol.

#### 4.1.4 Docking molecular hnRNP-K-WT-G6PD-exon12

Una vez obtenida la estructura del ARNm de *G6PD* desde el nucleótido 1 al 100 del exón 12 y la estructura de hnRNP-K-WT obtenida de AlphaFold, así como la correspondiente a hnRNP-K-pS89-pS417 con ajuste de mínima energía, se procedió a realizar los modelamientos de *docking* molecular con enfoque semi-flexible en el programa HADDOCK. Para evaluar si la fosforilación afecta la posibilidad de interacción forzada en cada uno de los modelos, se forzó que la zona de interacción intente contemplar el sitio conocido de interacción de *G6PD* con hnRNP-K (nucleótidos del 43-72). De cada estructura de hnRNP-K se obtuvieron un total de 100 conformaciones de posibles interacciones tridimensionales de ambas especies en un entorno de pH 7.0 y 37°C de temperatura. Estos fueron ordenados de acuerdo a la energía mínima según el algoritmo calculado por función de puntuación iterativa basada en el conocimiento ITScorePP o ITScorePR de HADDOCK. Es decir, aquellos modelos más estables, teniendo en consideración los primeros 10 para la evaluación visual (fig. S3, S4) y únicamente el primer modelo con mejores parámetros

energéticos y termodinámicos para un análisis más detallado de la interacción entre proteína y ARN.

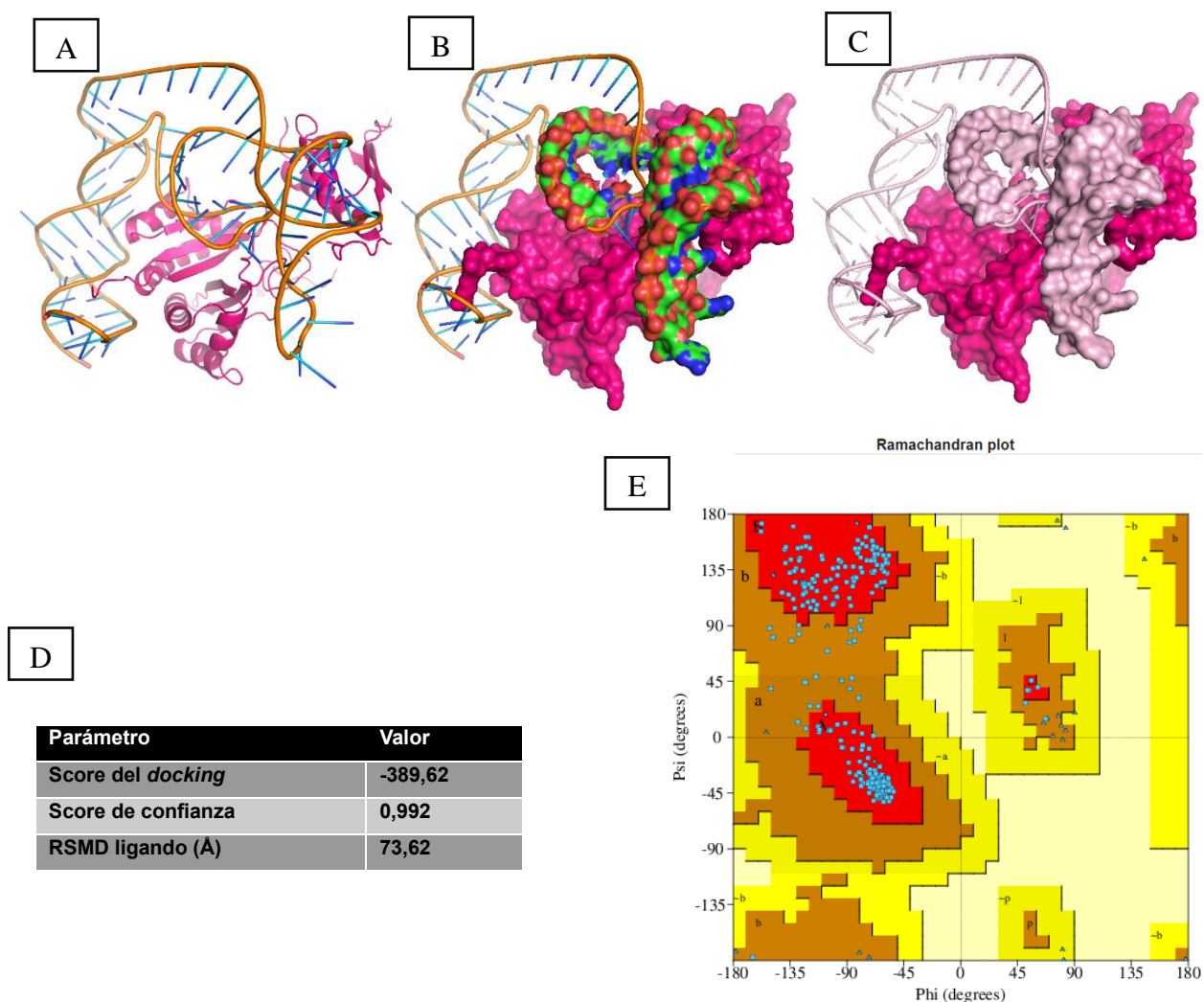
De manera interesante, al evaluar los modelos de interacción entre hnRNP-K-WT y *G6PD*, se encontró una mayor proximidad en general entre los dominios KH de la ribonucleoproteína, siendo en su mayoría de los top 10, disposiciones cercanas (algunas en forma de “tijera”) de los dominios hacia la zona regulatoria en el ARN (fig. S3). Respecto del primer modelo obtenido, en este se observa que la zona de interés en *G6PD* se encuentra dispuesta entre dichos dominios de manera favorable para una interacción con el ARN blanco, como se observa en las figuras 12.A, B y C, que muestran el *docking* en los modelos de “cartoon” y superficie; donde el enfoque en C muestra claramente la unión entre los dominios descritos anteriormente.

Respecto a su calidad, este modelo de apareamiento molecular *in silico* fue evaluado en primer lugar de acuerdo al parámetro de “puntaje de *docking*/apareamiento” molecular entre las especies, teniendo en consideración que los complejos entre proteína y ARN/ADN en formato PDB normalmente presentan una puntuación de acoplamiento de alrededor de -200. Para este caso, el puntaje es de -389,62, superior a todos los demás modelos que, según el algoritmo de HADDOCK, corresponden a modelos menos favorables energéticamente (fig.12D). Este valor, mientras más negativo sea, indica una mayor probabilidad de que el apareamiento entre las sustancias en interacción ocurra de la manera determinada. Por otro lado, el puntaje de confiabilidad también se define empíricamente en HADDOCK teniendo en consideración el puntaje de acoplamiento, para indicar la probabilidad de unión de dos moléculas de la siguiente manera:

$$\text{Puntaje de confianza} = 1,0/[1,0+e^{0,02*(Docking\_Score+150)}]$$

De esta manera, cuando la puntuación de confianza es superior a 0,7, es muy probable que las dos moléculas se unan; cuando la puntuación de confianza está entre 0,5 y 0,7, las dos moléculas podrían unirse; y cuando la puntuación de confianza es inferior a 0,5, es poco probable que las dos moléculas se unan. En nuestro caso, el puntaje de 0,992 indica que la unión entre hnRNP-K-WT con *G6PD* es muy probable. Por otro lado, el RMSD ligando es un parámetro calculado igualmente en HADDOCK, pero que no representa necesariamente una medida de la precisión del modelo (fig. 12D).

Posteriormente, se evaluó la calidad estereoquímica de la proteína en *docking* con el programa PDBsum, obteniéndose un ramachandran *plot* que describe la disposición de los ángulos phi y psi de los residuos de la proteína en interacción del PDB (fig. 12E). Las áreas en rojo corresponden a las regiones "centrales" que representan las combinaciones más favorables de valores phi-psi, esperando tener idealmente más del 90% de los residuos en estas regiones "centrales". Para este caso existe un total de 89,5% en región central (rojo) y un 10,5% en la región permitida (marrón) (fig. S5A). Dado que el porcentaje de residuos en las regiones "centrales" es una de las mejores guías para la calidad estereoquímica, el hecho de que la mayoría de los residuos se encuentren en zonas favorables, aporta confiabilidad al modelo.



**Figura 12: Modelos de *docking* molecular de mínima energía entre hnRNPk-WT/hnRNPk-pS89-pS417 y G6PD-exón12 realizado en HADDOCK. (A) Modelo en estilo "cartoon" de hnRNPk**

WT y ARNm del exón 12 de *G6PD*. (B) Modelo en estilo *surface*. Rosa: hnRNP-K-WT. Rojo, verde y azul: zona regulatoria del *splicing* de *G6PD*-exón12. (C) Modelo de *docking* molecular de mínima energía en estilo *surface* entre hnRNP-K-WT (rosa) y *G6PD*-exón12 (rosa claro). (D) Tabla con estadísticas de calidad del modelo, obtenidas por análisis en HADDOCK. (E) Ramachandran *plot* que muestra la calidad estereoquímica de hnRNP-K durante la interacción con *G6PD*-exón 12.

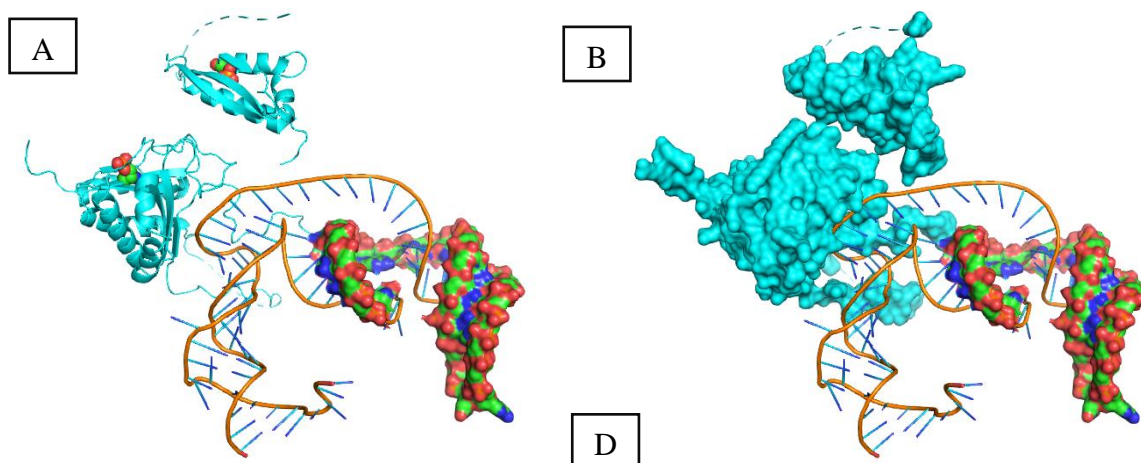
#### 4.1.5 *Docking* molecular hnRNP-K-pS89-pS417-*G6PD*-exon12

En el caso del modelamiento entre hnRNP-K fosforilada en sus residuos de serina 89 y 417 dependientes de NIAK1 y la zona regulatoria del *splicing* mediado por hnRNP-K en el exón 12 de *G6PD* inmaduro, se observa que, en las 10 principales conformaciones, el acoplamiento no es total en comparación con el modelo WT, quedando los dominios KH inadecuadamente dispuestos frente a la zona regulatoria del *splicing* en la mayoría de los modelos (fig. S4). Respecto de la conformación más termodinámicamente estable, esta presenta una distribución donde los dominios KH de la ribonucleoproteína no son capaces de acoplarse a la zona regulatoria (aún con el *docking* inducido en esa porción del exón) del ARNm de *G6PD*, indicando una menor posibilidad de unirse y llevar a cabo su función en la retención de intrones en *G6PD* (fig.13 A, B). Esto es importante, ya que al comparar el modelo con aquel donde hnRNP-K no se ha modificado postraduccionalmente, se observa una drástica variación en la disposición del ARN que interactúa con la proteína. En efecto, la zona de interés se encuentra dispuesta del extremo opuesto a la zona que logra interactuar con hnRNP-K, contrario al primer modelo WT, donde la unión entre ambas especies ocurre de manera favorable entre los dominios KH y la zona regulatoria de hnRNP-K. Esto permite determinar que al menos, **desde un enfoque *in silico*, las fosforilaciones potencialmente inducidas por NIAK1 afectarían la capacidad de hnRNP-K de unirse apropiadamente al exón 12 de *G6PD***, al ejercer una modificación en la estructura tridimensional mediada por una modificación postraduccional de la ribonucleoproteína.

En cuanto a los parámetros de calidad del modelo hnRNP-K-pS89-pS417-exón12, este presenta una puntuación de *docking* de -317,77; junto con un valor de confianza de 0,9663,

parámetros indicativos de que el modelo es altamente confiable, permitiendo su comparación con el modelo obtenido en la sección anterior.

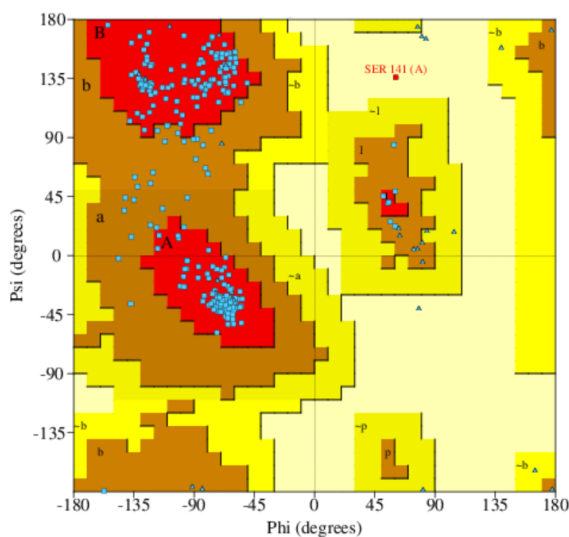
En cuanto a la calidad estereoquímica de la proteína fosforilada en el *docking*, en este caso existe un total de 85,9% de residuos en la región central, un 13,7% en la región permitida y un 0,4% en la zona no permitida (amarillo claro), pero que corresponden a residuos ubicados en regiones desordenadas ajenas a dominios KH de hnRNPK y, por lo tanto, pueden ser descartados del análisis (fig.S5B). De esta manera, aunque el modelo podría ser refinado, presenta suficiente confiabilidad para nuestros análisis. Una vez establecido que ambos modelos presentan características de calidad suficientes para ser considerados termodinámicamente probables, es posible realizar una comparación entre ambos.



Ramachandran plot

C

Parámetro	Valor
Score del <i>docking</i>	-317,77
Score de confianza	0,9663
RSMD ligando (Å)	95,17



**Figura 13: Modelo de *docking* molecular de mínima energía entre hnRNPk-pS89-pS417 y G6PD-exón12 realizado en HADDOCK.** (A) Modelo en estilo “*cartoon*”. (B) Modelo en estilo *surface*. Celeste: hnRNPk-WT. Naranja: G6PD-exón12. (C) Tabla con estadísticas de calidad del modelo, obtenidas por análisis en HADDOCK. (D) Ramachandran *plot* de la calidad estereoquímica de hnRNPk-pS89-pS417 durante su interacción con G6PD-exón 12.

#### 4.1.6 Comparación entre modelos de *docking* molecular

De manera comparativa, se evaluó el área de la interacción entre las distintas especies con el programa DR sasa, encontrándose los siguientes parámetros para hnRNPk-WT-exón12: superficie de 1650,37 de la proteína internada en el ARN; y área de ARN internado en la proteína de 1555,19. En el caso de hnRNPk fosforilada, el área de superficie de proteína internada en el ARN es de un valor menor (1534,02), así como el área de ARN introducido en la proteína (1449,19). En efecto, si se compara el área que existe en el interfaz de la unión proteína/ARN, se observa que el interfaz de interacción es mayor (1602,78) para la proteína nativa en comparación con su contraparte fosforilada (1491), indicando un acoplamiento más favorable en el primer caso entre ambas moléculas (fig. 14A, C).

Adicionalmente, se utilizó el software PLIP (*Protein-Ligand Interaction Profiler*) para determinar qué tipo de interacciones ocurrieron en los *docking* moleculares, para ambos casos de hnRNPk. Para la proteína nativa (WT) se encontró una cantidad mayor de puentes de hidrógeno que estabilizan la interacción, con un total de 29, contra sólo 14 de la proteína fosforilada. Por otro lado, las interacciones tipo puente salino son de 6 y 3, respectivamente; siendo la proteína WT en conformación con ARN, la única que presenta 1 interacción de tipo  $\pi$ -catiónica. En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína WT presenta una estabilidad global mayor de la interface de unión entre la proteína y el ARN (fig. 14B, D).

Los resultados a partir de todo el análisis bioinformático donde se modelaron, modificaron, evaluaron y analizaron las distintas conformaciones de acoplamiento entre proteína y ARN, nos permiten concluir que la fosforilación *in silico* de hnRNPk en residuos de serina potencialmente fosforilados por la quinasa NUAK1 no sólo **afectaría la capacidad de interacción entre la ribonucleoproteína con su ARN blanco** (G6PD inmaduro) en el sitio conocido de regulación (42-73); sino que también **la interacción entre ambas moléculas**



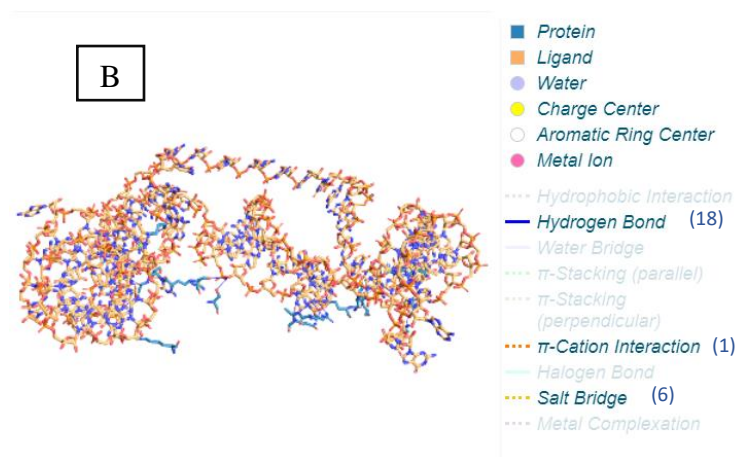
ocurriría en menor proporción, con una disminución en la superficie de contacto entre ambas especies, efecto que también está acompañado de un menor número de enlaces que conectan y estabilizan ambas estructuras. Esto permite a su vez inferir que, de manera experimental, **NUAK1** podría ejercer una función como regulador del *splicing* de *G6PD* a través de la fosforilación a hnRNPK, favoreciendo de manera indirecta los niveles de la enzima (evaluado en el objetivo específico 2).

### hnRNPK-WT-*G6PD* exón12

A

Objeto del <i>docking</i>	Área
Superficie de proteína en interacción	29000
Superficie de ARN en interacción	6845.67
Superficie de proteína sin interactuar	30555.2
Superficie de ARN sin interactuar	8496.04
ARN introducido en proteína	1555.19
Proteína introducida en ARN	1650.37
Interface proteína/ARN	1602.78

B

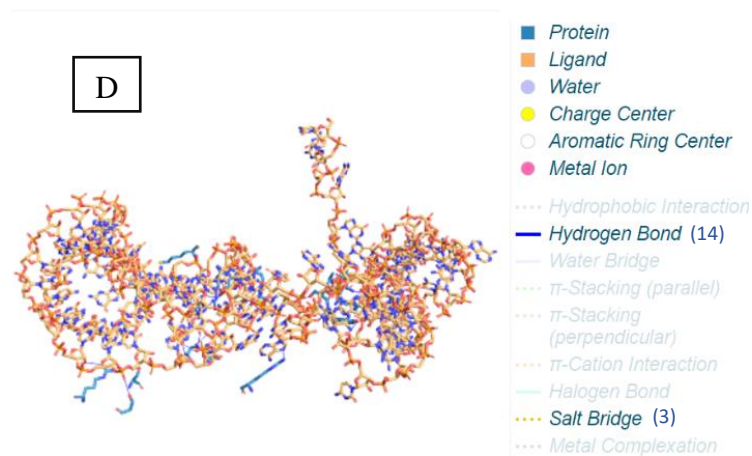


### hnRNPK-pS89-pS417-*G6PD* exón 12

C

Objeto del <i>docking</i>	Área
Superficie de proteína en interacción	29367.1
Superficie de ARN en interacción	6960.05
Superficie de proteína sin interactuar	30816.3
Superficie de ARN sin interactuar	8494.07
ARN introducido en proteína	1449.19
Proteína introducida en ARN	1534.02
Interface proteína/ARN	1491.6

D



**Figura 14: Estudio de la interacción hnRNPK-WT/pS89-pS417-*G6PD* exón12:** (A) Perfil de interacción según área de superficie entre hnRNPK-WT y exón 12 de *G6PD* y (B) su resultado de interacción proteína-ligando: La estructura presenta 18 puentes hidrógeno, 6 puentes salinos y 1 interacción  $\pi$ -catiónica (C) Perfil de interacción según área de superficie entre hnRNPK-pS89-pS417 y exón 12 de *G6PD* y (D) su resultado de PLIP: La estructura presenta 14 puentes hidrógeno y 3 puentes salinos.

## 4.2 Objetivo 2: Determinar el efecto de NUAK1 sobre el splicing de *G6PD*

### 4.2.1 Elección de los modelos celulares

Anteriormente se ha sugerido un potencial rol de la quinasa NUAK1 en la vía de las pentosas fosfato en células U2OS e iMEF, al encontrar que su depleción se relaciona con menores niveles de 6-fosfoglucolactonasa (6PGL) (Liu et al., 2012) y menores niveles de NADPH (Palma & Castro, 2019). Sin embargo, **la relación entre los niveles de NUAK1 y *G6PD* en el contexto de otros tipos de cáncer no ha sido estudiada**. Por ello, fue necesario evaluar en qué modelo celular de cáncer se podría investigar la relación entre NUAK1-hnRNPK y *G6PD*. Basándose en criterios como la incidencia, mortalidad y baja supervivencia, se incluyeron al cáncer de mama, colorrectal y glioblastoma para el análisis bioinformático de correlación en bases de datos públicos como R2 genomics y Gene Express Omnibus.

Para cáncer de mama HER (+) se encontró una correlación negativa en la expresión de NUAK1 y *G6PD* (fig.S6A). Para establecer la correlación específicamente por estadios, se utilizó la plataforma GEO. Se utilizaron los términos “*breast cancer*” y los resultados se filtraron por organismo, tejido y tipo de estudio, encontrando el set GSE43358. Este permitió comparar la expresión de ambas proteínas entre los grados histológicos I y III de 57 muestras de cáncer luminal A y B, HER+ y triple negativo, encontrando a NUAK1 expresado a la baja (no significativo) y *G6PD* regulado al alza, indicando que no existe una correlación en los ARNm de las proteínas (fig.S6B, S6C). Posteriormente, se evaluó la correlación en glioblastoma (GBM) y GBM recurrente, donde se obtuvo únicamente data disponible en R2 genomics, encontrando una leve correlación entre NUAK1 y *G6PD* (fig. S6D, S6E). Por último, se evaluó lo mismo para cáncer colorrectal en muestras del set GSE37892, que contiene 130 muestras de adenocarcinoma de colon (n=73 en estadio II y n=57 en estadio III). Se encontró que ambas proteínas se sobreexpresan en el estadio III, respecto del segundo estadio, lo que indica una correlación positiva estadísticamente significativa en la expresión de NUAK1 y *G6PD* en la transición entre ambos estadios (fig. S6F, S6G).

Con este antecedente, para el desarrollo de este trabajo, se consideraron las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116*P53*<sup>-/-</sup> y DLD-1. Ambas líneas celulares son

conocidas por ser altamente agresivas (Yeung et al., 2010), lo que se vería potenciado debido a la pérdida o mutación de p53. Dada su procedencia epitelial y sus características carcinogénicas, se espera que en ambas se replique la correlación entre NUA1 y *G6PD* observada en muestras de adenocarcinoma, resultando un modelo acorde a las características que se requieren estudiar en el contexto de esta tesis.

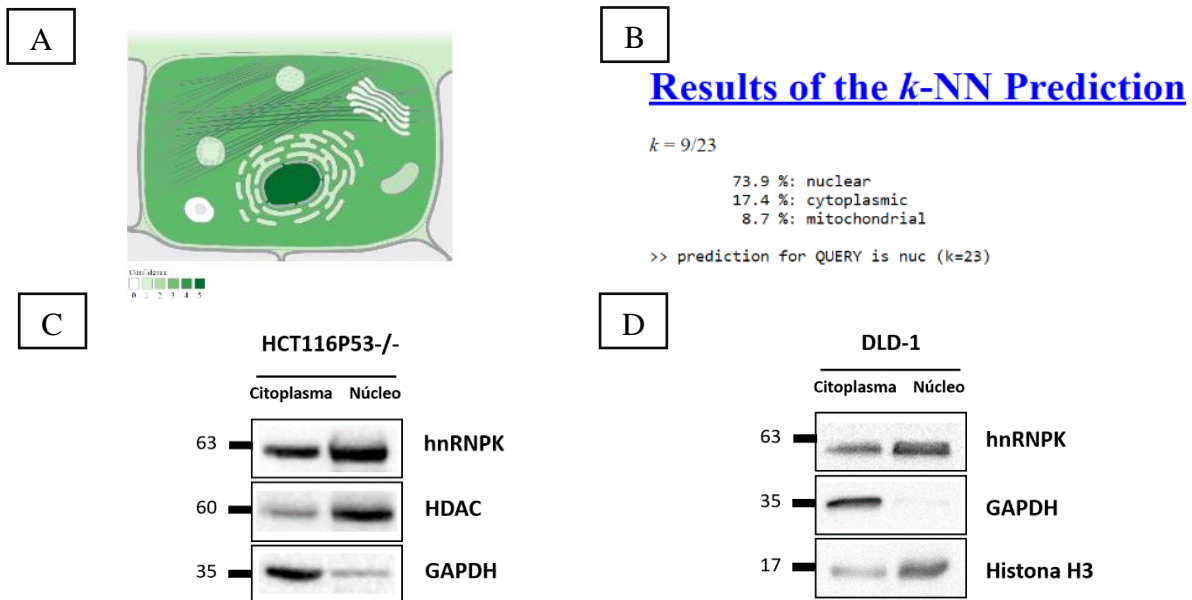
#### 4.2.2 Validación de la relación hnRNP-K-*G6PD* en líneas celulares

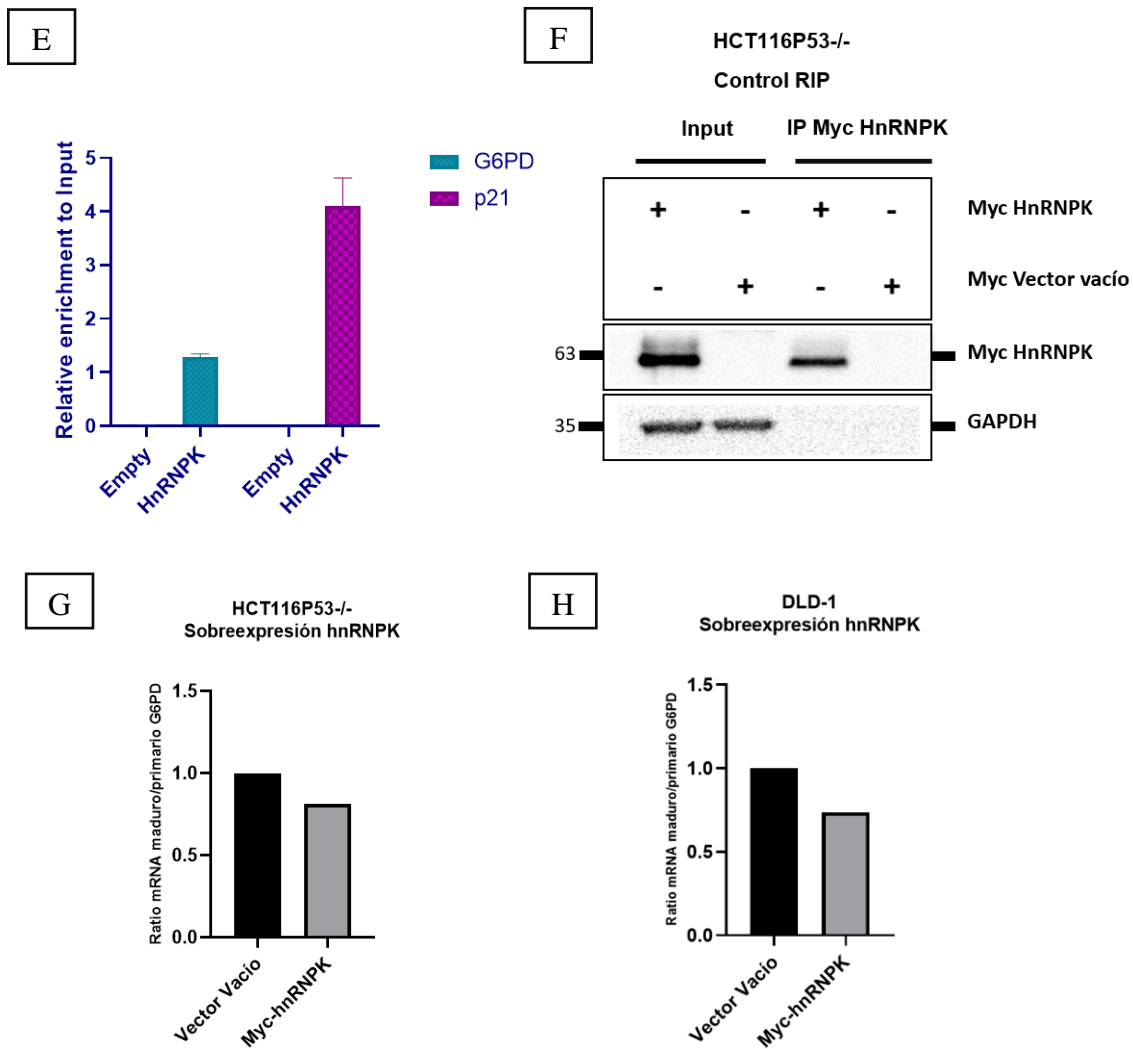
La localización subcelular de NUA1 en HCT116*P53*<sup>-/-</sup> y DLD-1 ha sido descrita previamente (Palma & Castro, 2019). Sin embargo, la de hnRNP-K no ha sido estudiada. Por ello, inicialmente se evaluó la localización subcelular de hnRNP-K en las bases de datos “Compartments Subcellular Localization” y “Multiloc2”. Se encontró que la proteína presenta una localización principalmente nuclear, con un 73,9% de probabilidad (fig. 15 A, B). Para validar estos datos en HCT116*P53*<sup>-/-</sup> y DLD-1, se realizó fraccionamiento subcelular (núcleo y citoplasma), encontrándose que tanto en HCT116*P53*<sup>-/-</sup> como en DLD-1, hnRNP-K presenta una localización predominantemente nuclear (fig. 15 C, D). En el caso de NUA1, esta se encuentra mayoritariamente a nivel nuclear en HCT116*P53*<sup>-/-</sup>; pero en DLD-1 se distribuye de manera homogénea entre núcleo/citoplasma (fig. S7). Esto último plantea que el efecto de NUA1 sobre la actividad de hnRNP-K podría variar dependiendo del tipo celular, y su localización subcelular.

El rol de hnRNP-K sobre la regulación del *splicing* de *G6PD* fue descrito en modelos murinos y en células de hepatocarcinoma HEPG2 (Cyphert et al., 2013). Sin embargo, no ha sido descrito en modelos celulares de cáncer colorrectal. Por ello, fue necesaria la validación de esta relación en las células HCT116*P53*<sup>-/-</sup> y DLD-1, previo a la evaluación de la acción de NUA1 sobre el eje hnRNP-K-*G6PD*. Para ello, se utilizaron dos estrategias: inmunoprecipitación de ARN (RIP) y detección del procesamiento del ARNm de *G6PD*. La RIP fue realizada en células HCT116*P53*<sup>-/-</sup>, donde se transfectó pCDNA3.1-hnRNP-K-c-myc-his, utilizando la transfección del vector vacío como un control. Posteriormente, se sintetizaron partidores localizados desde el intrón 11 al exón 12 de *G6PD*, para detectar por RT-qPCR si existen copias de ARNm inmaduro de *G6PD* unido a hnRNP-K precipitado. El resultado mostró un elevado número de copias de *G6PD* inmaduro en el pool de ARN que se encuentra en interacción con hnRNP-K precipitado, respecto del control vacío de

transfección (fig. 15E). Esto, validado por la detección de un interactador conocido de hnRNPk (p21), que permite dar fidelidad a la inmunoprecipitación de ARNm unidos a hnRNPk (Yano et al., 2005), y el control del experimento (fig.15F), nos permite concluir que **G6PD es un blanco de hnRNPk en esta línea celular.**

Para la detección del procesamiento de ARNm de *G6PD* frente a hnRNPk, se transfectó el mismo vector de hnRNPk (y su control vacío) en células HCT116P53-/- y DLD-1. Posteriormente, se extrajo el ARN y se realizaron ensayos de RT-qPCR, donde se utilizaron dos pares de partidores, aquellos que detectan ARNm maduro (desde exón 11 a exón 12 de *G6PD*) y aquellos que detectan la fracción inmadura que contiene intrones (desde intrón 11 a exón 12). Con ambos, se obtuvo el número de copias normalizados con  $\beta$ -actina y se calculó la relación ARNm maduro/ARNm inmaduro, donde un valor mayor a 1 indica un mayor procesamiento de *G6PD* y viceversa. Se encontró que tanto para HCT116P53-/- como para DLD-1, el aumento de hnRNPk, afecta el procesamiento de *G6PD*, causando su disminución relativa hasta 0,8 y 0,7. Debido a que el exceso de ribonucleoproteína disminuye la cantidad de ARNm procesado, se puede deducir que **la relación hnRNPk-G6PD es conservada en estas líneas celulares de cáncer colorrectal.** Estos resultados aportan fiabilidad al uso de ambas líneas celulares en el desarrollo de esta tesis, al mostrar que **existe la relación entre *G6PD* y hnRNPk descrita en otros estudios, y que, por lo tanto, se puede evaluar el efecto de NUAk1 en esa relación.**



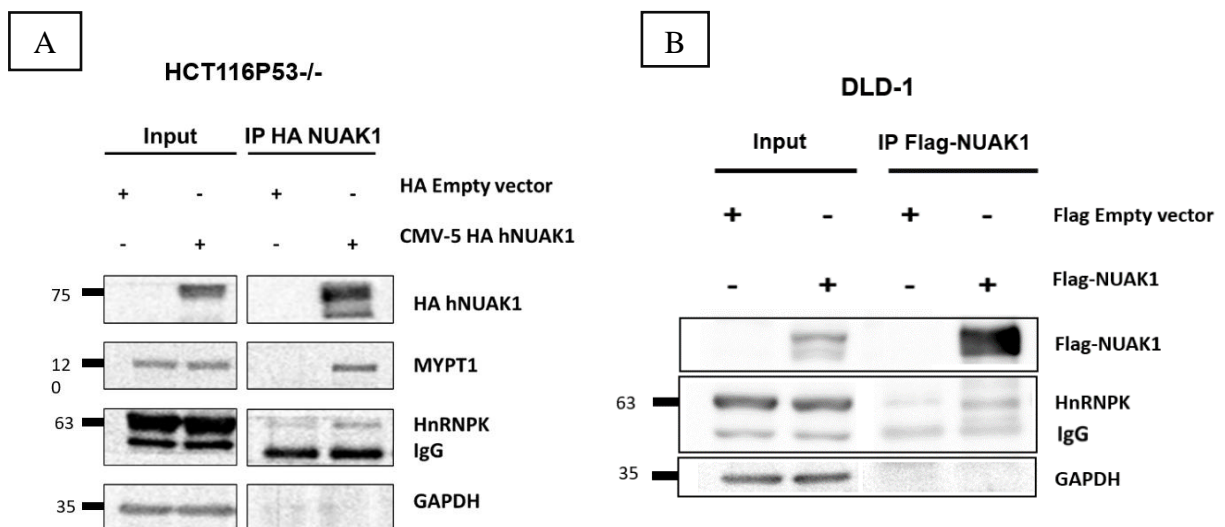


**Figura 15: hnRNP-K interacciona y regula el procesamiento de *G6PD* en células HCT116P53<sup>-/-</sup> y DLD-1.** (A) Resultado de *COMPARTMENTS Subcellular Localization Database* (<https://compartments.jensenlab.org>) para hnRNP-K. (B) Resultado de *Multiloc2* (<http://abi.inf.unituebingen.de/Services/MultiLoc2>) para hnRNP-K. (C) *Western blots* del fraccionamiento subcelular núcleo/citoplasma en línea HCT116P53<sup>-/-</sup> y (D) en línea DLD-1. HDAC e histona H3 fueron utilizados como control carga nuclear; mientras que GAPDH como control de carga citoplasmático. (E) Ensayo de RIP, las células HCT116P53<sup>-/-</sup> fueron transfectadas con el vector pCDNA3.1-hnRNP-K-c-myc-his. El gráfico muestra el enriquecimiento de copias de mRNA inmaduro de *G6PD* en razón del *input*, para el vector vacío (control) y el vector de hnRNP-K. Dado que el ARNm de p21 es un interactor conocido de hnRNP-K, fue utilizado como control de la inmunoprecipitación de ARN de hnRNP-K, n=2. (F) *Western blot* control de la RIP. En él se observa la transfección e

inmunoprecipitación de hnRNPK sólo en el caso de la transfección y no en el vector vacío. (G) y (H) Procesamiento de *G6PD* medido por la relación ARNm maduro/inmaduro de *G6PD* ante la sobreexpresión de hnRNPK en células DLD-1 y HCT116P53<sup>-/-</sup>.

#### 4.2.3 Interacción NUA1-hnRNPK en líneas celulares

Si bien NUA1 y hnRNPK comparten localización subcelular tanto en HCT116P53<sup>-/-</sup> como en DLD-1, esto no implica que ocurra una interacción entre ambas. Para dilucidar esto, se procedió con ensayos de coimmunoprecipitación (CoIP,) donde se transfectó e inmunoprecipitó la quinasa NUA1 fusionada a HA o Flag y se realizó la detección de hnRNPK endógena con anticuerpo específico. La visualización en gel de acrilamida mostró que **hnRNPK forma parte del pool de proteínas asociadas con la quinasa.**



**Figura 16: NUA1 interacciona con hnRNPK en células (A) HCT116P53<sup>-/-</sup> y (B) DLD-1 y Western blots de Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 o HA-hUAK1 expresadas en células HCT116P53<sup>-/-</sup> y DLD-1, respectivamente; y coimmunoprecipitación (CoIP) de hnRNPK endógena. Dado que MYPT1 es un interactor conocido de NUA1, fue utilizado como un control positivo del ensayo de coimmunoprecipitación de hNUAK1 en A. (n=2).**

### 4.2.3 Niveles de proteína de G6PD ante Peróxido e Insulina

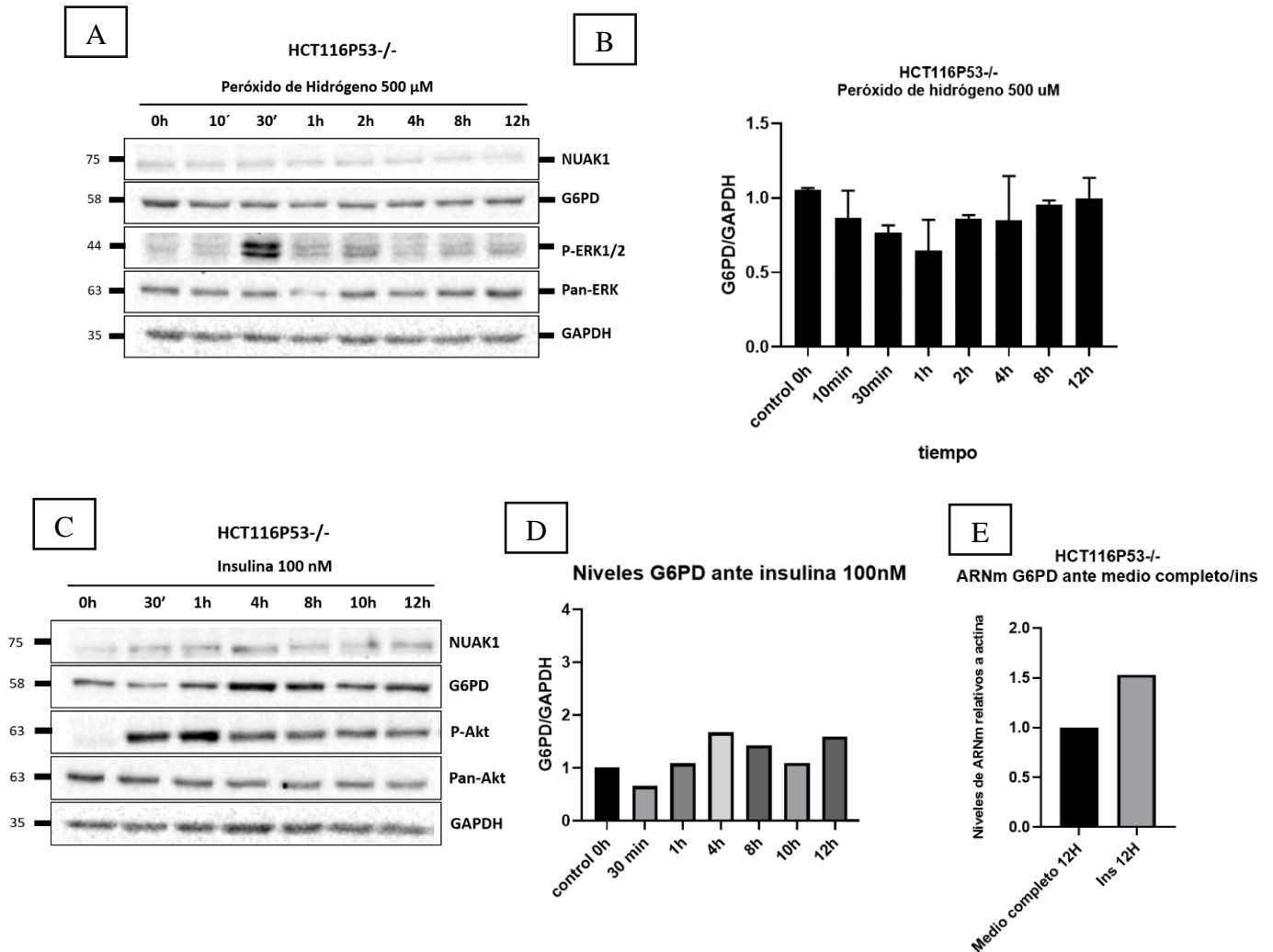
Para poder evaluar de manera más evidente si existen cambios en el procesamiento de G6PD mediado por hnRNPk frente a la modulación de la actividad de NUAk1, se procedió a establecer una condición donde los niveles de G6PD se vean regulados.

G6PD es la primera enzima de la vía de las pentosas, la cual es activada frente al requerimiento de elementos reductores frente a estrés oxidativo o bien, para la síntesis nucleotídica frente a estímulos de proliferación celular (Stincone et al., 2015). Por lo tanto, se procedió a utilizar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e insulina. Para la elección de concentración y tiempo de tratamiento, se hizo una revisión de la literatura, encontrándose que la mayoría de los trabajos utilizaron entre 100 y 500  $\mu M$  de  $H_2O_2$  para lograr estrés oxidativo (Ransy et al., 2020). Esto, sumado al trabajo de Port y colaboradores donde indujeron estrés oxidativo en células HCT116P53<sup>-/-</sup> y asociaron a NUAk1 con la respuesta de protección frente al aumento de ROS al promover la translocación nuclear de NRF2 (Port et al., 2018), permitieron establecer una concentración de trabajo de 500  $\mu M$  para evaluar su efecto en los niveles de proteína de G6PD entre 0 y 12 horas. El resultado muestra que la introducción de  $H_2O_2$  al medio no influye significativamente en un aumento de los niveles de G6PD (fig. 17A, B) a ninguno de los tiempos determinados, respecto del control (vehículo de peróxido). Cabe destacar que se utilizó el aumento de p-ERK1/2 como control del aumento de ROS en el medio celular (Lee et al., 2009). Dado **que el uso de  $H_2O_2$  no induce un aumento en G6PD, fue descartado para el desarrollo de este trabajo.**

Por su parte, el tratamiento con insulina fue igualmente revisado en la literatura, encontrando que una concentración de 100 nM es suficiente para inducir proliferación en células de cáncer colorrectal (C. C. Lu et al., 2017). Por consiguiente, se utilizó insulina 100 nM posterior a 18 horas de privación de suero y se evaluaron los niveles de G6PD en una curva de tiempo de 0 a 12 horas. Se utilizó p-Akt como control positivo de la inducción de la vía PI3K-Akt inducida por insulina. Para este caso, se encontró un aumento de G6PD respecto del control (vehículo), encontrándose un máximo a las 12 horas (fig. 17C, D). Esto es coincidente con lo reportado anteriormente en nuestro laboratorio (Azócar & Castro, 2022). Para corroborar la utilidad del tratamiento a 12 horas en el aumento de G6PD a nivel

de ARNm, se detectaron los niveles de ARNm maduro frente a medio completo e insulina, encontrándose que el factor de crecimiento induce un aumento del 50% (fig. 17E).

Con los resultados anteriores, se investigó el **efecto de NUA1 en el procesamiento de G6PD, bajo la inducción de factor de crecimiento en el medio celular a las 12 horas**, lo que será revisado a continuación.



**Figura 17: Efecto del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y factor de crecimiento en los niveles proteicos de G6PD.** (A) *Western blot* representativo de la respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se utilizaron 500 μM a tiempos de control, 10, 30 minutos; 1, 2, 4, 8 y 12 horas (n=3). (B) Cuantificación de curva de respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) *Western blot* representativo de la respuesta a insulina (n=2). Se utilizaron 100 nM de insulina a tiempos control, 30 minutos, 1, 4, 8 y 12 horas. (D) Cuantificación de curva de



respuesta a insulina. (E) Niveles de ARNm maduro de *G6PD* detectados por RT-qPCR frente a medio completo e insulina 12 horas. Relativo a  $\beta$ -actina.

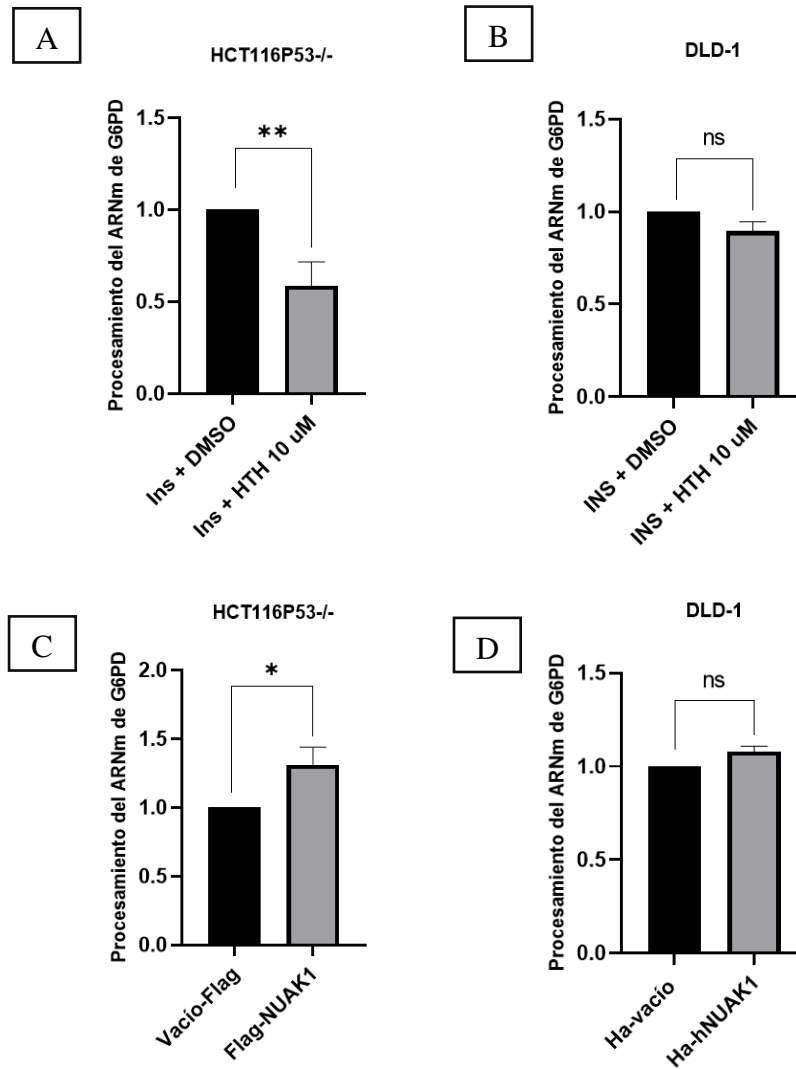
#### **4.2.4 Relación ARNm/ARNm primario de *G6PD* ante Inhibición/sobreexpresión de NUA1 frente a factor de crecimiento**

NUAK1 interactúa con múltiples blancos a nivel nuclear, donde se ha visto que puede alterar sus roles. Hemos visto que NUA1 puede interactuar con hnRNPK en líneas celulares de cáncer colorrectal, pero no hemos evaluado si esta interacción produce algún efecto en el procesamiento de *G6PD* río abajo. Para abordar esto, se moduló la actividad de NUA1 por dos estrategias: la inhibición con la droga específica HTH-01-015, y la sobreexpresión utilizando un vector Flag-hNUAK1. Ambos tratamientos fueron evaluados frente a la estimulación con factor de crecimiento (insulina 100nM) a las 12 horas.

Para la inhibición de NUA1, las células fueron dejadas en privación de suero por 18 horas, luego estimuladas con insulina y tratadas con HTH-01-015 (10  $\mu$ M) o su vehículo DMSO por 12 horas. Del lisado celular, fue extraído el ARNm y sintetizado el cDNA para la detección por qPCR de copias de ARNm maduro e inmaduro de *G6PD* con el set de partidores antes descritos. Como resultado, se observó que la inhibición específica de NUA1 disminuye significativamente el procesamiento de *G6PD* ( $p=0.0053$ ) en células HCT116*P53*<sup>-/-</sup> (fig.18A). Por otro lado, en células DLD-1 la inhibición de NUA1 no afecta de manera significativa el procesamiento del ARNm de *G6PD* (fig.18B).

Respecto de la sobreexpresión de NUA1, se realizó la transfección de Flag-hNUAK1 o HA-hNUAK1 en células HCT116*p53*<sup>-/-</sup> y DLD-1, evaluando su efecto a las 48 horas, bajo tratamiento con insulina (12 horas). Al igual que en el caso anterior, las células HCT116*P53*<sup>-/-</sup> mostraron un aumento significativo del procesamiento de *G6PD* dependiente de NUA1 ( $p=0.02$ ) (fig. 18C); mientras que en las DLD-1, no se observa un aumento importante del procesamiento de la enzima (fig. 18D).

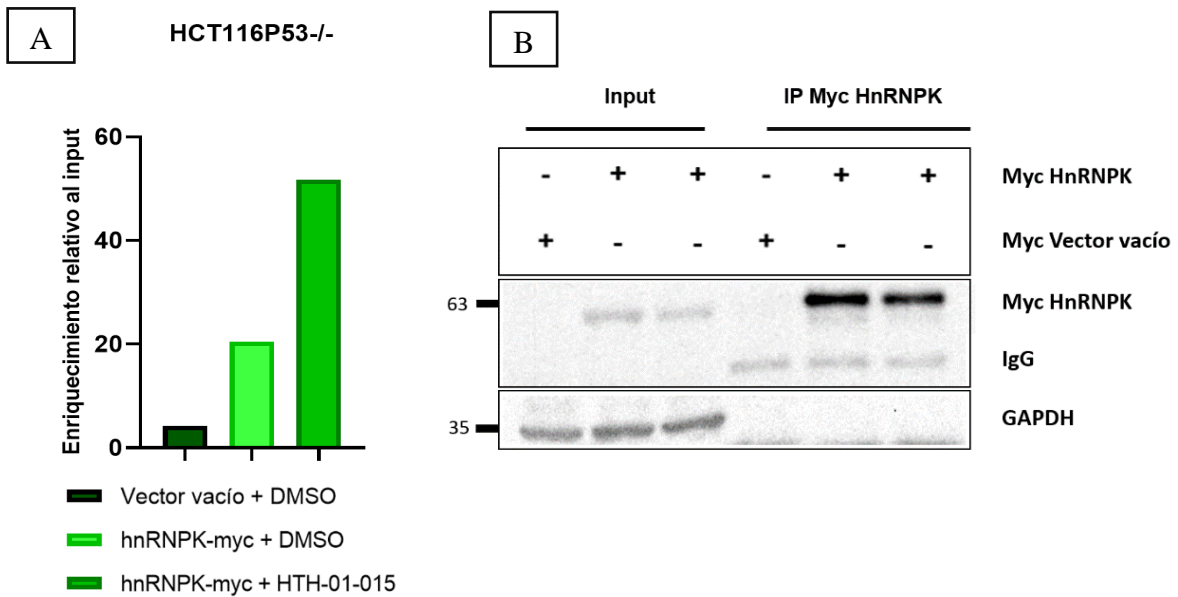
Esto propone que el **rol de NUA1 en el procesamiento de *G6PD* a través de hnRNPK podría depender de la línea celular, en particular, de la localización subcelular** donde la proteína se encuentre mayormente ubicada.



**Figura 18: Efecto de la actividad de NUA1 sobre el procesamiento de *G6PD* ante insulina 12 horas.** Efecto de la inhibición de NUA1 mediada por HTH-01-015 en la relación ARNm/ARN inmaduro de *G6PD* en (A) HCT116P53<sup>-/-</sup> y (B) DLD-1. El análisis estadístico de t de student mostró un valor de  $p=0.0053$  (\*\*) para (A) y no significativo (ns) para (B),  $n=3$ . Efecto de la sobreexpresión de Flag-hNUAK1 o HA-hNUAK1 en (C) HCT116p53<sup>-/-</sup> y (D) DLD-1. El análisis t de student muestra un valor de  $p=0.02$  (\*) para (C) y no significativo (ns) para (D),  $n=3$ .

#### 4.2.5 RIP con inhibición de NUAK1

Para evaluar si el efecto de NUAK1 en la regulación del procesamiento del ARNm de *G6PD* observado en células HCT116P53<sup>-/-</sup> ocurre mediante un efecto sobre hnRNPk, se procedió con un ensayo de inmunoprecipitación de ARN. Para ello, se transfectó hnRNPk-myc-his o su vector vacío y se realizó el tratamiento de las células con HTH-01-015 o su vehículo DMSO por 12 horas. Como resultado se obtuvo que la inhibición de NUAK1 aumenta significativamente el número de copias de ARNm inmaduro de *G6PD* precipitadas en conjunto con hnRNPk (fig. 19A). Esto indica que, en efecto, **NUAK1 influye negativamente en la capacidad de hnRNPk de unir a su ARNm blanco *G6PD*, lo que se relacionaría con su influencia en el procesamiento de *G6PD* (fig.18).**



**Figura 19: NUAK1 inhibe la interacción de hnRNPk con el ARNm inmaduro de *G6PD*.** (A) Inmunoprecipitación de ARN. Se transfectó hnRNPk-myc, luego se trataron las células con DMSO o HTH-01-015 por 12 horas. Se realizó la inmunoprecipitación de hnRNPk y se obtuvieron los *input* e IP de proteína y ARN. Con partidores para *G6PD* inmaduro, por RT-qPCR se detectó el número de copias de ARN, las cuales se normalizaron con respecto al *input*, para cada caso. (B) *Western blot* del control de la transfección con vector vacío/hnRNPk-myc y de la inmunoprecipitación de hnRNPk. (n=2).

#### 4.2.6 Diseño de un reportero de *splicing* de luciferasa dual para detectar el efecto de la modulación de NUA1 en el *splicing* del ARNm de *G6PD*

Otra aproximación experimental para evaluar el efecto de NUA1 en el *splicing* de *G6PD* consistió en el diseño de un reportero de *splicing* de doble luciferasa. Esta estrategia consiste en utilizar la medición de la actividad de dos distintas luciferasas, que están unidas por un transcrito de exón-intrón-exón, que permite evaluar el *splicing* de un ARNm de interés en función de la actividad de cada luciferasa. Para esto, se utilizó el vector pSGDlucV3.0, el cual contiene en orden: un promotor, luciferasa de Renilla, dos péptidos autocatalíticos F2A, luciferasa de *Firefly* (luciérnaga) y secuencia poli-A (fig. 20A). Para poder subclonar en la zona entre ambas luciferasas, se utilizaron las enzimas de restricción XhoI y ApaI, que dejaron un plásmido linealizado de 5580 pb con extremos cohesivos, donde se subclonó el fragmento de interés desde el vector pCDNA3.1*G6PD*.E.I.E, que contiene un fragmento de 286 pb, que consta de: extremo final del exón 11 de *G6PD*, el intrón 11 (con un codón STOP en el centro); y el exón 12 de *G6PD* (con la zona de regulación de hnRNPK). Resultando el plásmido que denominamos “**Reportero *G6PD* doble luciferasa**” (fig. 20C).

El objetivo del vector reportero, es que al transfectarlo permita diferenciar el grado de *splicing* del fragmento de *G6PD* en el inserto, esperando que, de acuerdo a la hipótesis, si la quinasa NUA1 se encuentra inhibida, hnRNPK pueda unirse a la zona regulatoria del inserto, induciendo la retención del intrón 11, lo que conlleva la retención del codón stop, expresándose únicamente la luciferasa de renilla, que será medida por kit de doble actividad de luciferasa. Por otro lado, la sobreexpresión de NUA1 conllevaría un impedimento de hnRNPK para unirse al sitio de regulación, disminuyendo la retención del intrón 11 y facilitando el *splicing* del inserto, removiendo el codón stop y por ello, obteniéndose la actividad de ambas luciferasas (fig. 20D).

Una vez obtenido el vector reportero, se realizó un mapa de restricción para evaluar que las zonas de corte por enzimas de restricción se encuentran correctamente ubicados dentro del plásmido. Para ello se utilizaron cortes con StuI, XhoI, ApaI y HindIII, con los cuales se verificó que el subclonamiento fue correcto (al comparar con digestión virtual), obteniéndose 1 corte con XhoI y HindIII; y dos cortes con StuI y la combinación de XhoI más ApaI (fig. 20E). Dichos cortes diferían tanto del vector vacío como del vector pCDNA3.1*G6PD*.E.I.E.

Posteriormente, se utilizaron células HCT116P53<sup>-/-</sup> para transfectar el plásmido y realizar el ensayo de actividad de doble luciferasa, con el inhibidor HTH-01-015 o su vehículo DMSO. Adicionalmente, se transfectó el vector vacío (pSGDlucV3.0) para verificar el nivel de expresión basal de las luciferasas dentro del vector original. El resultado de las lecturas de luminiscencia mostró que la actividad de Renilla estaba elevada en la inhibición de NUAK1, respecto del control. No obstante, la actividad medida para Firefly, que se encuentra en segundo lugar en el vector, no fue detectada en un orden de magnitud adecuado para el ensayo, obteniéndose valores comparables con ruido o “background”, indicando una falla en la detección de dicha luciferasa. Al verificar la expresión de Firefly en el vector “backbone” o vacío, se encontró que en comparación con Renilla, su actividad se encuentra considerablemente reducida (desde 2 millones a sólo 6 mil detectados para Firefly) (fig. 20F). Esto implicaría que la luciferasa internada en el vector base, representaría un problema en su expresión o en su actividad.

Para verificar que no se tratara de un problema asociado a la eficiencia de transfección en el modelo HCT116P53<sup>-/-</sup>, se decidió probar el ensayo en la línea celular HEK293T, un modelo que conocemos, presenta una elevada eficiencia de transfección. Para este caso, además se realizó la medición a un tiempo mayor de transfección (de 24 horas en el experimento inicial a 36 horas). Como resultado, al igual que en el caso anterior, la luciferasa de Renilla mostró una actividad elevada, tanto para el vector reportero de *G6PD*, como para el vector base, donde debido al aumento del tiempo de transfección, la actividad superó el límite de cuantificación. Sin embargo, Firefly mostró una señal mucho menor en ambos casos, con valores de alrededor de 200 para el reportero de *G6PD*; y valores de 80 mil en el vacío (fig. 20G). Esto indica que los valores bajos en actividad de luminiscencia en el reportero *G6PD* de doble luciferasa estarían ligados a una disfunción en la segunda luciferasa proveniente del vector vacío, ya que, para ese caso, también presenta una actividad reducida, la cual podría verse afectada en mayor grado debido a la introducción de una porción de transcrito entre ambas luciferasas. De manera que, el vector no pudo ser utilizado en el contexto de este trabajo. No obstante, las posibles causas y las correcciones futuras, serán parte de la sección de discusión.



doble luciferasa, entre RLuc y FLuc, se introdujo un fragmento de exón 11-intrón11(codón stop)-exón 12 de *G6PD*. (D) Modelo de uso del reportero, se observa su secuencia lineal con el cassette de interés y el resultado esperado para la inhibición y sobre-expresión de NUA1. (E) Mapa de restricción del vector reportero *G6PD*. (F) Intensidad de luminiscencia de RLuc y FLuc, cuantificado con kit de doble luciferasa en 12 horas de tratamiento con HTH-01-015 o su vehículo en reportero de *G6PD*; o sin tratamiento para el vector vacío (pSGDlucV3.0) en células HCT116P53<sup>-/-</sup>. (G) Intensidad de luminiscencia de RLuc y FLuc para reportero de *G6PD* o reportero vacío en células HEK293T.

## 5. Discusión

NUAK1 es una serina/treonina quinasa miembro de la familia de las quinasas relacionadas con AMPK, con quienes comparte homología en la subunidad  $\alpha$ -catalítica (Jaleel et al., 2006). En los últimos años, NUAK1 se ha definido como un actor relevante en el desarrollo tumoral, la resistencia a quimioterapéuticos y la respuesta a estrés oxidativo en múltiples tipos de cáncer. Adicionalmente, el aumento de su expresión se ha relacionado con un peor pronóstico y menor supervivencia en pacientes. No obstante, los mecanismos moleculares por los cuales NUAK1 ejerce este efecto carcinogénico no están del todo dilucidados, proponiendo un campo para el estudio de las vías y blancos involucrados con este rol.

En nuestro laboratorio, mediante un ensayo de *MudPIT* se identificaron una serie de nuevos interactores nucleares y citosólicos de NUAK1. A nivel nuclear, se identificó a la ribonucleoproteína nuclear heterogénea K (hnRNPK) como uno de sus potenciales blancos (Palma & Castro, 2019). HnRNPK presenta múltiples roles a nivel nuclear, donde destacan: regulación de la transcripción; estabilidad de ARN y el procesamiento del ARNm inmaduro en el proceso de *splicing*. Específicamente, estudios anteriores dilucidaron que es un regulador negativo del ARNm de *G6PD*, que al unirse a la zona regulatoria del *splicing* en el exón 12, promueve la retención de intrones y disminuye los niveles del transcrito maduro de *G6PD* (Cyphert et al., 2013). *G6PD* es la enzima que determina el flujo hacia la vía de las pentosas, encargada de la biosíntesis de nucleótidos y elementos reductores (NADPH), esenciales para la proliferación y regulación de la homeostasis redox (Stincone et al., 2015). Interesantemente, NUAK1 favorece la respuesta a estrés oxidativo en células de cáncer colorrectal (Port et al., 2018). Adicionalmente, su depleción se relaciona con menores niveles de enzimas de la vía de las pentosas como 6PGL (Liu et al., 2012) y con menores niveles de NADPH (Palma & Castro, 2019). Esto propone que NUAK1 podría regular los niveles de *G6PD* a través de hnRNPK. A partir de esto, planteamos la hipótesis que propone a NUAK1 como un potencial regulador del *splicing* de *G6PD* a través de la fosforilación de hnRNPK.

Para la búsqueda de sitios de fosforilación para NUAK1 en la estructura de hnRNPK, las predicciones se realizaron en base a dos criterios: la **predicción con GPS 5.0**, un software que presenta el mejor algoritmo de predicción de motivos de fosforilación (el cual se renueva



constantemente para enriquecer su capacidad predictiva) (C. Wang et al., 2020); y el **motivo de fosforilación para NUAK1** obtenido experimentalmente por el laboratorio del doctor Murphy (RNxSF/Q/Y) (datos no publicados). Se encontró que las serinas 89 y 417 son potenciales blancos de NUAK1 en la estructura de hnRNPK. Este hallazgo es consistente con estudios que muestran que NUAK1 presenta mayor afinidad por residuos de serina (por sobre treonina) en sus blancos y que posee la capacidad de fosforilar en múltiples residuos a un mismo blanco, encontrándose a: Ser15 y Ser392 de P53 (Hou et al., 2011); Ser257 de la caspasa 6 (Suzuki et al., 2004); los residuos Ser445, Ser472 y Ser910 de MYPT1 (Zagórska et al., 2010); y LATS1 en su residuo S464 (Furth & Aylon, 2017), entre otros. Esto sugiere que NUAK1 fosforila ambos residuos (Ser89 y 417) de hnRNPK. Basándonos en ello, dentro del primer objetivo, realizamos una serie de modelamientos moleculares de ARN y proteína para analizar *in silico* el efecto de las fosforilaciones en la unión de hnRNPK con el ARNm inmaduro de *G6PD*.

Debido a la falta de datos experimentales, realizamos un modelamiento de ARNm basado únicamente en la cadena nucleotídica, utilizando el programa *RNAfold* (Escamilla-Gutiérrez et al., 2021), el cual, por su enfoque termodinámico y su capacidad de predecir con alta fidelidad ARN entre 20 y 200 nucleótidos, nos permitió obtener un modelo de alta calidad. Adicionalmente, obtuvimos una alta coincidencia entre los modelos de tipo MFE y de tipo centroide, favoreciendo la fiabilidad del modelo, ya que este último método suele presentar hasta 30% menos errores que el MFE (Ding et al., 2005). Por su parte, hnRNPK fue obtenida de la base de datos de la inteligencia artificial AlphaFold, cuyo algoritmo basado en *Deep learning* utiliza la data estructural experimental disponible de hnRNPK (dominio KH3), sumado al modelamiento por homología bajo el alineamiento de múltiples datos estructurales de secuencias proteicas disponibles, para obtener la estructura predictiva de toda la cadena aminoacídica con alta confiabilidad en los 3 dominios de homología KH.

Respecto del *docking* molecular realizado en el software HADDOCK, su algoritmo ordena los modelos en base a su fiabilidad, permitiendo obtener resultados confiables con las primeras 10 predicciones y en particular con el modelo de menor energía libre (número 1) (Yan et al., 2017). Por ello, visualizamos las primeras 10 predicciones de cada modelo y analizamos en particular el primer modelo de hnRNPK WT y fosforilada. Considerando que la fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales más ampliamente

involucrada en la regulación de la actividad de proteínas y en la transducción de señales (Ardito et al., 2017), se esperaba que esta modificación *in silico*, afectara la capacidad de hnRNPK de interactuar con su blanco. Este tipo de modificaciones han sido ampliamente estudiadas, tanto en simulaciones basadas en cristalografía de rayos X, como aproximaciones de dinámica molecular y experimental, demostrando que la adición de residuos de fosfoserina impacta la conformación de loops y  $\alpha$ -hélices dentro de una proteína, afectando su funcionalidad (Groban et al., 2006; Jonniya et al., 2019; Stultz et al., 2002). Consistente con esto, obtuvimos que las fosforilaciones en Ser89 y Ser417 inducen un cambio conformacional en hnRNPK, cambiando radicalmente la posición de interacción de los dominios KH con la zona de regulación del splicing del transcrito primario de *G6PD*, respecto del modelo WT. Este resultado es consistente con la mecánica de unión a blancos de ARNm que se ha descrito para hnRNPK, donde sus dominios KH interactúan formando una suerte de “tenaza” cercano a sitios ricos en citosina (motivos C). Adicionalmente, se ha descrito que los 3 dominios KH de hnRNPK actúan de manera sinérgica en la unión a ARN, siendo la integridad de cada uno, importante en la interacción (Matunis et al., 1992; Paziewska et al., 2004). Esto último, sugiere que la fosforilación en cualquiera de estos dominios, en particular aquellas mediadas por NUA1, afectarían la acción sinérgica de los 3 dominios, afectando la capacidad de unión a ARN blanco, que es lo que se observó en el *docking* de hnRNPK fosforilada y el ARNm de *G6PD*. Los resultados *in silico* nos permiten concluir que **NUAK1 podría fosforilar a hnRNPK, promoviendo cambios conformacionales que disminuyen su interacción con el ARNm inmaduro de *G6PD*.**

Como parte del objetivo específico número dos, se buscó determinar el efecto de NUA1 sobre el *splicing* de *G6PD* mediado por hnRNPK. Para ello definimos la localización subcelular e interacción de NUA1 y hnRNPK en nuestros modelos celulares de cáncer colorrectal. Encontramos que mientras hnRNPK conserva una localización preferentemente nuclear (que es donde desempeña funciones relacionadas con ARN y splicing (Z. Wang et al., 2020)), la localización subcelular de NUA1 es dependiente del tipo celular. Esto es importante, debido a que se han descrito roles de NUA1 asociados a procesos citoplasmáticos y nucleares. Por ejemplo, a nivel citosólico se ha encontrado su potencial rol en la regulación de la producción de ATP al mantener el flujo glucolítico y en la homeostasis mitocondrial (Escalona et al., 2020). Mientras que en el núcleo se ha descrito que NUA1 forma un trímero con PP1 y su subunidad catalítica PNUTS, interactuando

con la maquinaria del spliceosoma, favoreciendo su actividad y la síntesis de RNA nacientes (Cossa et al., 2020). Adicionalmente, se ha descrito que fosforila a hnRNP A1 (Bhattarai et al., 2022), un componente del spliceosoma (Buvoli et al., 1992), que forma parte de la familia de hnRNPs (al igual que hnRNPK) (Geuens et al., 2016). De esta manera, la localización subcelular de NUA1 implicaría un rol diferencial en la regulación de hnRNPK, esperando que cuando se detecte a nivel nuclear (como es el caso de HCT116*P53*<sup>-/-</sup>), la interacción ocurra en el núcleo y por ello se observe un efecto en el splicing de *G6PD*. Mientras que cuando se distribuya a nivel de ambos compartimentos, su efecto sobre hnRNPK no sea significativo (células DLD-1).

Para observar el efecto de esta localización diferencial de NUA1 frente a hnRNPK, definimos un contexto de estudio. De acuerdo con la literatura, el estrés oxidativo en el medio induce un redireccionamiento del flujo glucolítico hacia la vía de las pentosas fosfato (Krüger et al., 2011). Considerando que un incremento de *G6PD* es fundamental para que lo anterior ocurra, debido a que es la enzima limitante de la vía, nos propusimos el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir este cambio en *G6PD*. Encontramos que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no permitió establecer cambios en los niveles proteicos de *G6PD* a los tiempos determinados. Otros trabajos han encontrado que en fibroblastos, la inducción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera aumentos en los metabolitos de PPP, pero que estos ocurren a intervalos muy cortos de tiempo (con máximos a los 5 minutos de inducción) (Kuehne et al., 2015). Por lo tanto, es probable que no se haya detectado un incremento debido a que, la respuesta celular para metabolizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es corta y podría utilizar otros elementos reductores intracelulares sin requerir el aumento de *G6PD*. Aunque también podría explicarse debido al contexto celular diferente, se sabe que las células tumorales presentan niveles de ROS basales elevados, implicando que *G6PD* podría estar elevada constitutivamente. De todas maneras, habría sido interesante utilizar otro compuesto inductor de estrés oxidativo como menadiona o bromato de potasio, que generan una respuesta celular más integrada y prolongada que el peróxido de hidrógeno (Goffart et al., 2021). Estos podrían ser útiles en el estudio del procesamiento del ARNm, lo que no puede ser estudiado a tiempos tan cortos.

Por otro lado, el uso de insulina (un factor de crecimiento que estimula la proliferación celular a través de la víaPI3K/Akt), posterior a 18 horas de privación de suero, promovió el aumento de los niveles de *G6PD* a las 12 horas de inducción, permitiéndonos establecer un

contexto de estudio. Adicionalmente, la insulina, podría favorecer el estudio de hnRNPK, ya que se ha visto que su acción regulatoria del *splicing* de *G6PD* es dependiente del ambiente nutricional y más evidente frente a estímulo de re-alimentación (Cyphert et al., 2013).

Al determinar por RT-qPCR los niveles de transcrito maduro e inmaduro de *G6PD*, pudimos determinar que en la línea celular HCT116*P53*<sup>-/-</sup>, **NUAK1 regula el *splicing* de *G6PD***, favoreciendo su procesamiento. Utilizando ensayos de inmunoprecipitación de ARN (los cuales requieren de una réplica biológica adicional para análisis estadísticos), **determinamos que esta regulación ocurre a través de hnRNPK**, observando que NUAK1 ejerce un efecto negativo en la capacidad de hnRNPK de interactuar con el ARNm inmaduro de *G6PD*. Esto es consistente con que NUAK1 se encuentre a nivel nuclear en este tipo celular y sugiere que la regulación sobre hnRNPK ocurra a ese nivel subcelular.

Respecto de la línea DLD-1, la modulación de la actividad de NUAK1 por inhibición específica o sobre-expresión transitoria no afectó significativamente el procesamiento de *G6PD*. Existen múltiples razonamientos que pueden explicar este resultado. En primer lugar, que se requiera que la ubicación de NUAK1 sea principalmente nuclear para ejercer un efecto evidente en la actividad de hnRNPK y, por lo tanto, en el *splicing* de *G6PD*. Esto indicaría que la nueva función de NUAK1 que encontramos sería dependiente del tipo celular donde se analice. Esto se sustenta en el hecho de que la heterogeneidad del cáncer conlleva que el fenotipo metabólico y genético difiera entre distintas células aún dentro de un mismo tumor (Park et al., 2020). Un factor adicional, podría deberse a la actividad de PTEN, se sabe que esta proteína regula a hnRNPK al inhibir a Tcl-1, por lo cual es necesario que se encuentre en su estado WT para ejercer este efecto (Hong et al., 2014). Aunque determinamos que esto sucede en HCT116*P53*<sup>-/-</sup>, no sabemos si en las células DLD-1 PTEN pudiera estar mutado, generando que Tcl-1 inhiba a hnRNPK, enmascarando la acción de NUAK1.

Otro razonamiento se dirige más hacia el ámbito técnico que al propiamente biológico, y es que para el caso de la modulación de NUAK1, utilizamos como control a la proteína Akt-S473, debido a antecedentes de nuestro laboratorio que encontraron a Akt como un blanco de NUAK1 (datos no publicados). Sin embargo, debido a que el tratamiento con insulina dificulta observar de manera evidente una acción de NUAK1 sobre Akt, lo más adecuado

para evaluar su actividad sería utilizar su blanco más caracterizado MYPT1 (Banerjee et al., 2014). Este anticuerpo no se encontraba comercialmente disponible durante el desarrollo de este trabajo, pero ha sido recientemente adquirido por nuestro laboratorio. El uso de este control permitiría verificar el resultado obtenido en DLD-1.

Una herramienta adicional para evaluar la relación NUA1-hnRNP-K-G6PD consistió en la construcción de un reportero de *splicing* de doble luciferasa, basados en el trabajo de Cyphert y colaboradores donde describieron la función de hnRNP-K sobre G6PD y diseñaron vectores que contenían  $\beta$ -galactosidasa como control de expresión, y un transcrito de exón-intrón-exón de G6PD, el cual medía el *splicing* en base a partidores dirigidos contra áreas específicas del vector de expresión (Cyphert et al., 2013). No obstante, barajamos el uso de una luciferasa que permitiera obtener data de *splicing* asociada a su actividad y ser medida de manera más sencilla, con un kit de luciferasa. Encontramos que existe la estrategia de ingresar un intrón en la estructura de la luciferasa, conservando el marco de lectura original, de manera que, de ocurrir la remoción del intrón, la luciferasa se expresaría (Shi et al., 2018). Sin embargo, dicha estrategia no consideraba el uso de los exones, que era lo requerido en nuestro caso, dado que hnRNP-K se une a la zona de regulación del *splicing* para promover la retención de intrones.

Entonces, considerando el uso de un kit de doble actividad de luciferasa disponible en nuestro laboratorio, nos enfocamos en el diseño de un vector donde dos luciferasas flanquearan el transcrito de exón-intrón-exón de G6PD, agregando un codón stop en el centro para que cuando ocurra retención intrónica, no exista transcripción ni expresión de la segunda luciferasa, y por lo tanto no emitiera señal de luminiscencia. Esta estrategia ya había sido utilizada anteriormente, pero realizando una medición basada en la relación de luminiscencia entre ambas luciferasas (Guo et al., 2021), y había demostrado ser útil en la medición de eficiencia de *splicing* en modelos *in vivo*. No obstante, una vez construido el vector que llamamos Reportero de G6PD de doble luciferasa, no logramos obtener una señal acorde a la metodología en la segunda luciferasa (*Firefly*). Destacamos que el vector reportero fue diseñado para estar dentro del marco de lectura, considerando o removiendo el intrón de la estructura, por lo que el *splicing* no afectaría la cadena aminoacídica de la segunda luciferasa.

Al verificar la actividad de la misma luciferasa en el vector basal, encontramos que se encuentra considerablemente reducida. Esto nos indica que la falla en la detección ocurre muy probablemente por un problema en la actividad de la luciferasa de *Firefly* que proviene desde el vector pSGDlucV3.0 que utilizamos como “*backbone*” para la construcción del vector reportero. Con la revisión de la secuenciación obtenida por Addgene, verificamos que el vector cuenta con todos los elementos necesarios para la expresión eficiente de un transcrito. No obstante, consideramos necesaria una secuenciación del vector reportero que construimos para verificar la integridad de la luciferasa *Firefly*. También evaluamos el uso de partidores dirigidos contra RLuc (forward) y FLuc (reverse), que nos permitan determinar por PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa la presencia de templado con y sin *splicing* por diferencia de tamaño. Adicionalmente, dependiendo de la secuenciación, evaluaremos el subclonamiento del minigen de *G6PD* en otro vector que contenga otro marcador detectable como  $\beta$ -galactosidasa. Todo esto será trabajo a realizar a futuro y con fines de publicación de los resultados.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo proponen un nuevo mecanismo por el que NUA1 ejerce su efecto en la promoción de la carcinogénesis. Según lo investigado NUA1 interacciona con hnRNPK de manera potencialmente directa, fosforilando los residuos de serina 89 y 417, induciendo cambios conformacionales que reordenan la disposición espacial de los dominios KH de la ribonucleoproteína, impidiendo su correcta interacción con la zona regulatoria del *splicing* del ARNm primario de *G6PD*. De esta manera NUA1 se encuentra favoreciendo la maduración del transcrito primario de *G6PD*, al impedir el efecto negativo de hnRNPK.

Estos resultados proponen a NUA1 como un potencial regulador del flujo glucolítico entre la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. Esto basado en el antecedente de que NUA1 afecta la translocación nuclear de PFKP (dato del laboratorio no publicado), la enzima irreversible de la glucólisis; sumado a la regulación del *splicing* de *G6PD* encontrado en esta tesis; y además de que las enzimas 6PGL y TKT encontrados en el *MudPIT* sugieren un rol directo de NUA1 en la promoción de la PPP (Palma & Castro, 2019). Sin embargo, esta implicancia de NUA1, así como la determinación de los mecanismos moleculares asociados a su rol en PPP, se proponen como un modelo para estudios futuros, enfocados a proponer a NUA1 como un potencial objetivo terapéutico en el tratamiento del cáncer.

## 6. Conclusiones generales

1. En un modelo *in silico*, las fosforilaciones potencialmente generadas por NUA1 en la estructura de hnRNP, afectan su capacidad de unirse a la zona regulatoria del *splicing* en el transcrito primario de *G6PD*.
2. NUA1 favorece el procesamiento del transcrito primario de *G6PD* de una manera dependiente de hnRNP en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116P53-/-.

## 7. Agradecimientos

Primero, agradecer a los fondos de financiamiento que permitieron el desarrollo de esta tesis. Entre ellos se encuentran los proyectos FONDECYT regulares N° 1201215 y N° 1191172, adjudicados por el Dr. Ariel Castro y la Dra. Roxana Pincheira, respectivamente. A la beca interna del programa del magíster en bioquímica y bioinformática y a la dirección de postgrado por su apoyo para la asistencia a congresos.

En el ámbito profesional agradecer a todos los miembros del laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer (TSC *lab*). En especial a los tutores de esta tesis el Dr. Ariel Castro y la Dra. Roxana Pincheira, por todo su apoyo y guía entregada en esta etapa de formación. Un agradecimiento especial a Mario Palma, quien me ofreció su ayuda en los momentos difíciles y me permitió colaborar en su investigación y publicación.

En el ámbito personal, agradecer a mi familia, en especial a mi madre, quien, aunque ya no está conmigo, me hizo la persona que soy. A mi padre y mis hermanos que me apoyaron en todo momento. Todos mis logros son gracias ellos.

También agradecer a Alejandro, quien fue parte importante del desarrollo de esta tesis, por guiarme y darme su apoyo incondicional; y que, junto con Luis, hicieron del laboratorio una hermandad. Gracias por su amistad y su compañía en aspectos más allá de lo profesional.

También agradecer a Maryori, por su cariño y por ser la mejor amiga que alguien pudiera desear.

A todos mis amigos por su apoyo en los momentos buenos y malos.



## 8. Bibliografía

- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. Lo. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271–280. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
- Azócar, S. (2022). NUA1 y cáncer: Elucidando la función de la quinasa NUA1 en su localización nuclear. Tesis de bioingeniería no publicada, Universidad de Concepción.
- Banerjee, S., Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D. G., Prescott, A. R., & Alessi, D. R. (2014). Interplay between Polo kinase, LKB1-activated NUA1 kinase, PP1 $\beta$ MYPT1 phosphatase complex and the SC $\beta$ TrCP E3 ubiquitin ligase. *Biochemical Journal*, 461(2), 233–245. <https://doi.org/10.1042/BJ20140408>
- Barboro, P., Ferrari, N., & Balbi, C. (2014). Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. *Cancer Letters*, 352(2), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.019>
- Bell, R. E., Khaled, M., Netanel, D., Schubert, S., Golan, T., Buxbaum, A., Janas, M. M., Postolsky, B., Goldberg, M. S., Shamir, R., & Levy, C. (2014). Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 441–451. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.340>
- Bhattacharai, K., Richard, T., Fatica, T., Frangione, B., Willmore, W. G., & Holcik, M. (2022). AMPK-related protein kinase ARK5 regulates subcellular localization of RNA-binding protein hnRNP A1 during hypertonic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102364. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102364>
- Biesiada, M., Purzycka, K. J., Szachniuk, M., Blazewicz, J., & Adamiak, R. W. (2016). *Automated RNA 3D Structure Prediction with RNAComposer* (Vol. 1490, pp. 199–215). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6433-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6433-8_13)
- Bomsztyk, K., Denisenko, O., & Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: One protein multiple processes. In *BioEssays* (6th ed., Vol. 26, pp. 629–638). Wiley. <https://doi.org/10.1002/bies.20048>
- Buvoli, M., Cobianchi, F., & Riva, S. (1992). Interaction of hnRNP A1 with snRNPS and pre-mRNAs: Evidence for a possible role of A1 RNA annealing activity in the first steps of

- spliceosome assembly. *Nucleic Acids Research*, 20(19), 5017–5025. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5017>
- Carpenter, B., McKay, M., Dundas, S. R., Lawrie, L. C., Telfer, C., & Murray, G. I. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 95(7), 921–927. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603349>
- 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, Z., Wang, J., Yuan, W., Chen, Z., Wu, S., Chen, J., Ge, J., & Hou, F. (2012). Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumor Biology*, 33(1), 95–101. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0251-9>
- Cossa, G., Roeschert, I., Prinz, F., Baluapuri, A., Silveira Vidal, R., Schüle-Völk, C., Chang, Y. C., Ade, C. P., Mastrobuoni, G., Girard, C., Wortmann, L., Walz, S., Lührmann, R., Kempa, S., Kuster, B., Wolf, E., Mumberg, D., & Eilers, M. (2020). Localized Inhibition of Protein Phosphatase 1 by NUA1 Promotes Spliceosome Activity and Reveals a MYC-Sensitive Feedback Control of Transcription. *Molecular Cell*, 77(6), 1322–1339.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.008>
- 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. *Tumor Biology*, 34(3), 1913–1918. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0735-x>
- Cyphert, T. J., Suchanek, A. L., Griffith, B. N., & Salati, L. M. (2013). Starvation actively inhibits splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA via a bifunctional ESE/ESS element bound by hnRNP K. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(9), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.04.009>
- De Berardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), 1–18. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Ding, Y., Chi, Y. C., & Lawrence, C. E. (2005). RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble. *Rna*, 11(8), 1157–1166. <https://doi.org/10.1261/rna.2500605>
- Escalona, E., Muñoz, M., Pincheira, R., Elorza, Á. A., & Castro, A. F. (2020). Cytosolic

- NUAK1 Enhances ATP Production by Maintaining Proper Glycolysis and Mitochondrial Function in Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01123>
- Escamilla-Gutiérrez, A., Ribas-Aparicio, R. M., Córdova-Espinoza, M. G., & Castelán-Vega, J. A. (2021). In silico strategies for modeling RNA aptamers and predicting binding sites of their molecular targets. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 40(8), 798–807. <https://doi.org/10.1080/15257770.2021.1951754>
- Furth, N., & Aylon, Y. (2017). The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: beyond the Hippo pathway. *Cell Death & Differentiation*, 24(9), 1488–1501. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.99>
- 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*, 15(12), 1552–1557. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1164372>
- Gao, R., Yu, Y., Inoue, A., Widodo, N., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. (2013). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) promotes tumor metastasis by induction of genes involved in extracellular matrix, cell movement, and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15046–15056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466136>
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, 135(8), 851–867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>
- Goffart, S., Tikkanen, P., Michell, C., Wilson, T., & Pohjoismäki, J. L. O. (2021). The type and source of reactive oxygen species influences the outcome of oxidative stress in cultured cells. *Cells*, 10(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cells10051075>
- Griffith, B. N., Walsh, C. M., Szeszel-Fedorowicz, W., Timperman, A. T., & Salati, L. M. (2006). Identification of hnRNPs K, L and A2/B1 as candidate proteins involved in the nutritional regulation of mRNA splicing. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1759(11–12), 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2006.10.001>
- Groban, E. S., Narayanan, A., & Jacobson, M. P. (2006). Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS Computational Biology*, 2(4), 238–250. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020032>
- Guo, B., Shi, X., Ma, Z., Ji, M., Tang, C., & Wang, F. (2021). A ratiometric dual luciferase reporter for quantitative monitoring of pre-mRNA splicing efficiency in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 297(2), 100933. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100933>

- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hong, X., Song, R., Song, H., Zheng, T., Wang, J., Liang, Y., Qi, S., Lu, Z., Song, X., Jiang, H., Liu, L., & Zhang, Z. (2014). PTEN antagonises Tcl1/hnRNP-mediated G6PD pre-mRNA splicing which contributes to hepatocarcinogenesis. *Gut*, 63(10), 1635–1647. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305302>
- Horecker, B. L. (2002). The pentose phosphate pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 47965–47971. <https://doi.org/10.1074/jbc.X200007200>
- Hou, X., Liu, J. E., Liu, W., Liu, C. Y., Liu, Z. Y., & Sun, Z. Y. (2011). A new role of NUAK1: Directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation. *Oncogene*, 30(26), 2933–2942. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.19>
- Huang, H., Han, Y., Yang, X., Li, M., Zhu, R., Hu, J., Zhang, X., Wei, R., Li, K., & Gao, R. (2017). HNRNP inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/ p21/CCND1 pathway. *Oncotarget*, 8(61), 103364–103374. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21873>
- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A. R., Aalten, D. M. F. V. A. N., & Alessi, D. R. (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochemistry Journal*, 394, 545–555. <https://doi.org/10.1042/BJ20051844>
- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., & Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature Cell Biology*, 13(3), 310–316. <https://doi.org/10.1038/ncb2172>
- Jiang, P., Du, W., & Wu, M. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein and Cell*, 5(8), 592–602. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0082-8>
- Jiang, P., Du, W., & Yang, X. (2013). A critical role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in TAp73-mediated cell proliferation. *Cell Cycle*, 12(24), 3720–3726. <https://doi.org/10.4161/cc.27267>
- Jin, L., & Zhou, Y. (2019). Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (review). *Oncology Letters*, 17(5), 4213–4221. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10112>

- Jonniya, N. A., Sk, M. F., & Kar, P. (2019). Investigating Phosphorylation-Induced Conformational Changes in WNK1 Kinase by Molecular Dynamics Simulations. *ACS Omega*, 4(17), 17404–17416. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02187>
- Ju, H. Q., Lu, Y. X., Wu, Q. N., Liu, J., Zeng, Z. L., Mo, H. Y., Chen, Y., Tian, T., Wang, Y., Kang, T. B., Xie, D., Zeng, M. S., Huang, P., & Xu, R. H. (2017). Disrupting G6PD-mediated Redox homeostasis enhances chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncogene*, 36(45), 6282–6292. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.227>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kang, J., Myung, S. L., & Gorenstein, D. G. (2005). The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 64(2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.06.003>
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., & Karplus, K. (2009). Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(S9), 114–122. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>
- Krüger, A., Grüning, N. M., Wamelink, M. M. C., Kerick, M., Kirpy, A., Parkhomchuk, D., Bluemlein, K., Schweiger, M. R., Soldatov, A., Lehrach, H., Jakobs, C., & Ralser, M. (2011). The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(2), 311–324. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3797>
- Kuehne, A., Emmert, H., Soehle, J., Winnefeld, M., Fischer, F., Wenck, H., Gallinat, S., Terstegen, L., Lucius, R., Hildebrand, J., & Zamboni, N. (2015). Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells. *Molecular Cell*, 59(3), 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.017>
- Lee, K. H., Kim, S. W., & Kim, J. R. (2009). Reactive oxygen species regulate urokinase plasminogen activator expression and cell invasion via mitogen-activated protein

- kinase pathways after treatment with hepatocyte growth factor in stomach cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-73>
- Li, D., Guo, J., & Jia, R. (2023). Epigenetic Control of Cancer Cell Proliferation and Cell Cycle Progression by HNRNPK via Promoting Exon 4 Inclusion of Histone Code Reader SPIN1. *Journal of Molecular Biology*, 435(6). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.167993>
- Li, T., Evdokimov, E., Shen, R. F., Chao, C. C., Tekle, E., Wang, T., Stadtman, E. R., Yang, D. C. H., & Chock, P. B. (2004). Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: A proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8551–8556. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402889101>
- Liberti, M. V, & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.The
- Liu, L., Ulbrich, J., Müller, J., Wüstefeld, T., Aeberhard, L., Kress, T. R., Muthalagu, N., Rycak, L., Rudalska, R., Moll, R., Kempa, S., Zender, L., Eilers, M., & 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>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Lu, C. C., Chu, P. Y., Hsia, S. M., Wu, C. H., Tung, Y. T., & Yen, G. C. (2017). Insulin induction instigates cell proliferation and metastasis in human colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology*, 50(2), 736–744. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3844>
- Lu, S., Niu, N., Guo, H., Tang, J., Guo, W., Liu, Z., Shi, L., Sun, T., Zhou, F., Li, H., Zhang, J., & Zhang, B. (2013). 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>
- Ma, H., Zhang, F., Zhou, L., Cao, T., Sun, D., Wen, S., Zhu, J., Xiong, Z., Tsau, M. T., Cheng, M. L., Hung, L. M., Zhou, Y., & Li, Q. (2021). c-Src facilitates tumorigenesis by phosphorylating and activating G6PD. *Oncogene*, 40(14), 2567–2580.

- <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01673-0>
- Ma, X., Wang, L., Huang, D., Li, Y., Yang, D., Li, T., Li, F., Sun, L., Wei, H., He, K., Yu, F., Zhao, D., Hu, L., Xing, S., Liu, Z., Li, K., Guo, J., Yang, Z., Pan, X., ... Zhang, H. (2017). Polo-like kinase 1 coordinates biosynthesis during cell cycle progression by directly activating pentose phosphate pathway. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01647-5>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2021). Cancer metabolism: looking forward. *Nature Reviews Cancer*, 21(10), 669–680. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00378-6>
- Matunis, M. J., Michael, W. M., & Dreyfuss, G. (1992). Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Molecular and Cellular Biology*, 12(1), 164–171. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.1.164-171.1992>
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L., & Wahle, E. (2006). Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 11115–11125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513053200>
- Ostrowski, J., Schullery, D. S., Denisenko, O. N., Higaki, Y., Watts, J., Aebersold, R., Stempka, L., Gschwendt, M., & Bomsztyk, K. (2000). Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3619–3628. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3619>
- Palma, M. (2019). NUA1 y cáncer: elucidando los mecanismos moleculares involucrados en la regulación y función de la quinasa NUA1. Tesis doctoral, Universidad de Concepción. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/1000>.
- Park, J. H., Pyun, W. Y., & Park, H. W. (2020). Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/cells9102308>
- 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>
- Paziewska, A., Wyrwicz, L. S., Bujnicki, J. M., Bomsztyk, K., & Ostrowski, J. (2004). Cooperative binding of the hnRNP K three KH domains to mRNA targets. *FEBS Letters*, 577(1–2), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.086>
- Peng, W. zhao, Liu, J. xi, Li, C. feng, Ma, R., & Jie, J. zheng. (2019). Hnrnpk promotes

- gastric tumorigenesis through regulating cd44e alternative splicing. *Cancer Cell International*, 19(335), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1020-x>
- Phan, L. M., Yeung, S. C. J., & Lee, M. H. (2014). Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biology and Medicine*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001>
- Phippen, N. T., Bateman, N. W., Wang, G., Conrads, K. A., Ao, W., Teng, P. N., Litzi, T. A., Oliver, J., Larry Maxwell, G., Hamilton, C. A., Darcy, K. M., & Conrads, T. P. (2016). NUA1 (ARK5) is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, 6(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00213>
- Port, J., Muthalagu, N., Raja, M., Ceteci, F., Monteverde, T., Kruspig, B., Hedley, A., Kalna, G., Lilla, S., Neilson, L., Brucoli, M., Gyuraszova, K., Tait-Mulder, J., Mezna, M., Svambaryte, S., Bryson, A., Sumpton, D., McVie, A., Nixon, C., ... 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>
- Pu, H., Zhang, Q., Zhao, C., Shi, L., Wang, Y., Wang, J., & Zhang, M. (2015). Overexpression of G6PD is associated with high risks of recurrent metastasis and poor progression-free survival in primary breast carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0733-0>
- Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to cause oxidative stress, the catalase issue. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21239149>
- Raymond W. Ruddon (2007). *Cancer Biology*. 4<sup>o</sup> Edición. Oxford University. ISBN-13: 978-0-19-517543-1
- Schmitz, C., Melquiond, A., Vries, S., Karaca, E., van Dijk, M., Kastritis, P., & Bonvin, A. M. J. J. (2012). Protein–Protein *Docking* with HADDOCK. In I. Bertini, K. McGreevy, & G. Parigi (Eds.), *NMR of Biomolecules: Towards Mechanistic Systems Biology* (pp. 520–535). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527644506.ch32>
- Shi, Y., Liu, W., Zheng, H., Li, Z., Shi, X., Cai, S., Jiao, Z., Mao, W., Xie, J., Tian, J., & Wang, F. (2018). Imaging of pre-mRNA splicing in living subjects using a genetically encoded luciferase reporter. *Biomedical Optics Express*, 9(2), 518. <https://doi.org/10.1364/boe.9.000518>
- Shibuya, N., Inoue, K. I., Tanaka, G., Akimoto, K., & Kubota, K. (2015). Augmented pentose



- phosphate pathway plays critical roles in colorectal carcinomas. *Oncology (Switzerland)*, 88(5), 309–319. <https://doi.org/10.1159/000369905>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Stultz, C. M., Levin, A. D., & Edelman, E. R. (2002). Phosphorylation-induced conformational changes in a mitogen-activated protein kinase substrate: Implications for tyrosine hydroxylase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47653–47661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208755200>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- 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., Shimojo, Y., Miyamoto, S., Ogura, T., Ochiai, A., & Esumi, H. (2004). Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5. *Oncogene*, 23(42), 7067–7075. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207963>
- 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>
- Venables, J. P. (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Research*, 64(21), 7647–7654. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1910>
- Wagle, A., Jivraj, S., Garlock, G. L., & Stapleton, S. R. (1998). Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14968–14974. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14968>
- Wang, C., Xu, H., Lin, S., Deng, W., Zhou, J., Zhang, Y., Shi, Y., Peng, D., & Xue, Y. (2020). GPS 5.0: An Update on the Prediction of Kinase-specific Phosphorylation Sites in

- Proteins. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 18(1), 72–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.01.001>
- Wang, Z., Qiu, H., He, J., Liu, L., Xue, W., Fox, A., Tickner, J., & Xu, J. (2020). The emerging roles of hnRNPK. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1995–2008.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.29186>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W407–W410. doi:10.1093/nar/gkm290
- Winship, P. R. (1989). An Improved method for directly sequencing PCR-amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Research*, 17(3), 1266.  
<https://doi.org/10.1093/nar/17.3.1266>
- Xie, J., Lee, J. A., Kress, T. L., Mowry, K. L., & Black, D. L. (2003). Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8776–8781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432696100>
- Xu, Y., Wu, W., Han, Q., Wang, Y., Li, C., Zhang, P., & Xu, H. (2019). Post-translational modification control of RNA-binding protein hnRNPK function. *Open Biology*, 9(3).  
<https://doi.org/10.1098/rsob.180239>
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., & Huang, S. Y. (2017). HDock: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W365–W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>
- Yano, M., Okano, H. J., & Okano, H. (2005). Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12690–12699.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M411119200>
- Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R., & Bodmer, W. F. (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3722–3727.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0915135107>
- Yuan TL; Cantley LC. (2008). PI3K pathway alterations in cancer. *Oncogene*, 27(41), 5497–

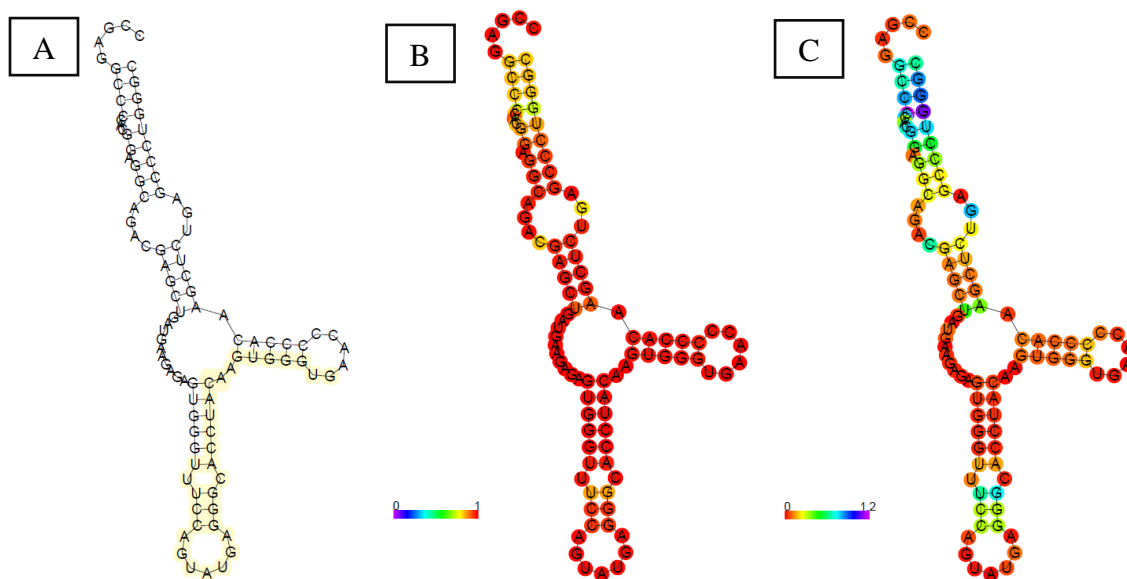
5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>.PI3K

- Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D. G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A. R., & Alessi, D. R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Science Signaling*, 3(115), 1–13. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000616>
- Zhang, Q., Yi, X., Yang, Z., Han, Q., Di, X., Chen, F., Wang, Y., Yi, Z., Kuang, Y., & Zhu, Y. (2017). Overexpression of G6PD represents a potential prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Cancer*, 8(4), 665–673. <https://doi.org/10.7150/jca.16858>
- Zhang, X., Zhang, X., Li, Y., Shao, Y., Xiao, J., Zhu, G., & Li, F. (2017). Pak4 regulates g6pd activity by p53 degradation involving colon cancer cell growth. *Cell Death and Disease*, 8(5), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.85>

## 9. Material Suplementario

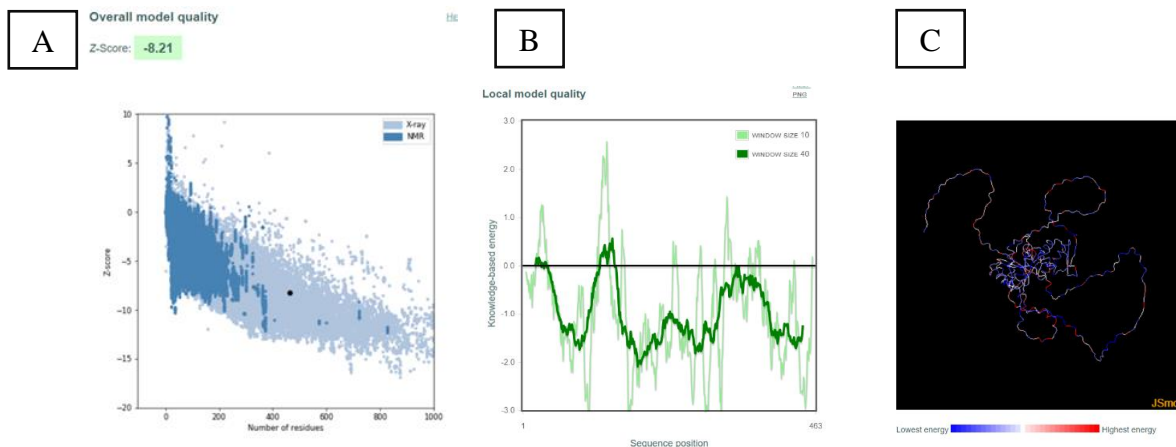
### 9.1 Suplementarios bioinformáticos

Los siguientes corresponden a datos adicionales obtenidos en el **objetivo número uno**, correspondientes a modelamiento del ARN del exón 12 de *G6PD*; modelos de *docking* molecular; y parámetros de calidad adicionales.

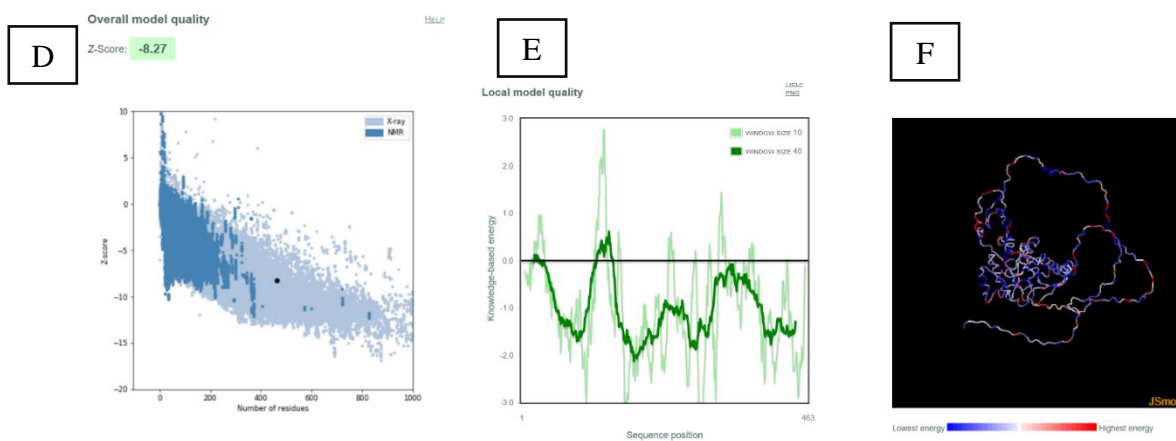


**Figura S1: Modelos de la estructura centroide del exón 12 de *G6PD*.** El método de predicción por centroide es una alternativa al MFE. El centroide para un conjunto dado de estructuras es la estructura (en todo el conjunto) que tiene la mínima distancia total de pares de bases a las estructuras en el conjunto. Por tanto, la estructura centroide puede considerarse como la única manera que mejor representa la tendencia central del conjunto (Ding et al., 2005). Para el caso del exón 12, vemos que la predicción base (A), la predicción de Probabilidades de apareamiento entre pares de bases (B) y el esquema de entropía posicional de cada nucleótido (C), es idéntico al modelo MFE, brindando mayor confiabilidad a la predicción.

## HnRNP-K-WT

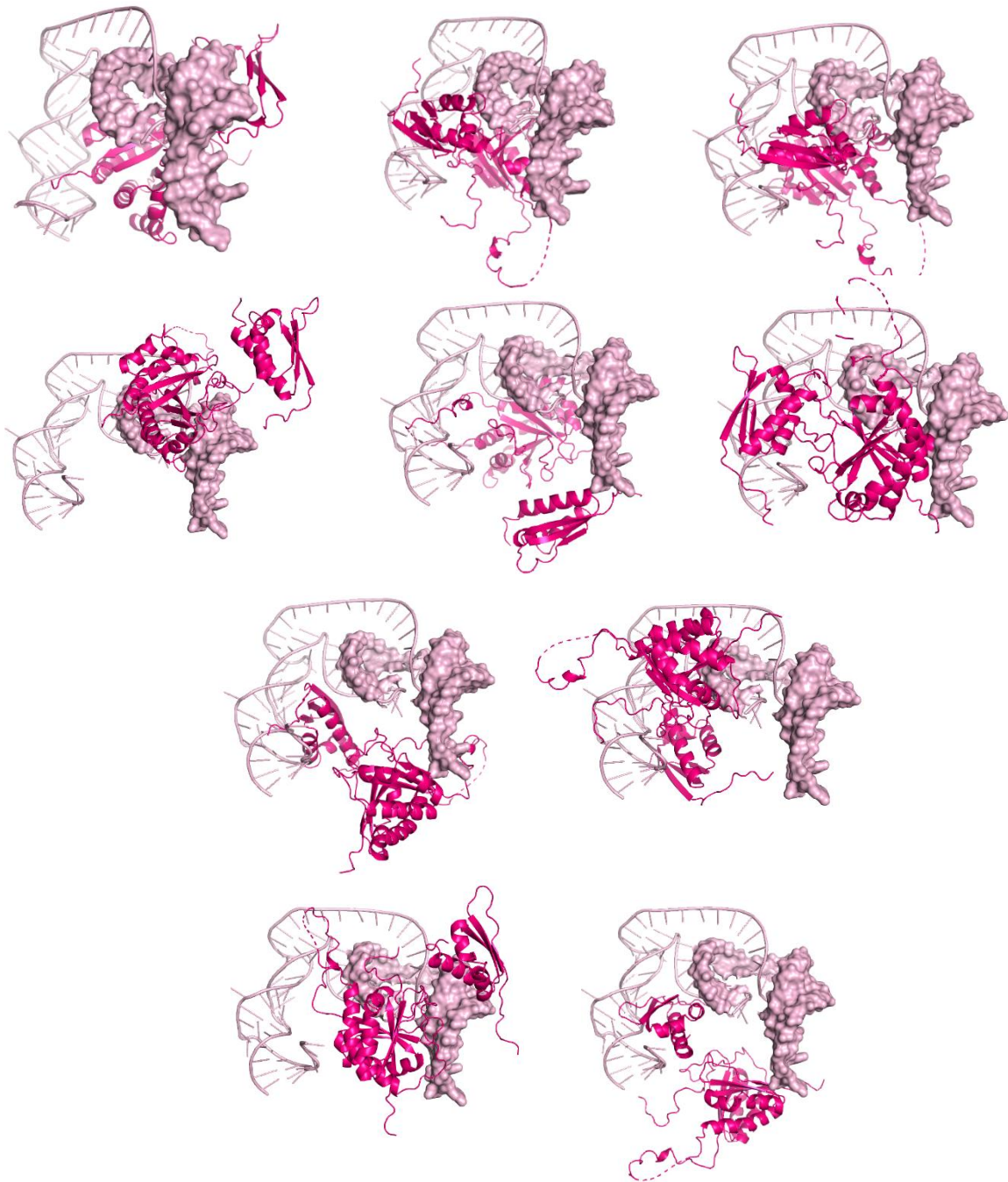


## HnRNP-K-ps89-ps417

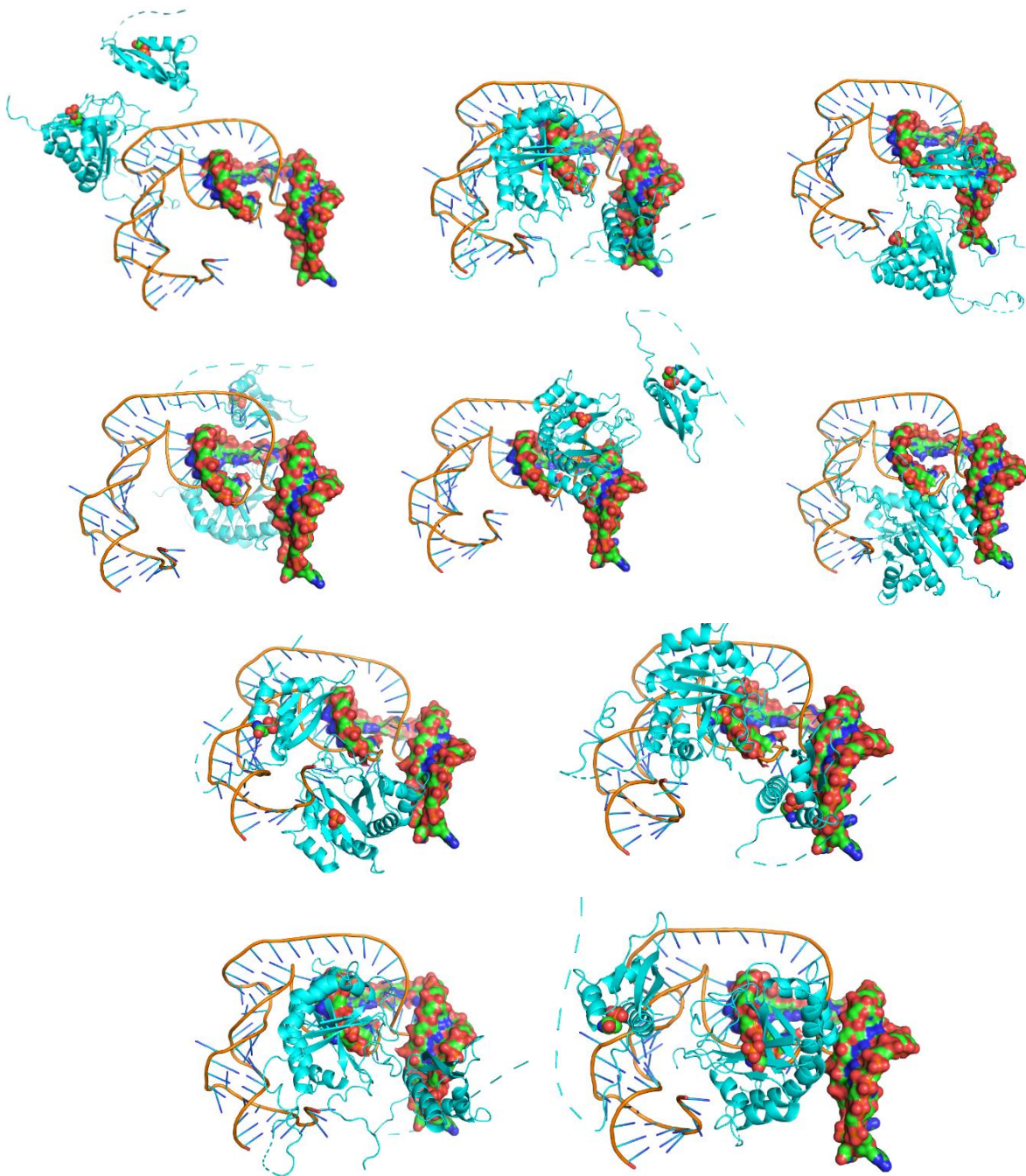


### Figura S2: Evaluación energética de modelos hnRNP-K-WT y hnRNP-K-pS89-pS417 con ProSA.

(A) y (D) Gráficos de z-score. Este indica calidad general del modelo y mide la desviación de la energía total de la estructura respecto a una distribución de energía derivada de conformaciones aleatorias. En el gráfico se compara la puntuación z del modelo con un rango de valores de proteínas nativas (de tamaño similar) determinadas por rayos X o NMR en PDB. Los valores de -8,21 y -8,27 se disponen dentro del rango de estructuras cristalográficas, indicando una alta calidad de los modelos. (B) y (E) Diagrama de energía. Se muestra la calidad del modelo al representar las energías en función de la posición de la secuencia de aminoácidos, siendo los valores positivos indicativos de regiones erróneas en un modelo. Para este caso, ambas estructuras presentan la mayor parte de su cadena aminoacídica en valores negativos, indicando su calidad. (C) y (F) Representación 3D. En azul los residuos con menor energía (favorables) y en rojo con mayor (no favorables). Ambos modelos presentan principalmente tonos azules y blancos. Esto indica que hnRNP-K WT y fosforilada presenta una alta calidad energética.



**Figura S3: Top 10 modelos de interacción hnRNP-K-WT-exón 12 *G6PD*.** Modelos ordenados de acuerdo a su energía libre mínima de menor a mayor. Se observa que para la mayoría de los modelos la interacción es cercana entre los dominios KH de hnRNP-K y la zona reguladora del splicing del ARNm del exón 12 de *G6PD*. Todos los modelos fueron obtenidos con ajuste forzado (de la zona reguladora únicamente) y semi-flexible en el software HADDOCK Rosa: hnRNP-K, rosa claro: ARNm.



**Figura S4: Top 10 modelos de interacción hnRNPK-pS89-pS417-exón 12 *G6PD*.** Modelos ordenados de acuerdo a su energía libre mínima de mayor a menor. Se observa que, para todos modelos, la interacción es más alejada (respecto del modelo WT) entre los dominios KH de hnRNPK fosforilada y la zona reguladora del splicing del ARNm del exón 12 de *G6PD*. Todos los modelos fueron obtenidos con ajuste forzado (de la zona reguladora únicamente) y semi-flexible en el software HADDOCK. Celeste: hnRNPK fosforilada, verde, azul y rojo: ARNm

## HnRNPK-WT-exón 12-G6PD

A

### 1. Ramachandran Plot statistics

		No. of residues	%-tage
Most favoured regions	[A,B,L]	221	89.5%*
Additional allowed regions	[a,b,l,p]	26	10.5%
Generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Disallowed regions	[XX]	0	0.0%
-----			
Non-glycine and non-proline residues		247	100.0%
-----			
End-residues (excl. Gly and Pro)		5	
-----			
Glycine residues		30	
Proline residues		14	
-----			
Total number of residues		296	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and *R*-factor no greater than 20.0 a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions [A,B,L].

## HnRNPK-pS89-pS417-exón 12 G6PD

B

### 1. Ramachandran Plot statistics

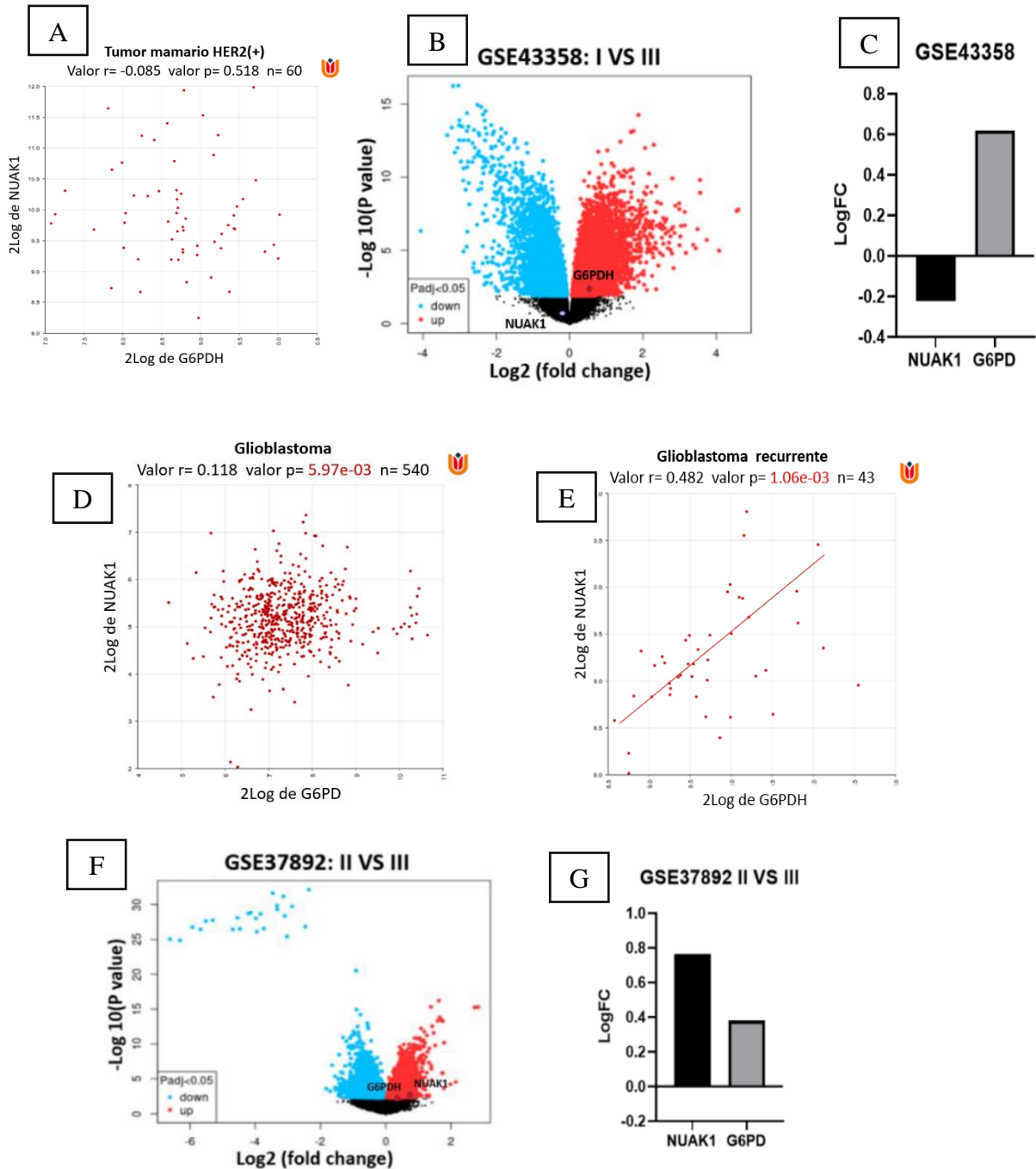
		No. of residues	%-tage
Most favoured regions	[A,B,L]	214	85.9%*
Additional allowed regions	[a,b,l,p]	34	13.7%
Generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Disallowed regions	[XX]	1	0.4%*
-----			
Non-glycine and non-proline residues		249	100.0%
-----			
End-residues (excl. Gly and Pro)		5	
-----			
Glycine residues		32	
Proline residues		15	
-----			
Total number of residues		301	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and *R*-factor no greater than 20.0 a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions [A,B,L].

**Figura S5: Resultado de PDBsum de los archivos PDB de ambos modelos de *docking* molecular.** Se muestra la disposición de los ángulos phi y psi de acuerdo con las zonas más favorecidas [A,B,L], las regiones adicionales permitidas [a,b,l,p], las regiones permitidas generosamente [~a,~b,~l,~p], y las regiones no permitidas [XX]. (A) HnRNPK-WT-exón 12-G6PD: Los ángulos ubicados en zonas permitidas llega a 89,5%, con el resto de los ángulos distribuidos en la zona adicional (10,5%). (B) HnRNPK-pS89-pS417-exón 12 G6PD: Por su parte los porcentajes son 85,9%; 13,7 y 0,4%. A diferencia del modelo WT, este presenta un 0,4% de ángulos que se localizan en la zona no permitida.

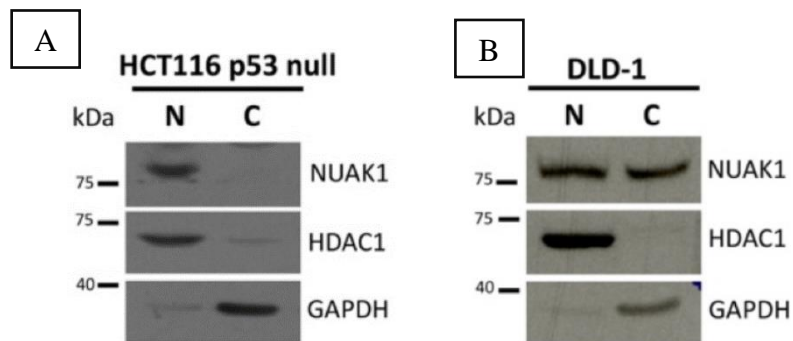


## 9.2 Suplementarios experimentales y bibliográficos



**Figura S6: Correlación entre la expresión de NUAK1 y G6PD en cáncer de mama, glioblastoma y colorrectal.** (A) Correlación en HER2(+) ( $n=60$ ,  $p=0.518$ ), obtenido en R2 Genomics. (B) Gráfico de volcano de estudio GSE43358 entre grados histológicos I y III de cáncer de mama (cada punto representa un gen, en azul=regulados a la baja; rojo= regulados al alza). (C) Gráfico de logaritmo de *fold change* para NUAK1 (LogFC:-0.022; p-value: 0.217) y G6PD (LogFC: 0.624; p-value: 1.29e-3)

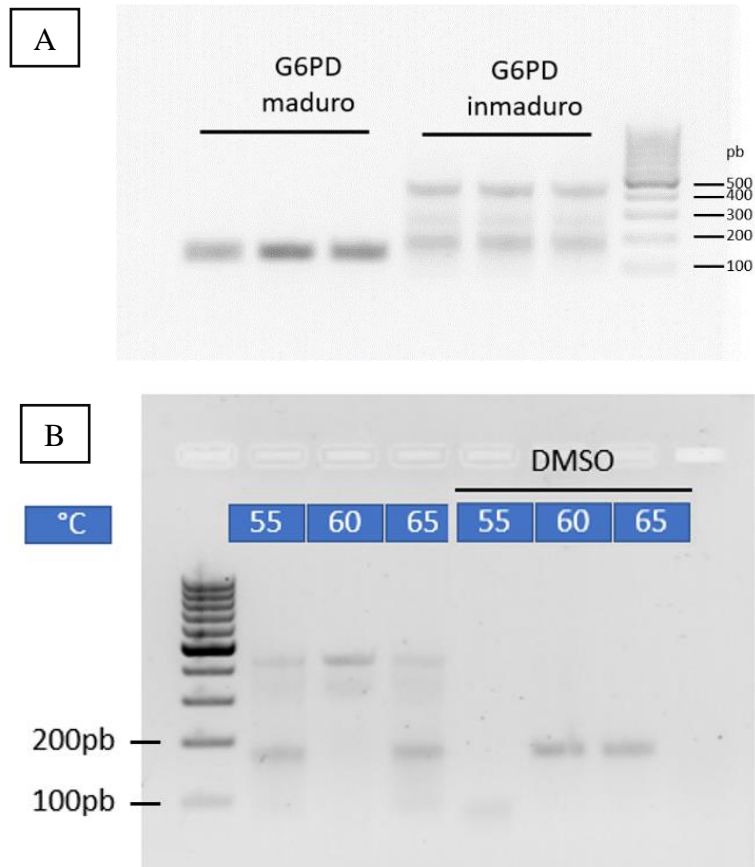
entre grados I y III. (D) Análisis de correlación entre la expresión de NUAK1 y *G6PD* en GBM (n=540, p=5.97e-3). (E) Análisis de correlación entre la expresión de NUAK1 y *G6PD* en GBM recurrente (n=43, p=1.06e-3). Obtenido de R2 Genomics. (F) Resultados de estudios GEOR2 en muestras de cáncer colorrectal GSE37892. Gráfico de volcano en estudio GSE37892 entre los estadios II y III, donde cada punto representa un gen (rojo: regulados al alza, azul=regulados a la baja). (G) Gráfico de logaritmo de *fold change* para NUAK1 (LogFC:0.76; p-value: 0.011) y *G6PD* (LogFC: 0.38; p-value: 0.05) entre estadios II y III. n= 130 muestras de adenocarcinoma de colon (n=73 n estadio II y n=57 en III).



**Figura S7: Western blots del fraccionamiento sub-celular** de (A) HCT116P53<sup>-/-</sup> y (B) DLD-1 utilizando los anticuerpos indicados. HDAC1 fue utilizado como marcador nuclear. GAPDH fue utilizado como marcador citoplasmático. N: Fracción nuclear, C: fracción citoplasmática. (Palma & Castro, 2019).

## 10. Anexos

### 10.1 Estandarización de partidores para detección de *G6PD*: transcrito maduro e inmaduro.



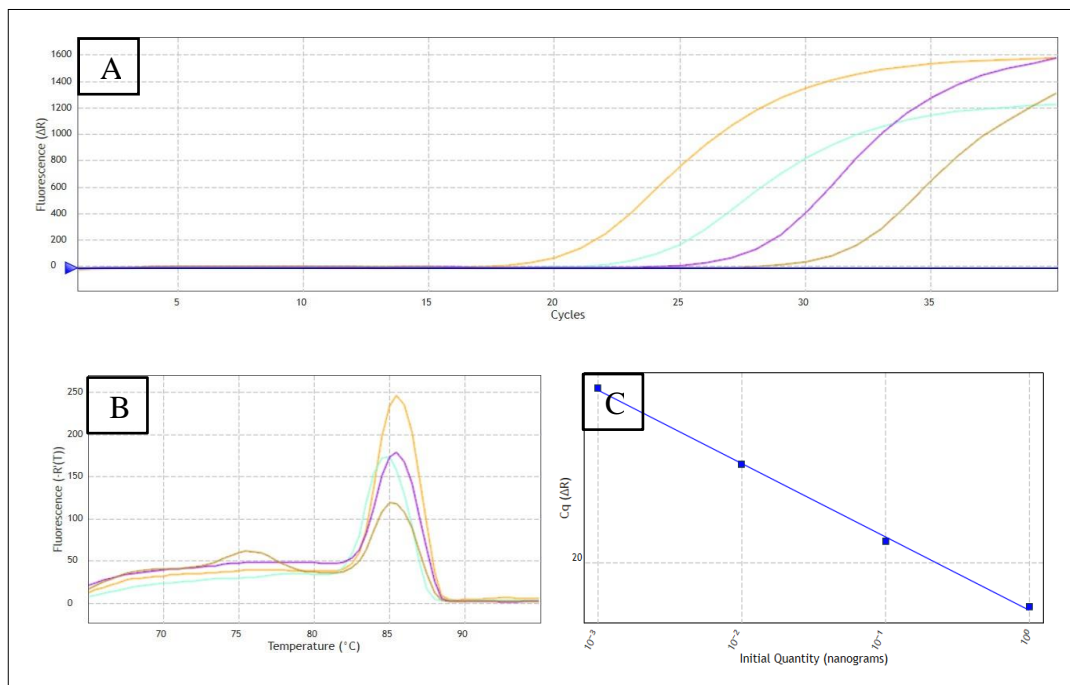
#### Anexo 1: Estandarización de partidores para la detección del transcrito inmaduro de *G6PD*.

(A) Resultados de qPCR para set de partidores que detectan *G6PD* maduro, que muestra especificidad en la detección de un único tamaño de producto. El set a la derecha muestra la formación de 2 productos de tamaño inespecífico para el caso del set de partidores que detectan *G6PD* inmaduro. El tamaño esperado es de alrededor de 200 pb. (B) Estandarización de temperaturas de alineamiento entre 55-60 y 65°C con o sin DMSO 5%. Se observa que sólo en el caso del uso de DMSO se observa la banda específica de 200 pb.

*\*Adicionalmente, se probó: curva de temperatura larga sin DMSO; concentración de partidores, concentración de cDNA e integridad de ARN extraído previo a síntesis de cDNA (datos no mostrados)*

## 10.2 Evaluación de la eficiencia de partidores para la detección del ARNm maduro de *G6PD*

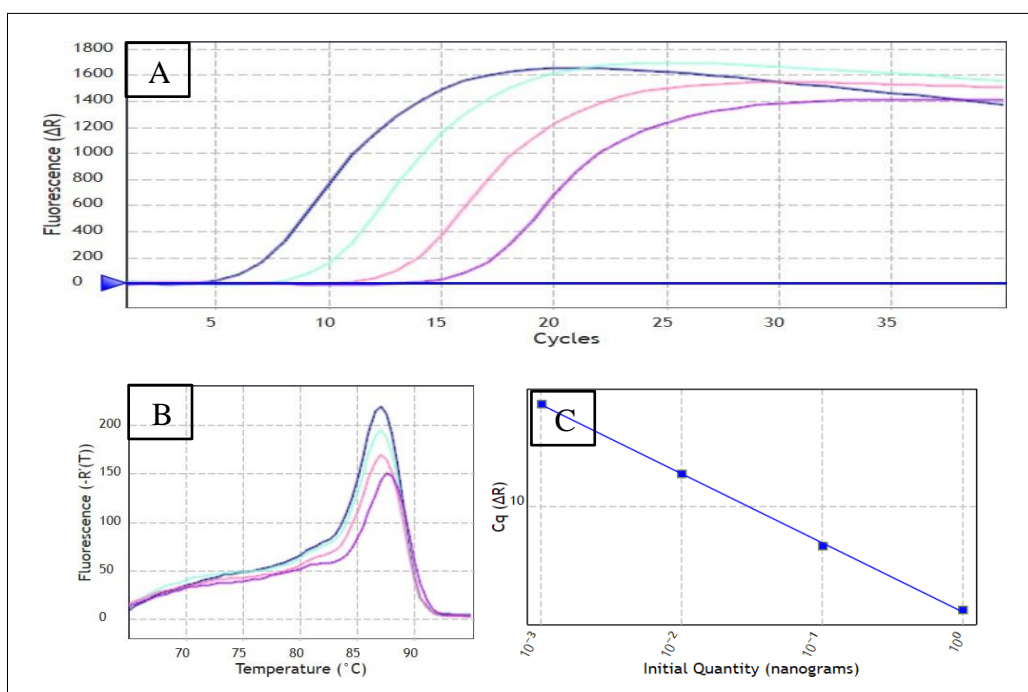
Para asegurar que los partidores pueden detectar de manera eficiente el transcrito primario de *G6PD* se realizaron PCR cuantitativas de diluciones seriadas (1/10) a partir de cDNA 1x que había sido previamente sintetizado con oligoDT. Para los partidores FE11 y RE12 la curva de amplificación (anexo 2A) refleja una distribución de los ct acorde a la dilución seriada del templado. Por otro lado, la curva de melting (anexo 2B), que indica la especificidad de los partidores, indica un único producto generado alrededor de los 85°C, sin presencia de formación de producto inespecífico o dímeros de primers, que influyeran en los análisis posteriores. Por último, la curva estándar (anexo 2C) presentó un R2 de 0,999 y una eficiencia de 93,44% (en un rango de 100±10). Todo esto indica que los partidores detectan correctamente el ARN target y, por lo tanto, pueden ser utilizados en el desarrollo de este proyecto.



**Anexo 2: Resultados de prueba de partidores en AriaMX Real-Time PCR.** (A) Curva de amplificación de fluorescencia SYBR/número de ciclos. La línea azul indica la fluorescencia umbral. (B) Curva de melting que indica fluorescencia detectada en función de la temperatura de reacción. (C) Curva de eficiencia que presenta el ciclo de detección de la fluorescencia en función de la cantidad de producto inicial para cada reacción. R2:0,999; Pendiente: -3,48; intercepto: 16,73.

### 10.3 Evaluación de la eficiencia de partidores para la detección del pre-ARNm de *G6PD*

Para verificar la detección del transcrito primario de *G6PD*, se realizó una prueba que consistió en diluciones seriadas (1/10) a partir de producto de PCR 1x que había sido previamente sintetizado con random primers. Al igual que para los partidores FE11 y RE12, los cebadores FI11 y RE12 pueden detectar el target, siendo la fluorescencia concordante con la concentración (anexo 3A). La curva de melting (anexo 3B), verifica la especificidad de los partidores, obteniéndose un único producto generado (alrededor de 87°C), sin presencia de formación de producto inespecífico o dímeros de primers, que afecten los análisis posteriores. Respecto de la curva estándar (anexo 3C), esta presentó un R2 de 0,999 y una eficiencia de 104%. Todo esto indica que los partidores detectan correctamente el ARN target y, por lo tanto, pueden ser utilizados en el desarrollo de este proyecto.



**Anexo 3: Resultados de prueba de partidores en AriaMX Real-Time PCR.** (A) Curva de amplificación. La línea azul indica la fluorescencia umbral. (B) Curva de melting. (C) Curva de eficiencia. R2:0,999; Pendiente: -3,22; intercepto: 4,08.

*\*Esta prueba de eficiencia de partidores fue realizada para todos los set de partidores utilizados en este trabajo y también para cada línea celular utilizada.*