



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

Rol del eje NUAK1/hnRNPK en el metabolismo del cáncer colorrectal

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

Alejandro Farías
CONCEPCIÓN-CHILE
2026

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

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr.
Ariel Castro
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra.
Valentina Parra
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Dr.
José Luis Gutiérrez
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr.
Roberto Elizondo
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra.
Marcela Torrejón
Directora
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Resumen

NUAK1 es una serina/treonina quinasa de la familia relacionada a AMPK, cuya actividad se ha vinculado a procesos metabólicos y protumorales. No obstante, los mecanismos que conectan a NUAK1 con la regulación metabólica y su impacto en la respuesta a quimioterapias en cáncer colorrectal permanecen poco definidos. En este trabajo demostramos que, en cáncer colorrectal, NUAK1 presenta una localización predominantemente nuclear. De acuerdo con esto, el análisis de su interactoma revela una fuerte asociación con proteínas involucradas en el procesamiento del ARNm. Entre estos interactores confirmamos la asociación con el factor de empalme hnRNPK, conocido por regular el procesamiento del pre-mRNA de G6PD, la enzima limitante de la vía de las pentosas fosfato (PPP). Esta interacción sugiere que NUAK1, a través de hnRNPK, podría modular la expresión de G6PD y, con ello, influir directamente en la actividad de la PPP.

Consistentemente, observamos que NUAK1 incrementa los niveles de G6PD y favorece el procesamiento de su pre-mRNA, efecto acompañado por una disminución en la interacción entre hnRNPK y dicho transcrito. Adicionalmente, análisis de metabolómica indican que NUAK1 redirige el flujo de glucosa hacia la PPP en células de cáncer colorrectal, promoviendo la generación de NADPH, regulando el estrés oxidativo y favoreciendo la síntesis lipídica dependiente de esta vía. Además, los datos sugieren un rol adicional de NUAK1 en el metabolismo de purinas y en la homeostasis energética.

Dado que la PPP contribuye a la resistencia a oxaliplatino, evaluamos el impacto de la inhibición de NUAK1 en este contexto. Encontramos que NUAK1 aumenta en el núcleo tras el tratamiento con oxaliplatino y que su inhibición bloquea la inducción de G6PD mediada por el fármaco. En concordancia, la inhibición de NUAK1 sensibiliza a líneas celulares de cáncer colorrectal a oxaliplatino, incrementando el estrés genotóxico. Del mismo modo, en organoides derivados de pacientes, la inhibición de NUAK1 potencia la eficacia del tratamiento.

En conjunto, nuestros resultados establecen a NUAK1 como un regulador clave de la vía de las pentosas fosfato y un determinante de la respuesta a oxaliplatino en cáncer colorrectal. Estos hallazgos posicionan al eje NUAK1/G6PD como un potencial blanco terapéutico para mejorar la eficacia de las terapias actuales.

Summary

NUAK1 is a serine/threonine kinase related to the AMPK family, and its activity has been linked to metabolic and pro-tumor processes. However, the mechanisms connecting NUAK1 to metabolic regulation and its impact on chemotherapy response in colorectal cancer are not fully understood. In this study, we show that NUAK1 displays predominantly nuclear localization in colorectal cancer cells. Consistent with this, analysis of its interactome reveals a strong association with proteins involved in mRNA processing. Among these interactors, we validated the interaction between NUAK1 and the splicing factor hnRNPK, a known regulator of the processing of G6PD pre-mRNA, the rate-limiting enzyme of the pentose phosphate pathway (PPP). This interaction suggests that NUAK1, through hnRNPK, may modulate G6PD expression and thereby influence PPP activity.

Accordingly, we observed that NUAK1 increases G6PD levels and promotes the processing of its pre-mRNA, an effect accompanied by a decrease in the interaction between hnRNPK and this transcript. Metabolomic analyses indicate that NUAK1 redirects glucose flux toward the PPP in colorectal cancer cells, promoting NADPH production, regulating oxidative stress, and supporting PPP-dependent lipid synthesis. Additionally, the data suggests an extra role for NUAK1 in purine metabolism and energy homeostasis.

Because the PPP contributes to oxaliplatin resistance, we evaluated the impact of NUAK1 inhibition in this context. We found that NUAK1 increases in the nucleus after oxaliplatin treatment and its inhibition blocks the drug-induced upregulation of G6PD. Consistently, NUAK1 inhibition sensitizes colorectal cancer cell lines to oxaliplatin, increasing genotoxic stress. Similarly, in patient-derived organoids, NUAK1 inhibition enhances oxaliplatin effectiveness.

Taken together, our results identify NUAK1 as a key regulator of the pentose phosphate pathway and an important determinant of oxaliplatin response in colorectal cancer. These findings position the NUAK1/G6PD axis as a potential therapeutic target to improve current treatments.

Índice de figuras

Figura 1. Progresión del adenocarcinoma de colon.....	9
Figura 2. Vía de las pentosas fosfato.....	12
Figura 3. Mecanismos moleculares involucrado en la regulación de G6PD.....	17
Figura 4. Esquema representativo de las principales modificación post-traduccionales de hnRNPK..	21
Figura 5. hnRNPK presenta potenciales sitios de fosforilación dependientes de NUA1.....	24
Figura 6. NUA1 presenta sobreexpresión en cáncer colorrectal en comparación con tejido normal adyacente.....	37
Figura 7. Análisis de la expresión de NUA1.....	38
Figura 8. NUA1 se localiza principalmente en el núcleo en líneas celulares de cáncer colorrectal..	39
Figura 9. hnRNPK es un nuevo interactor de NUA1 en cáncer colorrectal.....	41
Figura 10. NUA1 interacciona con hnRNPK en el núcleo de células de cáncer colorrectal.....	42
Figura 11. NUA1 promueve de manera indirecta la fosforilación de hnRNPK.....	43
Figura 12. NUA1 interacciona con los complejos de la proteína fosfatasa 1B citoplasmáticos y nucleares, pero no hnRNPK.....	45
Figura 13. Modelo del mecanismo molecular propuesto para el objetivo 1.....	46
Figura 14. NUA1 no afecta la distribución nuclear de hnRNPK en diferentes contextos.....	48
Figura 15. NUA1 no afecta la distribución subcelular ni la expresión de hnRNPK.....	49
Figura 16. NUA1 y hnRNPK regulan genes asociados al metabolismo celular.....	53
Figura 17. NUA1 promueve la expresión de G6PD en líneas de cáncer colorrectal.....	54
Figura 18. hnRNPK interacción con el pre-mRNA de G6PD y regula su expresión en líneas celulares de cáncer colorrectal.....	55
Figura 19. NUA1 promueve el procesamiento del pre-mRNA de G6PD.....	56
Figura 20. NUA1 inhibe la interacción de hnRNPK con el pre-mRNA de G6PD.....	57
Figura 21. Correlación entre los niveles de NUA1, hnRNPK y G6PD.....	58
Figura 22. Modelo del mecanismo molecular de la regulación de NUA1 sobre el procesamiento del pre-mRNA de G6PD.....	59
Figura 23. Estandarización de incubación con isotopo de glucosa.....	62
Figura 24. NUA1 promueve la actividad de G6PD y esquema de análisis propuesto.....	62
Figura 25. NUA1 disminuye el flujo de 1,2-13C2 glucosa a través de la glicolisis.....	63
Figura 26. NUA1 promueve el flujo de 1,2-13C2 glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato...	64

Figura 27. La inhibición de NUA1 disminuye la actividad de G6PD, disminuyendo los niveles de NADPH e incrementando el ROS.....	66
Figura 28. NUA1 disminuye los niveles de ROS dependiente de la función de G6PD.....	67
Figura 29. NUA1 promueve la acumulación lipídica dependiente de su función sobre G6PD.....	70
Figura 30. La inhibición de NUA1 produce un desbalance en los niveles de bases nitrogenadas.....	71
Figura 31. NUA1 afecta la proliferación celular en un mecanismo independiente de G6PD.....	73
Figura 32. NUA1 afecta el ciclo celular en un mecanismo independiente de G6PD.....	74
Figura 33. NUA1 promueve la migración celular parcialmente a través de G6PD.....	75
Figura 34. La pérdida de NUA1 disminuye los niveles de ATP e incrementa los niveles de AICAR....	78
Figura 35. La pérdida de NUA1 incrementa el catabolismo de purinas.....	79
Figura 36. La pérdida de NUA1 promueve la excreción de adenosina y guanosina.....	80
Figura 37. La pérdida de NUA1 disminuye metabolitos asociados a la B-oxidación.....	81
Figura 38. Representación gráfica de los principales efectos metabólicos de NUA1.....	84
Figura 39. NUA1 incrementa su expresión frente a Oxaliplatino.....	88
Figura 40. La actividad del promotor y los niveles de ARNm de NUA1 disminuyen frente a Oxaliplatino.....	89
Figura 41. NUA1 aumenta a nivel del núcleo de células HCT116p53-/- frente a oxaliplatino.....	90
Figura 42. La pérdida de NUA1, disminuye el aumento en G6PD mediado por oxaliplatino.....	91
Figura 43. La inhibición de NUA1 sensibiliza a células de CCR frente a Oxaliplatino.....	92
Figura 44. La inhibición de NUA1 incrementa el estrés genotóxico inducido por Oxaliplatino....	93-95
Figura 45. NUA1 promueve la expresión de G6PD en organoides de cáncer colorrectal.....	96
Figura 46. La inhibición de NUA1 sensibiliza a organoides derivados de cáncer colorrectal frente a Oxaliplatino.....	97
Figura 47. Correlación entre la expresión de NUA1 y la sensibilidad a oxaliplatino en líneas celulares de cáncer.....	98
Figura 48. Esquema resumen.....	99
Figura 49. Modelo final propuesto para esta tesis.....	112

Índice de Anexos

Anexo 1. La inhibición de NUA1, incrementa el flujo de glucosa a través de la glicolisis.....	125
Anexo 2. La inhibición de NUA1 disminuye el flujo a través de la rama oxidativa, pero incrementa la rama no oxidativa de la PPP.....	126

Anexo 3. NUAK1 regula la fosforilación de TKT.....	127
Anexo 4. La inhibición de NUAK1 disminuye los niveles de ácido palmítico.....	128
Anexo 5. Efecto de NUAK1 sobre los niveles de metabolitos del ciclo de Krebs.....	129

Indice de Tablas

Tabla 1: Partidores utilizados para qPCR.....	29
---	----

Abreviaturas

AMPK: AMPK activated kinases.

ARK5: AMPK related kinase member 5

ARKs: AMPK related kinases

hnRNPK: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K

LKB1: Liver kinase B1

MYPT1: myosin phosphatase targeting-1

PNUTS: PP1 nuclear targeting subunits

PP1: Protein phosphatase 1

G6PD: Glucose-6-fosfate dehydrogenase

TKT: Transketolase

PFK1: Phosphofructokinase-1

NRF2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PBS: Phosphate buffered saline

SIK1: Salt Inducible Kinase 1

IPO9: Importin-9

HDAC1: Histone deacetylase 1

AICAR: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

INTRODUCCIÓN

Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Se define como una neoplasia maligna originada por la proliferación descontrolada de células epiteliales en el intestino grueso, con capacidad de invasión y metástasis. **En Chile, el cáncer representa la primera causa de muerte desde 2019**, y la supervivencia a cinco años del CCR es de apenas 64,7% (Fabregas et al., 2022). A nivel global, es el tercer cáncer con mayor incidencia (10%) y el segundo en mortalidad (9,4%), con aproximadamente 3.000 muertes anuales en el país (GLOBOCAN, 2020).

El CCR se origina mayoritariamente (98%) como adenocarcinoma, caracterizado por proliferación glandular anómala en la mucosa (Cotran., Robbins., Kumar, 2010; Ross, 2008). Su desarrollo suele seguir la denominada secuencia adenoma–carcinoma, iniciada por mutaciones en el gen APC, que desregulan la vía Wnt y conducen a la formación de pólipos adenomatosos. Adicionalmente, a lo largo de la progresión tumoral se acumulan mutaciones adicionales en KRAS y TP53 (Kim et al., 2025) (**Fig. 1**), que favorecen el crecimiento descontrolado, la resistencia a la apoptosis y la transición hacia malignidad invasiva. La clasificación clínica del CCR se basa en el sistema TNM, que considera el tamaño tumoral (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). Los estadios tempranos (0–I) se limitan a la mucosa o la pared del colon, mientras que los estadios avanzados (III–IV) involucran diseminación ganglionar o metastásica, con pronóstico desfavorable (Li et al., 2014).

Desde un punto de vista epidemiológico, el CCR presenta tres formas de presentación: esporádico (90% de los casos), hereditario (síndrome de Lynch y poliposis familiar) y familiar (agregación en parientes de primer grado) (Pastor & Schlom, 2021). En los casos esporádicos predominan alteraciones cromosómicas e inestabilidad genómica. En el síndrome de Lynch, la inestabilidad de microsatélites (MSI) es consecuencia de mutaciones en los genes de reparación del ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), generando acumulación de errores replicativos (Diao et al., 2021). La detección de MSI tiene valor diagnóstico y pronóstico, y actualmente se emplea para descartar esta forma hereditaria. Las mutaciones en KRAS, presentes en aproximadamente un 35% de los CCR (G12D y G12C como variantes más frecuentes) (Park et al., 2021), confieren resistencia a terapias dirigidas contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, de su sigla en inglés), como cetuximab o panitumumab, definiendo un subgrupo de tumores considerados “undruggable”. En

este contexto, se han desarrollado terapias específicas como adagrasib, un inhibidor selectivo de KRAS G12C, actualmente en ensayos clínicos para cáncer colorrectal metastásico (Parslow et al., 2017). Por su parte, las mutaciones en TP53, presentes en hasta 75% de los casos, provocan la pérdida de la función supresora de p53, contribuyendo a la progresión tumoral y a la evasión de la apoptosis (Olivares-Hernández et al., 2022).

El CCR es una enfermedad molecularmente heterogénea. En 2015, el Colorectal Cancer Subtyping Consortium propuso una clasificación en cuatro subtipos moleculares consenso (CMS) (Menter et al., 2019; Mouradov et al., 2014; Soneson et al., 2015; Thanki et al., 2017):

CMS1 (Inmunogénico / MSI): alto grado de hipermutación y respuesta inmune activa (≈14%).

CMS2 (Canónico): alteraciones cromosómicas y activación de la vía Wnt/ β -catenina y C-MYC (≈37%).

CMS3 (Metabólico): desregulación epitelial y metabólica, con fenotipo mixto (≈13%).

CMS4 (Mesenquimal): activación de TGF- β , invasión estromal y angiogénesis, asociado a mal pronóstico.

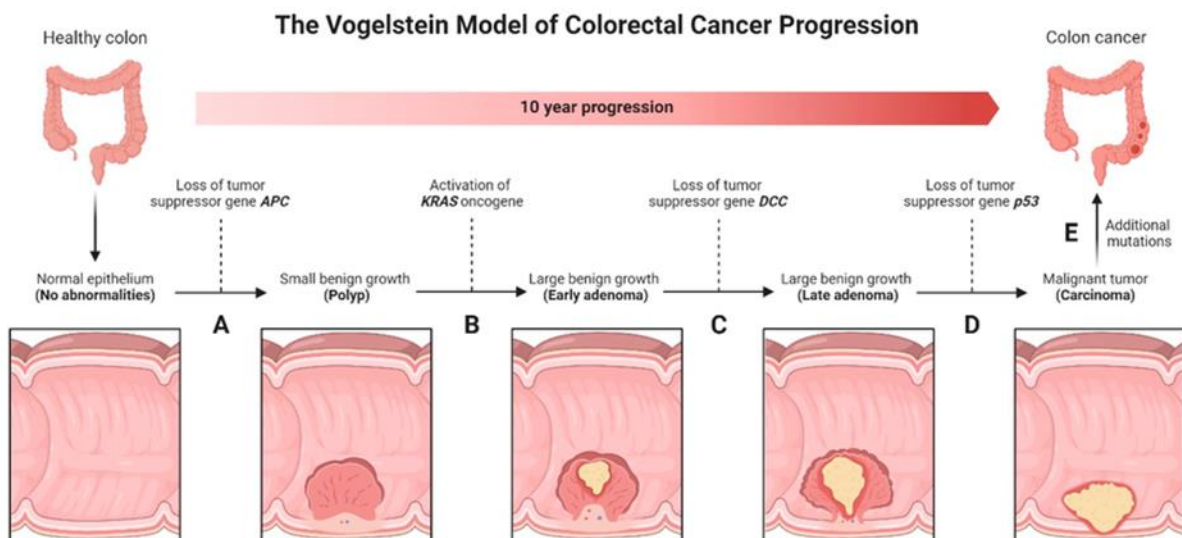


Figura 1: Progresión del adenocarcinoma de colon. Durante la generación del carcinoma de colon, suelen existir mutaciones clásicas como las que ocurren en el gen APC, que llevarían a la aparición de un adenoma tubular o vellosos, que puede progresar, por a otras mutaciones como las del gen KRAS o TP53, a un carcinoma in situ y finalmente a invasor. Modificado de: (Cotran., Robbins., Kumar, 2010).

El subtipo CMS2, el más frecuente, ejemplifica la secuencia adenoma–carcinoma, con mutaciones iniciales en APC seguidas por alteraciones en KRAS y TP53. Este proceso histopatológico progresa desde el adenoma de bajo grado hasta el adenocarcinoma invasivo (Hong et al., 2021).

En términos terapéuticos, las estrategias de tratamiento del CCR se determinan según el estadio clínico. Los estadios iniciales se tratan mediante cirugía y radioterapia, mientras que los casos avanzados requieren quimioterapia sistémica, inmunoterapia o terapias dirigidas. **En Chile, los esquemas más utilizados son combinaciones basadas en 5-fluorouracilo (5-FU), oxaliplatino e irinotecán, como el protocolo FOLFOXIRI, considerado de primera línea para enfermedad metastásica.** Este esquema combina agentes citotóxicos que inducen apoptosis tumoral y mejora significativamente la supervivencia global frente a regímenes dobles (DIPRECE et al., 2019, Alfaro et al., 2022).

A pesar de los importantes avances en la comprensión genética y molecular del cáncer colorrectal, muchos de los rasgos que impulsan su progresión no pueden explicarse únicamente por las mutaciones clásicas o por los subtipos moleculares establecidos. **En particular, la creciente evidencia indica que, además de las alteraciones genómicas, los tumores de CCR dependen de cambios profundos en su metabolismo para sostener su crecimiento, evadir el estrés y enfrentar la presión terapéutica** (Vande Voorde et al., 2023).

De hecho, varios de los subtipos moleculares del CCR, especialmente el CMS3, de carácter marcadamente metabólico, ponen de manifiesto que la biología del tumor no puede desvincularse de su reprogramación metabólica. **Este componente funcional no solo complementa la información genómica, sino que aporta una dimensión adicional que resulta clave para comprender por qué los tumores colorrectales proliferan, progresan y adquieren resistencia a los tratamientos** (Torang et al., 2025).

Reprogramación metabólica del cáncer

La reprogramación metabólica constituye una de las características distintivas del cáncer y representa una adaptación fundamental que permite a las células tumorales sostener la elevada demanda de energía y biomoléculas necesarias para su crecimiento y proliferación descontrolada. Este fenómeno implica una reestructuración de las rutas metabólicas, orientando el metabolismo celular hacia la producción de precursores biosintéticos, la generación de poder reductor y la

generación de energía. Entre las múltiples adaptaciones descritas, uno de los principales cambios metabólicos es el denominado *efecto Warburg* o glucólisis aeróbica (Nong et al., 2023).

En condiciones normales, las células incorporan glucosa, la cual es metabolizada en la glicólisis y el metabolismo mitocondrial para la producción de ATP. Sin embargo, las células cancerosas privilegian la conversión de glucosa en lactato por sobre la oxidación completa en metabolismo mitocondrial (Warburg 1925). Esta aparente ineficiencia bioenergética, constituye una ventaja adaptativa, ya que permite la redirección del flujo de glucosa hacia otras ramas metabólicas, como la vía de las pentosas y la vía de las serinas, las cuales son esenciales para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, lípidos, así como poder reductor.

De esta manera, el *efecto Warburg* no solo refleja una alteración en el metabolismo energético, sino también un cambio integral en la función metabólica de la célula tumoral, orientada a satisfacer los requerimientos biosintéticos y redox asociados con la proliferación acelerada. En este contexto, la desviación de intermediarios glucolíticos hacia rutas anabólicas adquiere un papel central (Jin & Zhou 2019), entre ellas, **la vía de las pentosas fosfato (PPP), que se constituye como un eje metabólico esencial para sostener el crecimiento tumoral**. A través de esta ruta, las células cancerosas generan NADPH, necesario para el mantenimiento del equilibrio redox y la síntesis de lípidos, así como ribosa-5-fosfato, precursor indispensable para la biosíntesis de nucleótidos (Patra et al., 2014).

Además, se ha propuesto que esta reprogramación metabólica confiere ventajas adicionales, tales como una mayor tolerancia al estrés oxidativo, una mayor capacidad de adaptación al microambiente tumoral hipóxico y una contribución a la resistencia frente a tratamientos quimioterapéuticos. En conjunto, estos elementos posicionan a la reprogramación metabólica, y particularmente a la activación de la vía de las pentosas fosfato, como un componente central de la biología del cáncer y un potencial blanco terapéutico de alto interés.

Vía de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas fosfato (PPP) es una ruta metabólica citoplasmática estrechamente vinculada a la glucólisis y esencial para sostener la homeostasis redox y la biosíntesis en células proliferativas. Produce dos metabolitos clave: **NADPH**, indispensable para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la síntesis de lípidos, y **ribosa 5-fosfato**, requerida para la biogénesis de nucleótidos y, por ende, para la replicación del ADN y la proliferación celular (Patra et al., 2014).

La PPP se organiza en dos ramas funcionales: la **oxidativa** (oxPPP) y la **no oxidativa** (non-oxPPP) (**Fig. 2**). La rama oxidativa comprende reacciones irreversibles que convierten glucosa 6-fosfato (G6P) en ribulosa 5-fosfato y generan NADPH. Esta fase está controlada principalmente por **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)**, la enzima limitante de la vía, **cuyo aumento de actividad se ha observado frecuentemente en tumores debido a su rol en el mantenimiento del glutatión reducido y la protección frente al estrés oxidativo**. La **6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD)** completa esta fase contribuyendo adicionalmente a la producción de ribulosa 5-fosfato y NADPH (Stincone et al., 2015).

La rama no oxidativa consta de reacciones reversibles que permiten interconvertir intermediarios glucolíticos y azúcares fosfato. Esta flexibilidad metabólica permite a las células cancerosas redirigir el flujo de carbono según sus necesidades biosintéticas o energéticas, **favoreciendo la síntesis de nucleótidos o el retorno de intermediarios a la glucólisis para sustentar el crecimiento celular** (Stincone et al 2015).

En cáncer, la PPP adquiere un rol estratégico al proporcionar simultáneamente poder reductor y precursores anabólicos. Su activación constituye un mecanismo central para amortiguar el estrés oxidativo derivado de la alta carga proliferativa, lo que facilita la supervivencia tumoral y contribuye a la resistencia terapéutica. Además, el NADPH derivado de la oxPPP puede ejercer funciones duales: **antioxidantes**, protegiendo a la célula tumoral del daño oxidativo, o **pro-oxidantes**, participando en señalización intracelular que potencia la proliferación, la remodelación del microambiente tumoral y la migración celular. (Britt et al., 2022)

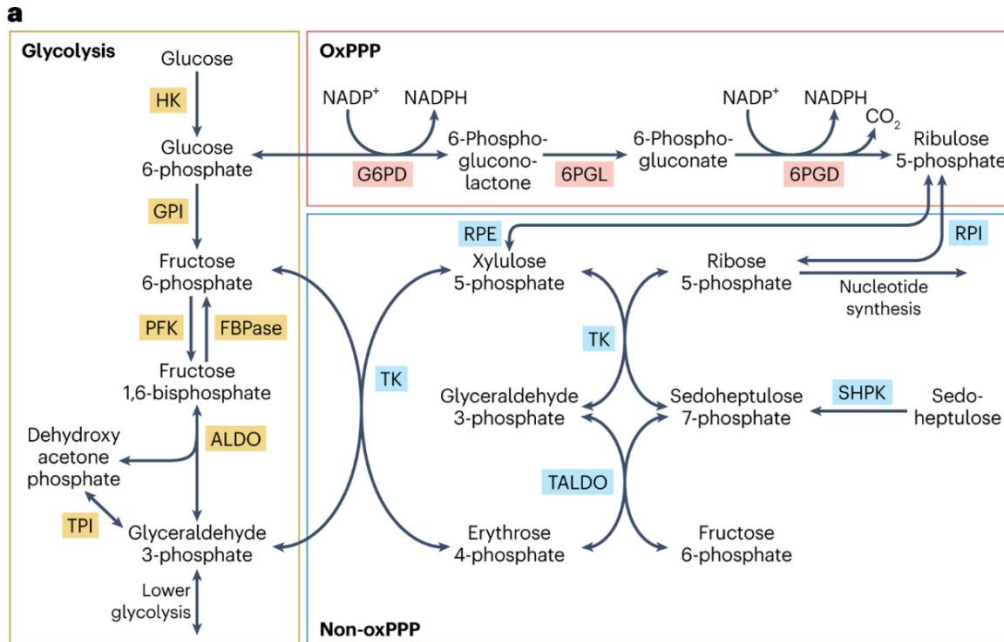


Figura 2: Vía de las pentosas fosfato. Mediada en primera instancia por G6PD, la rama oxidativa de la vía PPP permite la generación de NADPH, importante para la biosíntesis reductiva, así como la regeneración de GSH, un fundamental antioxidante intracelular. Al mismo tiempo favorece la síntesis de nucleótidos para ARN y ADN. G6PD: glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. GSH: Glutación reducido; GSSH: Glutación oxidado.

Dada la importancia de la PPP en sostener la plasticidad metabólica del cáncer, esclarecer los mecanismos que regulan su actividad resulta clave para entender cómo los tumores mantienen su crecimiento y capacidad adaptativa. En este contexto, **G6PD**, responsable de catalizar el paso limitante de la fase oxidativa de la PPP, emerge como un nodo metabólico crucial. Comprender los mecanismos que controlan su expresión y actividad resulta fundamental, ya que G6PD no solo determina la magnitud del flujo a través de la PPP, sino que también modula la capacidad antioxidante y anabólica de la célula tumoral. Así, descifrar las vías que regulan a G6PD podría abrir nuevas oportunidades terapéuticas, permitiendo interferir selectivamente con la homeostasis redox y el metabolismo de las células cancerosas (Aurora et al., 2022)

Regulación de G6PD

Debido a que la actividad de G6PD determina la redirección de la glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato (PPP), y considerando la relevancia de esta ruta metabólica para la proliferación y supervivencia de células cancerosas, se ha evaluado el uso de inhibidores de G6PD como estrategia terapéutica en cáncer. Sin embargo, la inhibición de G6PD en pacientes puede desencadenar cuadros agudos de anemia hemolítica. **Por ello, en los últimos años se ha propuesto investigar los**

mecanismos que regulan su expresión, con el fin de identificar nuevos blancos terapéuticos que permitan inhibir la actividad de G6PD de manera segura para los pacientes (Pamba et al., 2012).

En este contexto, G6PD es una enzima finamente regulada a través de mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales (**Fig. 3**), estos diversos mecanismos aseguran una respuesta adecuada frente a las demandas metabólicas y oxidativas de la célula. Debido a esto, comprender como la expresión y actividad de G6PD es regulada es esencial para entender el papel de la PPP en cáncer y otras patologías.

- **Regulación transcripcional**

A nivel transcripcional, G6PD es regulada por distintos factores de transcripción que responden a estímulos de estrés oxidativo y señales metabólicas. Entre estos mecanismos, **Nrf2** actúa como un regulador central, ya que su activación, inducida por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), promueve la disociación de su interacción con **KEAP1** (Kelch-like ECH-associated protein 1), proteína que lo secuestra en el citosol. Esta liberación permite la translocación nuclear de Nrf2 y la inducción de un programa transcripcional antioxidante, que incluye genes clave como **G6PD** (Mitsuishi et al., 2012). Este proceso favorece la generación de NADPH, necesaria para mantener el equilibrio redox celular y la detoxificación de ROS. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que Nrf2 no regula de forma directa la expresión de G6PD. Se ha observado que Nrf2 promueve la expresión del factor de transcripción TAp73, el cual estimula la transcripción de G6PD. En concordancia, el silenciamiento de TAp73 reduce significativamente el incremento en la expresión de G6PD bajo condiciones de estrés oxidativo, en las que Nrf2 se encuentra activado (Zhang et al., 2022). Estos hallazgos indican que Nrf2 podría modular la expresión de G6PD a través de TAp73, aunque se requieren estudios adicionales para confirmar una regulación directa por parte de este factor.

Además, otros factores de transcripción, como c-Myc y NF-κB, también participan en la regulación de G6PD. c-Myc, frecuentemente sobreexpresado en diversos tipos de cáncer, incluido el colorrectal, promueve la activación de la vía de las pentosas fosfato (PPP) mediante la regulación positiva de G6PD, contribuyendo al aumento de la biosíntesis lipídica (Prieto et al., 2021).

Regulación postranscripcional

El gen G6PD está compuesto por 13 exones y 12 intrones, y su regulación postranscripcional ha emergido como un mecanismo relevante para el control de sus niveles de expresión. En distintos contextos celulares se ha observado que los aumentos en la cantidad de proteína G6PD pueden

producirse incluso en ausencia de cambios detectables a nivel transcripcional, lo que sugiere la participación de mecanismos adicionales, como la regulación del procesamiento del pre-mRNA.

Estudios previos han descrito que la expresión de G6PD puede ser modulada por variaciones en la velocidad o eficiencia del empalme. En particular, el exón 12 de G6PD contiene un elemento de silenciamiento del empalme (ESS, por sus siglas en inglés), reconocido por distintos factores de unión al RNA, incluyendo proteínas de las familias hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) y SRSFs (serine/arginine-rich splicing factors) (Griffith et al., 2006). Dentro de estos factores, hnRNPK ha sido identificado como un regulador clave del procesamiento del pre-mRNA de G6PD. Este factor reconoce la secuencia ESS presente en el exón 12, lo que inhibe la remoción de los intrones 11 y 12, resultando en una represión del procesamiento adecuado del transcrito y, en consecuencia, una disminución en la expresión de G6PD. De manera opuesta, el factor de empalme SRSF3 compite por el mismo sitio de unión reconocido por hnRNPK, promoviendo la maduración del pre-mRNA y, por tanto, aumentando la expresión de G6PD (Cyphert et al., 2013).

Además de hnRNPK, otros miembros de la familia hnRNP, como hnRNPI, hnRNPL y hnRNPA2/B1— también han sido reportados como proteínas capaces de interactuar con el mismo elemento regulador en el exón 12. No obstante, su contribución funcional específica en la modulación del empalme de G6PD aún no ha sido caracterizada en detalle, lo que representa un aspecto pendiente para futuras investigaciones (Griffith et al., 2016).

- **Regulación post traduccional**

G6PD es una enzima de aproximadamente 59 kDa, compuesta por 515 aminoácidos. Al igual que otras enzimas metabólicas, G6PD requiere oligomerizarse para adquirir su conformación funcional. Se ha descrito que tanto la forma dimérica como la tetramérica representan los estados catalíticamente activos de la enzima. Estos niveles superiores de organización estructural permiten una regulación dinámica y reversible de su actividad, facilitando la rápida adaptación de la célula frente a las variaciones en la demanda de NADPH y ribosa-5-fosfato (Liang et al., 2013).

Entre los mecanismos de regulación postraduccional descritos, la fosforilación es uno de los más ampliamente caracterizados. En este contexto, CDK5 fosforila a G6PD en la treonina 91, promoviendo su actividad enzimática. De manera consistente, la inhibición farmacológica de CDK5 reduce la dimerización de G6PD, lo que se traduce en una disminución de su actividad, fenómeno observado particularmente en modelos de cáncer de mama (Bei et al., 2025). Asimismo, durante la

progresión del ciclo celular, la quinasa Plk1 fosforila a G6PD en los residuos serina 406 y serina 466, incrementando su actividad enzimática. Esta activación es necesaria para sostener los efectos proliferativos mediados por Plk1 en células de cáncer cervicouterino (Ma et al., 2017). Más recientemente, se ha demostrado que CK2 fosforila a G6PD en la treonina 145 bajo condiciones de estrés por radiación ionizante, lo que resulta en un aumento de los niveles de NADPH y una mejora en la capacidad celular para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por el tratamiento (Hao et al., 2023).

Además de la fosforilación, la acetilación también constituye un importante mecanismo de regulación de G6PD. La acetiltransferasa KAT9 media la acetilación de la lisina 403, lo que interfiere con la dimerización de la enzima y reduce su actividad catalítica. En contraste, la desacetilasa Sirt2 elimina dicha modificación, restaurando la capacidad de G6PD para oligomerizarse y recuperar su función (Wang et al., 2014).

Por otra parte, investigaciones recientes han identificado la lactilación como un nuevo tipo de modificación postraduccional relevante en la regulación de G6PD. Inicialmente descrita en histonas, esta modificación se ha reconocido ahora como un proceso más general que afecta a diversas proteínas citosólicas. De forma interesante, aunque la glucólisis y la PPP suelen considerarse rutas metabólicas competitivas, se ha demostrado que el lactato generado durante la glucólisis puede inducir la lactilación de G6PD, promoviendo su dimerización y aumentando su actividad enzimática. Este mecanismo favorece la proliferación tumoral, tal como se ha observado en modelos de cáncer pulmonar, donde la activación de G6PD mediada por lactilación contribuye a la proliferación y migración celular (Zhang et al., 2025).

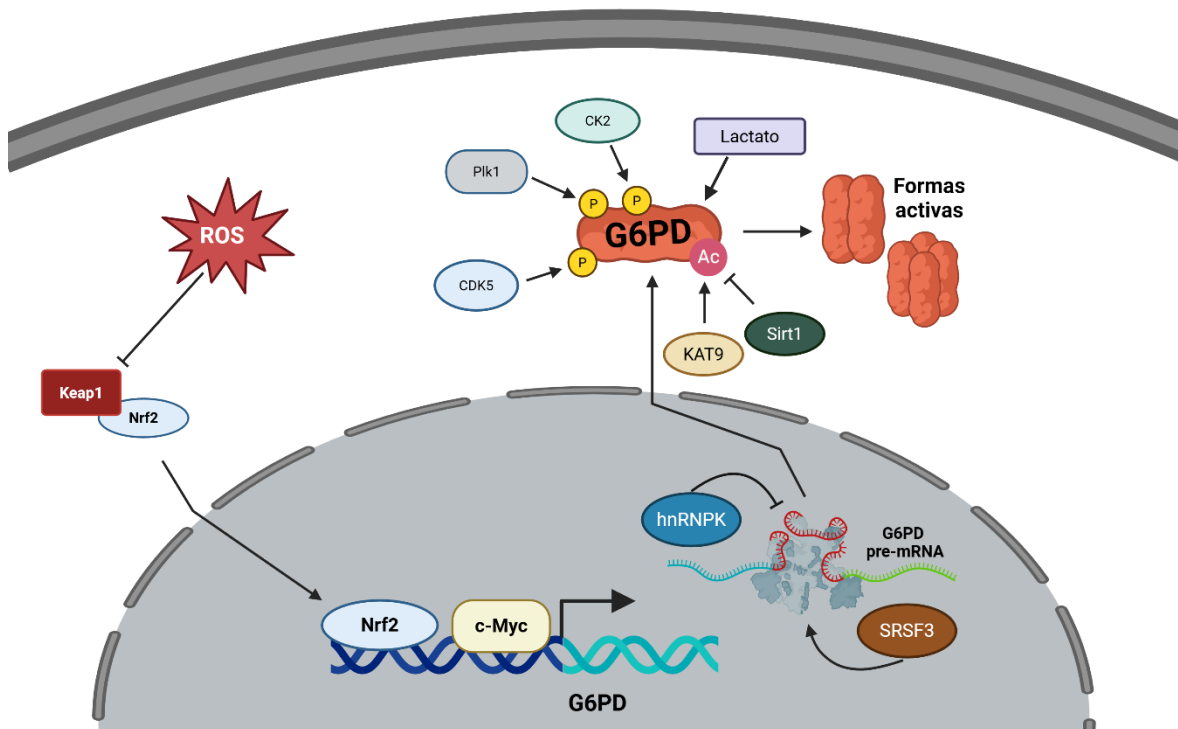


Figura 3. Mecanismos moleculares involucrado en la regulación de G6PD. Resumen de los mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales que regulan la expresión y actividad de G6PD, incluyendo la activación mediada por Nrf2/c-Myc, el procesamiento del pre-mRNA por hnRNPK y SRSF3, y la modulación postraduccionales por fosforilación, acetilación y señales metabólicas.

En resumen, comprender los mecanismos que regulan la expresión y actividad de G6PD es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer y otras patologías asociadas al estrés oxidativo. **Dado que G6PD controla la producción de NADPH, esencial para el mantenimiento del equilibrio redox y la biosíntesis anabólica, su desregulación favorece la supervivencia y proliferación de células tumorales.** En este contexto, la regulación del splicing emerge como un nivel de control crítico que puede modular la expresión de G6PD. Factores como hnRNPK, SRSF3 y otras proteínas de unión a RNA desempeñan un papel central en este proceso, determinando la proporción de transcritos maduros y, por ende, la cantidad de enzima activa. Por lo tanto, entender mecanismos que regulan la actividad de estos factores será crucial para la generación de nuevas estrategias terapéuticas a futuro.

hnRNPK en cáncer y su rol sobre el metabolismo celular

El factor de empalme hnRNPk es una proteína ampliamente expresada en distintos tipos celulares y tejidos, cuya localización es predominantemente nuclear, aunque también se ha detectado en el citoplasma y mitocondrias, lo que refleja su versatilidad funcional (Gallardo et al., 2016). Desde el punto de vista estructural, hnRNPk contiene tres dominios KH (K-homology), los cuales son esenciales para su interacción tanto con RNA como con DNA. Se ha descrito que la unión de hnRNPk a un transcrito específico depende principalmente de uno de estos dominios, mientras que los dominios restantes contribuyen a estabilizar la interacción proteína-ácido nucleico, asegurando la correcta ejecución de sus funciones regulatorias. Además, hnRNPk posee un dominio KI (K-interaction), indispensable para su asociación con otras proteínas, lo que amplía su rango de interacciones y funciones celulares (Le et al., 2025).

Esta diversidad estructural confiere a hnRNPk la capacidad de participar en múltiples procesos biológicos, incluyendo la regulación de la proliferación celular, el metabolismo, la traducción y la migración, entre otros (Wang et al., 2020). Sin embargo, su rol en cáncer continúa siendo objeto de debate, dado que distintos estudios han reportado funciones opuestas, posicionándola tanto como supresor tumoral como oncogén. En el caso particular del cáncer colorrectal, el silenciamiento de hnRNPk promueve la proliferación y migración celular, lo que sugiere una posible función supresora (Li et al., 2022). No obstante, análisis comparativos de expresión demuestran que hnRNPk se encuentra sobreexpresada en tejidos tumorales en relación con los no malignos (Carpenter et al., 2006). **Esta dicotomía entre niveles de expresión y función biológica sugiere la existencia de mecanismos de regulación postraduccionales o contextuales que podrían modular selectivamente sus funciones supresoras o pro-oncogénicas, dependiendo del entorno celular y del estado metabólico de la célula.**

Aunque su participación en la proliferación celular ha sido ampliamente estudiada, en los últimos años ha cobrado creciente relevancia el papel de hnRNPk como regulador del metabolismo. Además de su función en la vía de las pentosas fosfato (PPP), donde actúa como represor del empalme del pre-mRNA de G6PD (Griffith et al., 2006), limitando su procesamiento y expresión, hnRNPk también participa en la regulación del metabolismo glucolítico. Modelos murinos con delección completa de hnRNPk (hnRNPk^{-/-}) presentan una hiperactivación de la glucólisis en tejido óseo, acompañada de enanismo. Mecánicamente, hnRNPk interacciona con la región 3'UTR del mRNA de HIF-1 α , reduciendo su estabilidad y, por ende, su expresión. En consecuencia, la pérdida de hnRNPk provoca un aumento en los niveles de HIF-1 α y la activación de genes glucolíticos, esta hiperactivación del

metabolismo finalmente causa una diferenciación prematura de los condrocitos, llevando finalmente a la malformación de las extremidades en ratones (Chen et al., 2022).

A nivel hepático, la pérdida de hnRNPK se asocia con una reducción en la síntesis lipídica y una disminución de la esteatosis hepática en modelos murinos de obesidad. Este efecto se atribuye a la represión del factor de transcripción PPAR α , el cual regula genes involucrados en la oxidación y acumulación de lípidos (Zhang et al., 2025). En contraste, en un contexto de disfunción cardíaca inducida por doxorubicina, hnRNPK ejerce un efecto protector al promover la expresión de PPAR α , evitando la desregulación metabólica característica de este tratamiento (Xu et al., 2025). Estas observaciones evidencian que la función de hnRNPK es altamente dependiente del contexto celular y fisiopatológico, pudiendo alternar entre roles protectores u oncogénicos según las condiciones metabólicas y el tipo de tejido.

Por otra parte, a nivel mitocondrial, hnRNPK participa en el control del empalme alternativo de la proteína mitorribosomal MRPL33, promoviendo la inclusión del exón 3 alternativo y la formación de la isoforma larga (MRPL33-L). La pérdida de esta isoforma se asocia con disminución de la función mitocondrial y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de cáncer colorrectal, destacando así un papel relevante de hnRNPK en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y el equilibrio redox (Liu et al., 2018).

Considerando la amplia gama de funciones atribuidas a hnRNPK en la regulación del metabolismo, la expresión génica y la respuesta al estrés celular, resulta esencial comprender los mecanismos que controlan su propia regulación. La localización subcelular, las modificaciones postraduccionales y las interacciones con otros factores de empalme o transcripción podrían determinar si hnRNPK ejerce un rol supresor o pro-oncogénico, dependiendo del contexto fisiológico y del tipo tumoral. En este sentido, el estudio de los mecanismos que modulan la actividad, estabilidad y distribución intracelular de hnRNPK se perfila como un aspecto clave para esclarecer su función en cáncer. Profundizar en estos procesos permitiría no solo entender cómo esta proteína integra señales metabólicas y de estrés, sino también identificar nuevas vulnerabilidades terapéuticas, particularmente en tumores donde hnRNPK regula vías críticas como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y la función mitocondrial.

Regulación post traduccional de hnRNPK

Diversas modificaciones postraduccionales (MPT) regulan de manera precisa la estabilidad, localización subcelular y afinidad de hnRNP por sus blancos de ARN (**Fig. 4**), influyendo directamente en su función en el cáncer. Entre la amplia gama de MPT, la fosforilación se posiciona como uno de los mecanismos de regulación más estudiados para hnRNP. Estructuralmente, esta proteína posee 72 residuos potenciales de fosforilación (31 serinas, 24 treoninas y 17 tirosinas); sin embargo, solo una fracción de ellos ha sido validada experimentalmente (Xu et al., 2019).

Entre las principales proteínas que fosforilan a hnRNP se encuentran las quinasas de la vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). Dentro de ellas, JNK (c-Jun N-terminal kinases) y ERK (extracellular signal-regulated kinases) median la fosforilación de hnRNP en los residuos 116, 189, 216, 284 y 353. Particularmente, la fosforilación en Ser284 y Ser353, mediada por ERK, es la más caracterizada (Habelhah et al., 2001). En diversos contextos, esta modificación promueve la acumulación citoplasmática de hnRNP, disminuyendo su interacción con blancos nucleares y, en contraste, potenciando sus funciones citoplasmáticas, principalmente asociadas a la regulación de la traducción. Por lo que, en cáncer, la hiperactivación de ERK podría promover la relocalización citoplasmática de hnRNP, un fenómeno asociado a un fenotipo patológico.

En contraste, la fosforilación mediada por JNK en los residuos Ser189 y Ser216 no altera la distribución subcelular de hnRNP. En neuronas derivadas de *Xenopus*, la fosforilación en Ser189 es necesaria para la regulación del crecimiento axonal; mecanísticamente, esta modificación promueve la asociación de los complejos hnRNP–ARNm con la maquinaria traduccional, para promover la expresión de genes asociado a la regulación de neuritas (Hutchins & Szaro 2013).

Por otro lado, hnRNP también es fosforilada por Aurora-A en el residuo Ser379. Esta fosforilación disminuye la interacción de hnRNP con el factor de transcripción p53 (Hsueh et al., 2011). Dado que hnRNP actúa como cofactor de p53, esta modificación podría atenuar su función; sin embargo, su relevancia biológica aún requiere mayor profundización. Asimismo, la proteína ATM (ataxia telangiectasia mutated) fosforila a hnRNP en cuatro residuos (Ser121, Thr174, Ser370 y Ser440). La fosforilación en estos sitios previene su ubiquitinación y degradación, permitiendo que hnRNP actúe como cofactor de p53 frente al daño en el ADN (Moumen et al., 2013).

Finalmente, la fosforilación en residuos de tirosina también constituye un mecanismo relevante en la regulación de hnRNPk. En este contexto, la quinasa c-Src interactúa y fosforila a hnRNPk en siete residuos tirosina (Tyr72, Tyr225, Tyr230, Tyr234, Tyr236, Tyr380 y Tyr458) (Messias et al., 2006) (Ostareck-Lederer et al., 2002) (Ferrando et al., 2012). La fosforilación en Tyr72 y Tyr458 localizados en los dominios KH1 y cercano al dominio KH3, reduce la interacción de hnRNPk con diversos ARNm (Ostareck-Lederer et al., 2002).

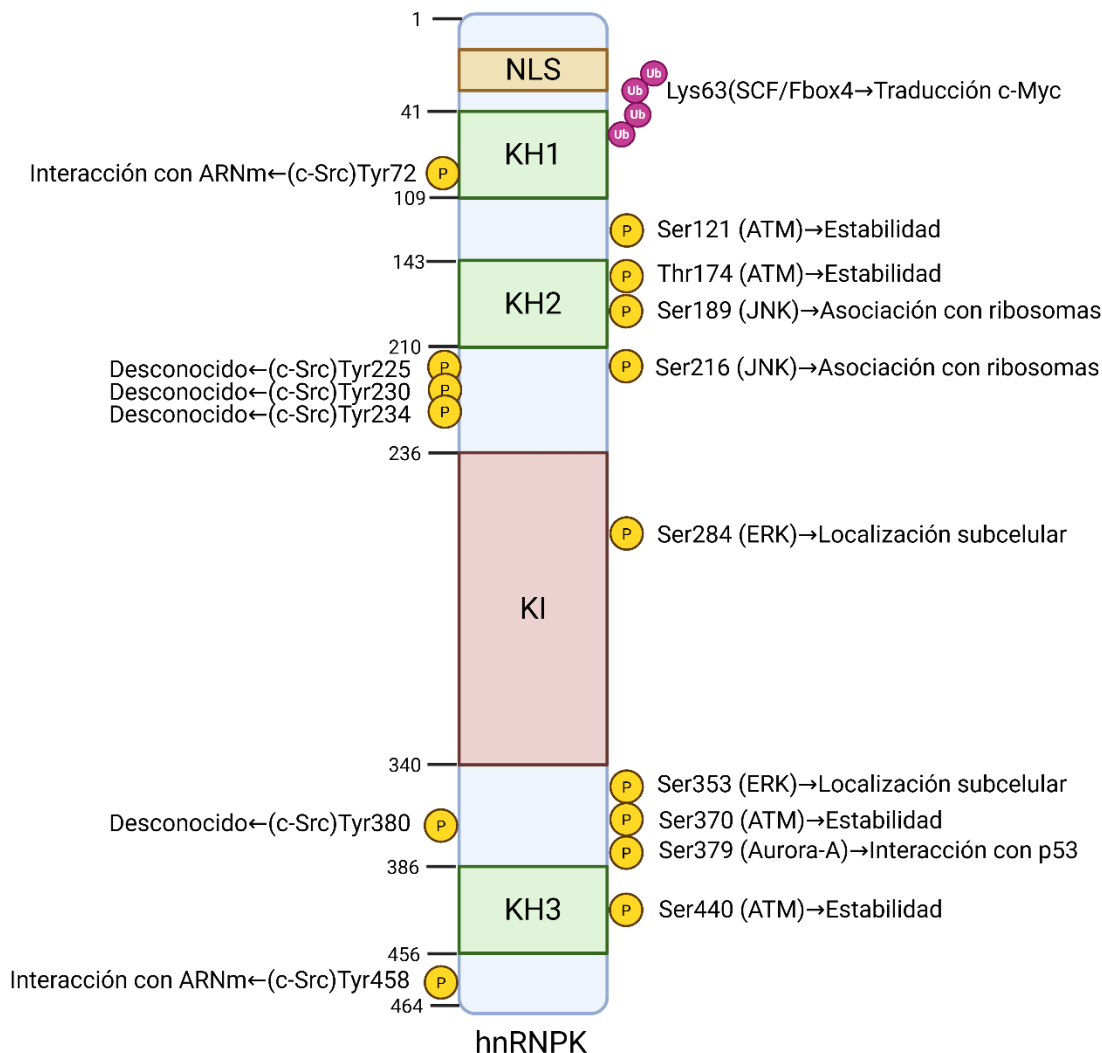


Figura 4. Esquema representativo de las principales modificaciones post-traduccionales de hnRNPk. Los dominios de unión a ácidos nucleicos están representados por las regiones KH1/2/3. KI representa el dominio de interacción con proteínas. NLS representa una secuencia de importe nuclear. Para cada modificación, se informa además el proceso afectado. P=fosforilación, Ub=Ubiquitina.

Aunque la fosforilación es el principal mecanismo de regulación postraduccional descrito para hnRNPK, esta proteína también está sujeta a otras modificaciones. Por ejemplo, la ubiquitinación mediada por el complejo SCF/Fbxo4 (Skp1–Cullin–F-box) induce la adición de ubiquitina en la lisina 63 de hnRNPK a nivel citoplasmático. De manera interesante, esta modificación disminuye la traducción de c-Myc dependiente de hnRNPK, actuando como una barrera que restringe las funciones pro-oncogénicas de la proteína (Mucha et al., 2022).

En conjunto, comprender cómo las diversas modificaciones postraduccionales regulan la función de hnRNPK es esencial para descifrar su papel en la biología del cáncer. Estas modificaciones no solo determinan su localización, estabilidad y capacidad de interacción con otras proteínas, sino que también integran señales metabólicas y de estrés celular que definen su función en contextos tumorales específicos. En este marco, resultados recientes de nuestro laboratorio han identificado a hnRNPK como un posible nuevo interactivo de la quinasa NUA1 (Palma., 2019), una proteína frecuentemente sobreexpresada en distintos tipos de cáncer y con funciones centrales en la regulación del metabolismo y la respuesta al estrés. Esta conexión sugiere que el eje NUA1–hnRNPK podría representar un punto clave de convergencia entre la señalización metabólica y la regulación postraduccional, abriendo nuevas perspectivas para comprender cómo NUA1 puede influir en la biología tumoral a través del control de hnRNPK.

NUAK1

NUAK1, también denominada ARK5 (AMPK-related kinase 5), es una quinasa de serina/treonina de aproximadamente 75 kDa perteneciente a la familia de proteínas relacionadas con AMPK (ARKs), con las cuales comparte un dominio quinasa altamente conservado (Jaleel et al., 2006). NUA1 se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, donde su elevada expresión se asocia a un peor pronóstico y una menor supervivencia en los pacientes. Estudios previos han demostrado que, en el contexto tumoral, NUA1 promueve la proliferación y supervivencia celular, así como la migración e invasión, aunque también se ha propuesto un rol esencial en la regulación del metabolismo celular (Chang et al., 2012) (Cui et al., 2013) (Lu et al., 2013).

En células de cáncer de mama, la inhibición de NUA1 induce una marcada fragmentación mitocondrial, generando estructuras tipo “dona”, lo que sugiere que esta quinasa es necesaria para mantener la morfología y función mitocondrial adecuadas (Escalona et al., 2020). De manera consistente, estudios realizados en neuronas NUA1^{-/-} mostraron que la pérdida de esta quinasa reduce la capacidad respiratoria máxima mitocondrial (medida por OCR), sin afectar

significativamente la acidificación extracelular del medio. Este hallazgo indica que la pérdida de NUA1 no compromete la liberación de lactato ni la actividad glucolítica neuronal (Lafranchi et al., 2024).

Por otra parte, investigaciones en cáncer de mama y pulmón demostraron que la inhibición de NUA1/2 reduce de manera significativa la expresión de proteínas asociadas a la glucólisis y a la vía de las pentosas fosfato (PPP), a través de la regulación de mTORC1. Sin embargo, estos mismos estudios revelaron que la pérdida de NUA1 en células tratadas con rapamicina (inhibidor de mTORC1) provoca una disminución aún mayor de la actividad metabólica, y que la pérdida simultánea de NUA1 y NUA2 ejerce un efecto más drástico que la inhibición de mTORC1 por sí sola (Babu & Manoharan., 2025) (Raj & Manoharan., 2025). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos adicionales e independientes de mTORC1 mediante los cuales NUA1 podría modular el metabolismo celular.

De manera interesante, al igual que otras ARKs, NUA1 presenta una distribución tanto citoplasmática como nuclear, dependiendo del contexto celular (Palma et al., 2019), lo que apunta a una notable versatilidad funcional. En el citoplasma, se ha descrito que NUA1 es necesaria para la activación del factor antioxidante Nrf2 frente a estímulos de estrés oxidativo (H_2O_2) en células de osteosarcoma (Port et al., 2018). Además, se ha demostrado que NUA1 fosforila a AKT en la serina 473, una modificación esencial para la completa activación de esta quinasa (Palma et al., 2023). No obstante, más allá de sus funciones citoplasmáticas, NUA1 también presenta una fuerte localización nuclear en neuronas, células de osteosarcoma y cáncer colorrectal, donde parece cumplir roles poco explorados. En este contexto, se ha demostrado que NUA1 fosforila a la subunidad regulatoria PNUTS de la fosfatasa PP1B, promoviendo la actividad del espliceosoma (Cossa et al., 2020). Asimismo, datos aún no publicados de estudios en neuronas indican que NUA1 fosforila al factor de andamiaje SON, un componente principal de los nuclear speckles, organelos no membranosos formados por separación de fases que participan en la regulación de la expresión génica mediante la concentración de factores de transcripción, proteínas de empalme y ARN polimerasas. De forma concordante, la pérdida de NUA1 altera el empalme alternativo de múltiples genes involucrados en la regulación del metabolismo neuronal (Kherkoffs et al., 2025).

Estos antecedentes respaldan la hipótesis de que NUA1, a nivel nuclear, podría participar en mecanismos aún no caracterizados con impacto directo sobre el metabolismo tumoral. En nuestro laboratorio, mediante ensayos de MudPIT, identificamos el interactoma de NUA1, revelando una

amplia red de interacciones con proteínas implicadas en la regulación del empalme (Palma., 2019). Entre ellas, destaca hnRNPK, debido a que regula la expresión de G6PD y, en consecuencia, la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP). **En concordancia, estudios en cáncer pancreático demostraron que la pérdida de NUA1 reduce significativamente los niveles de 6-fosfogluconato**, un metabolito generado en la rama oxidativa de la PPP (Liu et al., 2012). Por otro lado, análisis bioinformáticos muestran que hnRNPK contiene múltiples sitios potenciales de fosforilación dependientes de NUA1 (**Fig. 5**), los que podrían ser necesarios para su interacción con sus blancos de ARN, sugiriendo que NUA1 podría modular la función de hnRNPK a través de fosforilación directa, estableciendo así un eje funcional de relevancia en el metabolismo y la progresión tumoral.

ID	Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff	Source	Logo
sp P61978 HNRPK_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	89	S	CAMK	SGPERILSISADIET	2.942	1.956	Pred.	
sp P61978 HNRPK_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	302	S	CAMK	GRGGRGSSRARNLPL	3.551	1.956	Pred.	

Kinase	Gene Name	Kinase Family	Log ₂ (Score)	Score Rank	Site Percentile
NUAK1	NUAK1	CAMK	1.0902	28	92.36
Kinase	Gene Name	Kinase Family	Log ₂ (Score)	Score Rank	Site Percentile
NUAK2	NUAK2	CAMK	2.7256	65	97.14
NUAK1	NUAK1	CAMK	1.0025	142	91.95

Thr174

Ser302

sp Q3T0D0 HNRPK_BOVIN	SSGPERIISISADLETICEIILKKIIPPTLEEGQLPSPATTSQ
sp P61978 HNRPK_HUMAN	SSGPERIISISADLETICEIILKKIIPPTLEEGQLPSPATTSQ
sp P61979 HNRPK_MOUSE	SSGPERIISISADLETICEIILKKIIPPTLEEGQLPSPATTSQ
sp P61980 HNRPK_RAT	SSGPERIISISADLETICEIILKKIIPPTLEEGQLPSPATTSQ
sp O19049 HNRPK_RABBIT	SSGPERIISISADLETICEIILKKIIPPTLEEGQLPSPATTSQ

Figura 5. hnRNPK presenta potenciales sitios de fosforilación dependientes de NUA1. A. Predicción de potenciales sitios de fosforilación dependientes de NUA1 generado en GPS webserver. **B.** Análisis de predicción de fosforilación generado a través de Phosphosite Plus. **C.** Alineamiento estructural de hnRNPK, en rojo se destaca la serina 302, la cual se encuentra altamente conservada entre especies.

Dado los siguientes antecedentes:

- NUA1 se asocia al metabolismo de la glicólisis y la vía de las pentosas fosfato.
- NUA1 regula la generación de metabolitos de la PPP.
- NUA1 presenta una distribución nuclear en cáncer colorrectal.
- hnRNP podría ser un nuevo interactante de NUA1.
- hnRNP regula negativamente el empalme del pre-mRNA de G6PD.
- Existen posibles residuos de fosforilación en hnRNP dependientes de NUA1.

Se propone la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo:

Hipótesis

“NUA1 interacta con hnRNP y la fosforila, inhibiendo su asociación con ARNm de genes metabólicos como G6PD y regulando así el metabolismo celular y la homeostasis redox en el cáncer colorrectal.

Objetivo general:

Determinar el efecto del eje NUA1/hnRNP sobre el metabolismo del cáncer colorrectal.

Objetivos específicos

1. Determinar si NUA1 interacta con hnRNP y regula su fosforilación.
2. Evaluar el efecto de NUA1 sobre la asociación de hnRNP con ARNm de genes metabólicos y su impacto en la regulación del metabolismo y la homeostasis redox en cáncer colorrectal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos: Los inhibidores de proteasa/fosfatasa, la D-ribose 5 fosfato (R7750), yoduro de propidio fueron adquiridos en Sigma (*St. Louis, MO, USA*). Para la transfección fue usada Lipofectamina 2000 de *Invitrogen (Carlsbad, CA)* y PEIMAX 40000 de polysciences. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fueron: ARK5 (CS4458S), ARK5 (E4T2A), Myc Tag (9C11), G6PD (D5D2) de *Cell Signalling (Danvers, MA)*. GAPDH (6C5), HDAC1 (C-19), B-actin (C4), Transketolase (H-7), hnRNPK (D-6), MYPT1 (C-6) de *Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)*. Importin-9 (NBP1-39726) de *Novus Biologicals (Littleton, CO)*. FLAG (M2) y HA (clone 7) de Sigma (*St. Louis, MO, USA*). HnRNPK (1-280) STJ24065, fue adquirido de St John's laboratory Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*anti-mouse, anti-rabbit y anti-goat*) fueron adquiridos de *BioRad (Hercules, CA)*. Los anticuerpos secundarios usados en las inmunofluorescencias fueron: Anti-rabbit Alexa fluor 488, anti-mouse Alexa 555, Faloidina-Alexa fluor 488 de *Invitrogen (Carlsbad, CA)* y *Hoechst 33342* de *BioRad (Hercules, CA)*, HTH-01-015, Oxaliplatino fueron adquiridos en *Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)*. Puromicina de *Santa Cruz Biotechnology*, Higromicina B1 de Sigma, Polibreno de *Merk Millipore*. El ATP radioactivo, ATP γ -³²P fue obtenido de Perkin Elmer.

Cultivo Celular: Células HCT116 p53^{-/-}, HEK293T y CCD-841 CoN fueron mantenidas en *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* (*Hyclone, Logan, UT, USA*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (*FBS; Hyclone*), 1% de glutamina (*Invitrogen*) y 1% de penicilina/estreptomicina (*Invitrogen*). Células SW480 y HT-29 fueron mantenidas en *Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)* (*Hyclone*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (*FBS; Hyclone*), 1% de glutamina (*Invitrogen*) y 1% de penicilina/estreptomicina (*Invitrogen*). 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)*.

Plásmidos: El plásmido pCMV Flag hNUAK1 fue obtenido a partir del *Medical Research Council Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit (MRC PPU)*. Los plásmidos pDR8.2, pCMV VSV-G, pCDNA 3.1 hnRNPK myc/his, pMIR hnRNPK TS1, pMIR hnRNPK TS3, fueron obtenidos de *Addgene*. Los plásmidos, pCW57-Flag hNUAK1 Tet/on hygro y pGL3 mNUAK1 2000pb, fueron generados previamente en el laboratorio.

Métodos

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

Western Blots: Las proteínas derivadas de los lisados celulares (30-50 µg) fueron separados por SDS-PAGE y luego transferidas por 90 minutos a 100 Volt a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore). Las membranas de PVDF fueron bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente en 5% de leche disuelta en TBS-T (TBS con 0.1% de Tween) e incubadas con la dilución de anticuerpo primario adecuada a 4°C por toda la noche. Después de una serie de lavados (3 en TBS-T) de 5 minutos las membranas fueron incubadas por 1 hora con el anticuerpo secundario. Las proteínas fueron visualizadas al usar ECL (General Electric Healthcare, Amersham, UK) y un fotodocumentador.

Inmunoprecipitación: Las proteínas a inmunoprecipitar fueron obtenidas utilizando el buffer de lisis (25mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA, 1% NP40, 5% Glicerol and 2mM MgCl₂) suplementado con inhibidores de proteasa (1X) y fosfatasa (1X). Los lisados fueron cuantificados y preparados en igual concentración. Luego, fueron preclarados por 1 hora a 4°C utilizando la resina A/G plus de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). La inmunoprecipitación se realizó incubando con los anticuerpos correspondientes por

12-18h horas a 4°C en agitación. Para la inmunoprecipitación de FLAG, se utilizó anti-FLAG M2 de Sigma. Para la inmunoprecipitación de HA fue usado el anticuerpo anti-HA (clon 7) de Sigma. Para la inmunoprecipitación Myc se utilizó el anticuerpo Myc-Tag (9C11), respectivamente. Las coimmunoprecipitaciones fueron analizadas por Western blots utilizando los anticuerpos correspondientes a cada experimento (Co-IP).

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

Generación de modelos celulares estables: Los modelos celulares estables fueron generados utilizando sistemas lentivirales de segunda generación. El protocolo para todos los modelos fue estandarizado en esta tesis y comparte los 3 principales pasos de las infecciones virales. El primero, consiste en el empaquetamiento donde se utilizaron células HEK293T las que fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes. El segundo, la infección, que se realizó 48 posttransfección que corresponde a la primera ronda de infección donde se agregó 8 µg/ml de prolibreno (Merk millipore). Después de 24 horas se realizó la segunda ronda de infección repitiendo los pasos de la primera infección. La tercera etapa correspondió a la selección que se realizó por 4-5 días con el antibiótico correspondiente (puromicina y higromicina). La validación de cada uno de los modelos estables se realizó a través de Western blots con los anticuerpos correspondientes a cada caso.

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 MgCl₂) 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).

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.

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+maduro y otro pool desde ARN maduro.

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. Los datos de expresión fueron normalizados para el gen de β-actina. Algunos sets de partidores requirieron estandarización 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).

Nombre	Secuencia	Orientacion
F_EXON_11 G6PD	TCATCCTGGACGTCTTCTGC	FORWARD
F_INTRON_11 G6PD	AAGCCATACCATGTCCCCTC	FORWARD
R_EXON_12 G6PD	ATAAATATAGGGGATGGGCTTGGGC	REVERSE

F2_INTRON_12 G6PD	ATACCTGTGGGCTATGGGGT	FORWARD
R2_EXON_12 G6PD	GCAGTGGGGTGAAAATACGC	REVERSE
hACTB_F	GATGAGATTGGCATGGCTTT	FORWARD
hACTB_R	CACCTTCACCGTTCCAGTTT	REVERSE
hNUAK1_F	GTTGGGAGGAAGCATGTAAGA	FORWARD
hNUAK1_R	CCAGAGACCAGGAAGTACAAAC	REVERSE

Ensayos de gen reportero de luciferasa: Luego de 24 horas de transfección utilizando el vector pGL3 mNUAK1, que contiene 2008pb de la región río arriba del inicio de la transcripción del promotor murino de NUAK1, las células fueron tratadas con Oxaliplatino (40uM) o agua como control durante 24h. Pasado el tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS pH 7.4. Luego se adicionó buffer de lisis pasivo de luciferasa 1X y se incubó 5min a temperatura ambiente en agitación. Luego, 20µL del lisado se usaron para la medición de actividad de luciferasa o β-galactosidasa, usando el kit Luciferase-Glo® (Promega) o Beta-Glo® (Promega), respectivamente, en placas de 96-well. La medición de luminiscencia se realizó usando el luminómetro TECAN. La actividad de luciferasa de cada pocillo se normalizó usando la actividad de β-galactosidasa del pocillo correspondiente.

Ensayo de quinasa in vitro: Para el ensayo de fosforilación de hnRNPK, la proteína hnRNPK-myc fue expresada en células HEK293T y purificada mediante inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-Myc tag (clon HA-7). La proteína purificada hnRNPK-myc fue desfosforilada a 30 °C durante 30 minutos. Una vez desfosforilada, se realizó el ensayo de quinasa in vitro, en condiciones radiactivas utilizando GST-NUAK1 (500 ng).

Todas las reacciones fueron incubadas a 30 °C durante 60 minutos, empleando el buffer de quinasa radiactivo [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 5 % glicerol, 0.25 mM ATP y 10 µCi de [γ-³²P] ATP]. Finalmente, todas las muestras fueron desnaturalizadas durante 3 minutos a 100 °C y analizadas mediante Western blot o autoradiografía.

Ensayo de interacción in vitro: Para el ensayo de interacción in vitro, la proteína hnRNPK-MYC y NUAK1-Flag fueron expresadas y purificadas a partir de células HEK293T, utilizando un anticuerpo anti-Myc tag o anti-Flag (clone M2), correspondientemente. La proteína NUAK1-flag fue eluida de la resina utilizando péptido 3X-Flag durante 1h a 30°C en carrusel. Luego, ambas proteínas fueron

mezcladas e incubadas en buffer de kinasa in vitro, la resina fue centrifugada y lavada 2 veces con buffer de lavado de inmunoprecipitación. Finalmente, las proteínas fueron desnaturalizadas durante 3min a 100°C y analizadas mediante Western Blot.

Incubación con 1,2-13C2 glucosa: Se sembraron 200.000 células SW480 en placas de 6 pocillos. Luego de 48h, fueron transfectadas usando los vectores pCMV Flag NUA1 y pCMV Flag como control y, 46h después, se removió el medio y se adicionó medio DMEM sin glucosa, suplementado con 1,2-13C2 glucosa a una concentración de 4,5g/L o 4,5g/L de glucosa sin marcar. Las células fueron pulsadas durante 2h antes de realizar la extracción de los metabolitos.

Extracción de metabolitos: Los metabolitos fueron extraídos utilizando un buffer de extracción compuesto por 50% metanol, 30% acetonitrilo y 20% agua a -20°C. Las células SW480 fueron cultivadas en las diferentes condiciones. Luego, el medio de cultivo fue removido y las células fueron lavadas 3 veces con PBS1X frio. Previo a agregar el solvente para la extracción, se utilizó un pocillo control para determinar el número de células por condición, a fin de agregar 1mL de buffer por cada millón de células. Luego de agregar el buffer de extracción, la placa se incubó 5 minutos a 4°C. Los extractos fueron transferidos a un tubo de microcentrífuga y centrifugados a 16.100g durante 10 min a 4°C. Luego el sobrenadante se almacenó en viales de vidrio hasta su análisis por LC-MS.

Para el análisis de metabolitos del medio extracelular, 20uL de medio de cultivo fueron mezclados con 980uL de buffer de extracción. La mezcla fue agitada en termomixer a 4°C a 1400rpm durante 10min. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 16.100g durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes fueron almacenados en viales de vidrio hasta su análisis por LC-MS.

Análisis por LC-MS: Los metabolitos provenientes de extractos biológicos fueron inyectados (5 µl) y separados utilizando una columna ZIC-pHILIC (SeQuant; 150 mm × 2.1 mm, 5 µm; Merck), acoplada a una columna de protección ZIC-pHILIC guard (SeQuant; 20 mm × 2.1 mm; Merck), mediante un sistema Vanquish HPLC (Thermo Fisher Scientific). La separación cromatográfica se realizó mediante un programa en gradiente que empleó las siguientes fases móviles: A = 20 mM carbonato de amonio (pH 9.2, 0.1 % v/v amoníaco, 5 µM InfinityLab deactivator [Agilent]) y B = 100 % acetonitrilo. El gradiente de elución se inició con un 20 % de fase A, mantenido durante dos minutos, seguido de un incremento lineal hasta 80 % de fase A durante 15 minutos, y finalmente una etapa de reequilibrio a 20 % de fase A. El tiempo total de corrida fue de 25 minutos. La columna se mantuvo a 45 °C con un flujo constante de 200 µl min⁻¹.

El sistema HPLC fue acoplado a un espectrómetro de masas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado con ionización por electrospray (ESI), utilizado tanto para el perfilado como para la identificación de metabolitos. Para el análisis de perfilado se empleó el modo de conmutación de polaridad, con una resolución de 70.000 a 200 m/z, permitiendo la detección de iones positivos y negativos en un rango de masas de 75 a 1.000 m/z (objetivo de control de ganancia automática, AGC, de 1×10^6 y un tiempo máximo de inyección, IT, de 250 ms).

Los datos crudos fueron analizados mediante el software Skyline (versión 23.1.0.455) (DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00640). La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de la masa y el tiempo de retención de los picos observados con una biblioteca interna generada a partir de estándares de metabolitos, considerando una tolerancia de masa de 5 ppm y una tolerancia de tiempo de retención de 0,5 minutos.

Ensayo de cierre de herida: Para realizar el ensayo de cierre de herida se sembraron los modelos celulares estables en placas de 12 pocillos. A las 24 horas de cultivo o al alcanzar una confluencia del 100% se procedió a realizar una herida con una punta de pipeta p200. Luego, se realizó el cambio de medio agregando medio DMEM 1% FBS. El porcentaje de cierre de la herida fue calculado a partir del área inicial (al momento de realizar la herida) y a las 16 y 24 horas de incubación.

Medición de los niveles de NADPH: Para medir los niveles de NADPH células HCT116p53-/- y SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 (HTH-01-015) por 24 horas. Luego las células fueron colectadas y se utilizó el kit NADP/NADPH Quantitation Colorimetric Kit #K337 (Biovision), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Medición de los niveles de estrés oxidativo: Para medir los niveles de estrés oxidativo, células HCT116p53-/- y SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 (HTH-01-015) por 24 horas. Luego las células fueron tripzinizadas y tratadas con 500nM de la sonda CellROX DeepRed por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo Cell Sorter BD FACSAria III.

Medición de la actividad de G6PD: Para medir la actividad de G6PD, se utilizaron células HCT116p53-/- y SW480. Se sembraron 300.000 células en placas de 6 pocillos y, 48h después, las células fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 HTH-01-015 durante 24h. Por otro lado, células SW480, además fueron transfectadas con el vector pCMV-Flag hNUA1 WT durante 48h. Luego, para ambos

experimentos, se utilizó el kit G6PD activity kit de proteintech, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medición de lípidos intracelulares: Para la medición del contenido lipídico, células HCT116p53-/- y SW480, fueron sembradas sobre slides de vidrio en placas de 12 pocillos para análisis de microscopia, o sobre placas de cultivo sin slides, para en análisis por citometría de flujo. Brevemente, para los ensayos de microscopia, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 30min y luego incubadas con el reactivo BODIPY-488 (1:500) y hoescht3342 (1:300) como tinción nuclear. Luego las células fueron observadas bajo el microscopio confocal leica SML780.

Para los análisis mediante citometría de flujo, las células fueron tripsinizadas durante 2 min, luego centrifugadas y lavadas 1 vez con PBS1X a 4°C. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en PFA 0,5% y mantenidas a 4°C en el fijante hasta el momento del análisis. Previo a la medición por citometría de flujo, el PFA fue removido y los pellets fueron lavados 2 veces con PBS1X A 4°C. Posterior a estos pasos de lavado, las células fueron resuspendidas en una solución de PBS1X suplementado con LipidSpot610 (1:1000) durante al menos 1h. Finalmente, las células fueron analizadas por citometría de flujo con citómetro de flujo Cell Sorter BD FACSAria III.

Ensayos de ciclo celular: Se sembraron 60.000 células HCT116p53-/- o SW480 en placas de 12 pocillos. Luego de 48h, fueron tratadas con 10uM de HTH-01-015 o 40uM de 6-aminonicotinamida (6AN), con ambas drogas y DMSO como control. Luego de 24h, las células fueron tripsinizadas, lavadas 1vez con PBS1X frio, y luego fueron resuspendidas en etanol 70% y mantenidas a -20°C hasta su análisis por citometría de flujo. Antes de analizar las muestras, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer de tinción (50ug/mL Yoduro de propidio, 3.8mM citrato de sodio, 0.5ug/mL ARNasa, en PBS1X, pH 7.4) e incubadas toda la noche a 4°C. Luego, las muestras fueron analizadas a través de citometría de flujo utilizando el citómetro Cell Sorter BD FACSAria III. Los resultados fueron analizados utilizando software Floreada.

Medición de muerte en tiempo real por IncuCyte: Se sembraron 5000 células HCT116p53-/-, SW480 y HT-29 en placas de 96 pocillos. Luego, fueron tratadas con HTH-01-015 (10uM), Oxaliplatino (20uM) o DMSO como control. La muerte celular fue evaluada mediante el reactivo Sytox Green (1:1000), y el número de células muertas y células totales fueron contados cada 1h durante 72h utilizando el equipo INCUCYTE S3 Live-Cell Analysis System. Los resultados fueron analizados mediante el software Incucyte v2019B, y los datos fueron normalizados en base a la confluencia.

Ensayo cometa: Las células de la línea HCT116p53-/- se cultivaron en medio DMEM y, tras la recolección del pellet, se resuspendieron en PBS estéril (1X) a una concentración entre 4×10^5 y 4×10^6 células/mL. Paralelamente, se prepararon las soluciones de agarosa necesarias: agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1% y 0,5%, y agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0,5%, todas disueltas en PBS y fundidas hasta obtener una solución completamente transparente.

Para la etapa de lisis, se utilizó un buffer stock compuesto por NaCl, EDTA y Tris, ajustado a pH 10 y esterilizado. Previo al uso, se preparó la solución de lisis final agregando 1% Triton X-100 fresco y manteniéndola refrigerada. El buffer de electroforesis se preparó a partir de soluciones concentradas de NaOH y EDTA, ajustando el pH final a ≥ 13 . El buffer de neutralización consistió en Tris 0,4 M ajustado a pH 7,5. La solución de tinción se obtuvo diluyendo GelRed hasta una concentración final 3X.

Para el montaje del ensayo, los portaobjetos y cubreobjetos se lavaron y desengrasaron adecuadamente. Cada portaobjeto se recubrió con 200 μ L de agarosa NMP al 1% y se dejó solidificar a 4°C. Posteriormente, se mezclaron 10 μ L de suspensión celular con agarosa LMP al 0,5% y la mezcla se depositó sobre la primera capa de agarosa, cubriéndose con un cubreobjetos y dejando solidificar nuevamente. Luego, se agregó una tercera capa de agarosa NMP al 0,5% y se repitió el proceso de enfriamiento.

Una vez completado el montaje, los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis durante 24 horas en oscuridad y refrigeración. Tras la lisis, los portaobjetos se colocaron en la cámara de electroforesis sobre hielo y se incubaron 20 minutos en la solución alcalina para permitir el desenrollamiento del ADN. La electroforesis se realizó a 25 V y 300 mA durante 20 minutos a 4°C.

Finalizada la corrida, las muestras se lavaron entre 3 y 5 veces con buffer de neutralización frío y, tras secar los portaobjetos, los geles se tiñeron con 15 μ L de GelRed 3X durante 10-20 minutos en oscuridad. Finalmente, las preparaciones se observaron mediante microscopía de epifluorescencia con filtro rojo ($n^{\circ}3$) y aumento 20X. Las muestras pueden conservarse temporalmente en cámara húmeda hasta su análisis.

Recolección de Tejidos: El reclutamiento de voluntarios se realizó en el Hospital Clínico Regional Dr. Guillermo Grant Benavente (Concepción, Chile). Las muestras de tejido tumoral fueron obtenidas de pacientes previamente diagnosticados con cáncer colorrectal (CCR) durante procedimientos quirúrgicos. Además, se recolectaron biopsias colonoscópicas de tres pacientes con CCR, las cuales

fueron procesadas el mismo día para el establecimiento de cultivos de organoides. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico del Hospital Guillermo Grant Benavente y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito autorizando el uso de sus tejidos con fines de investigación.

Cultivo de Organoides: Los cultivos de organoides derivados de pacientes (PDO, *Patient-Derived Organoids*) se establecieron siguiendo el protocolo descrito por Burgueño et al. (2019), con modificaciones menores. Los organoides fueron disociados mecánicamente y enzimáticamente utilizando TrypLE Express (Gibco, 12605010) suplementado con 10 μ M del inhibidor de ROCK Y-27632 (Cayman Chemical) a 37 °C durante 7 minutos (<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01484>). Los fragmentos celulares resultantes se resuspendieron en extracto de membrana basal (BME, Cultrex) y se sembraron en placas de 96 pocillos. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂.

Después de 48 horas de crecimiento, los organoides fueron tratados con HTH-01-015 a concentraciones de 1, 5 y 10 μ M, y con oxaliplatino a 20 y 40 μ M, incluyendo tratamientos combinados correspondientes. Como controles negativos se utilizaron DMSO, agua destilada y pozos sin tratar. Todas las condiciones experimentales se realizaron por triplicado.

Ensayo de Viabilidad Celular para organoides: La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción de resazurina (Alamar Blue, Invitrogen, DAL1025). El reactivo se agregó en una proporción del 10 % del volumen total del pozo, y las lecturas de fluorescencia se tomaron cada 24 horas durante 96 horas. La intensidad de fluorescencia, correspondiente a la conversión de resazurina en resorufina, se midió a 560/590 nm utilizando un lector multimodo Synergy HTX (BioTek, EE.UU.). Los cambios morfológicos y el crecimiento de los organoides se documentaron fotográficamente utilizando un microscopio invertido (BS7020, BestScope, China).

Cuantificación y análisis estadísticos: Las densitometrías de los *western blots* y el análisis de las imágenes fueron realizadas en *ImageJ*. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados en *GraphPad Prism 8*. La significancia estadística fue determinada por *t-test Student* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) o *one way ANOVA* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Resultados:

1. Objetivo n°1: Determinar si NUA1 interactúa con hnRNPK y regula su fosforilación.

Previamente, demostramos que la localización subcelular de NUA1 depende del contexto y del tipo de cáncer. Particularmente, en cáncer de mama se observa una localización predominantemente citosólica, mientras que en la línea celular HCT116p53^{-/-}, NUA1 se comporta como una quinasas principalmente nuclear.

Por otra parte, análisis de tejidos de glioblastoma han mostrado que NUA1 presenta una baja expresión en etapas tempranas, la cual aumenta progresivamente a medida que avanza la enfermedad. Lo más interesante de estos análisis es que la localización nuclear de NUA1 también incrementa en estadios avanzados, sugiriendo que sus funciones nucleares podrían ser esenciales durante la progresión del glioblastoma (Lu et al., 2013).

A partir de estos antecedentes, evaluamos la expresión y localización de NUA1 en un microarreglo de tejidos de colon normal y adenocarcinoma. Estos análisis evidenciaron que, en comparación con tejidos normales, los adenocarcinomas muestran una mayor expresión de NUA1, junto con una marcada localización nuclear, lo que demuestran que las funciones nucleares de NUA1, adquieren relevancia en este contexto patológico (**Fig. 6**). Adicionalmente, dado los resultados previos de nuestro laboratorio en torno a la localización subcelular de NUA1 en células HCT116p53^{-/-}, validamos que esta localización nuclear es conservada en diversas líneas celulares de CCR (**Fig. 7**).

En base a estos hallazgos, y considerando que NUA1 presenta una distribución nuclear predominante en cáncer colorrectal, se propuso estudiar la interacción entre hnRNPK y NUA1 en este contexto tumoral.

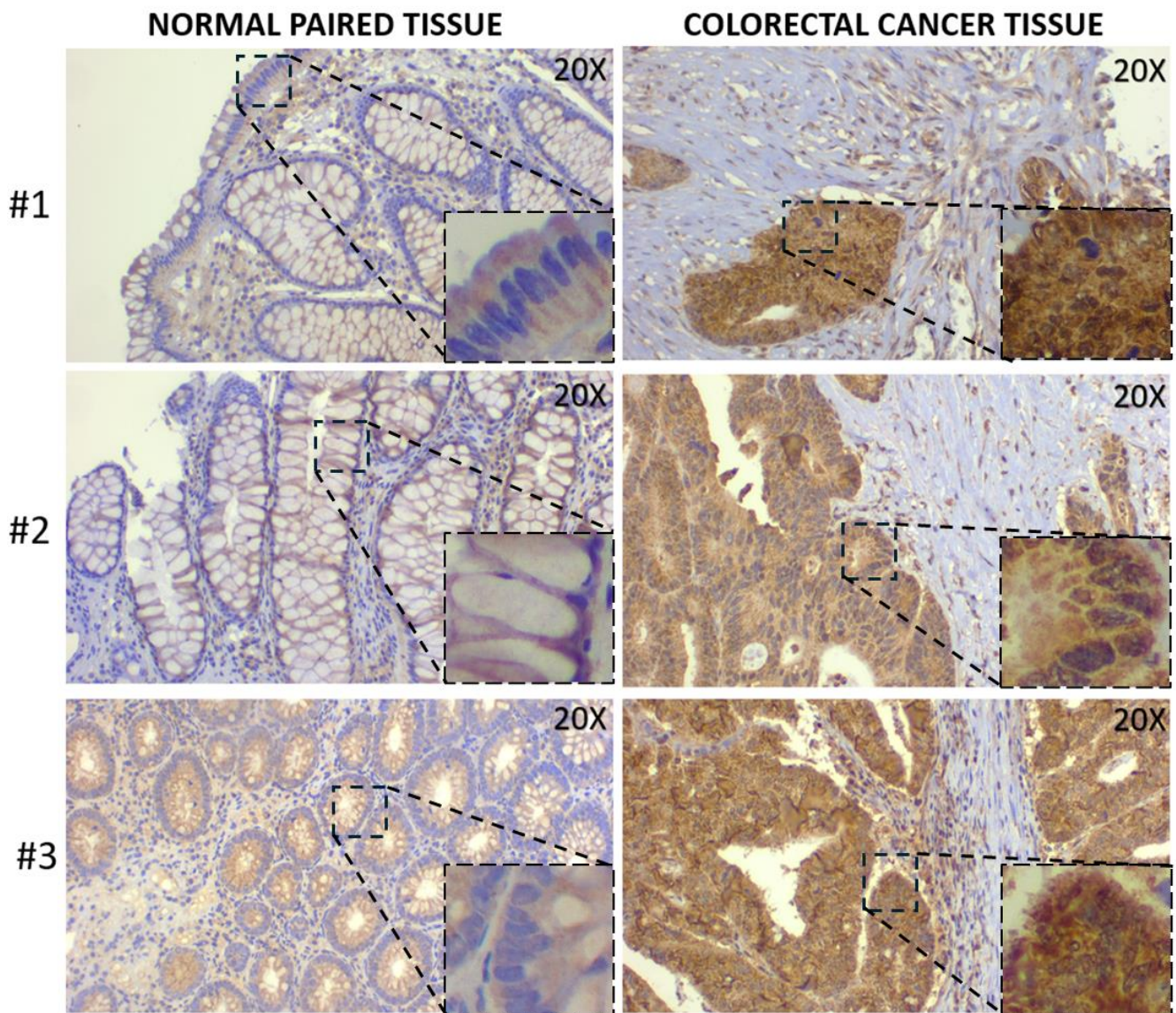


Figura 6. NUAK1 presenta sobreexpresión en cáncer colorrectal en comparación con tejido normal adyacente. Se muestran tres casos representativos (#1-#3) evaluados mediante inmunohistoquímica de NUAK1. En el tejido normal pareado, la tinción para NUAK1 es débil y predominantemente citoplasmática, con señal casi ausente en núcleo, manteniéndose la arquitectura histológica característica de las criptas de Lieberkühn. En contraste, el tejido de cáncer colorrectal muestra una tinción intensa, difusa y homogénea, con una marcada positividad citoplasmática y expresión nuclear variable. Todas las imágenes fueron adquiridas a 20X, y la barra de escala corresponde a 100 μ m.

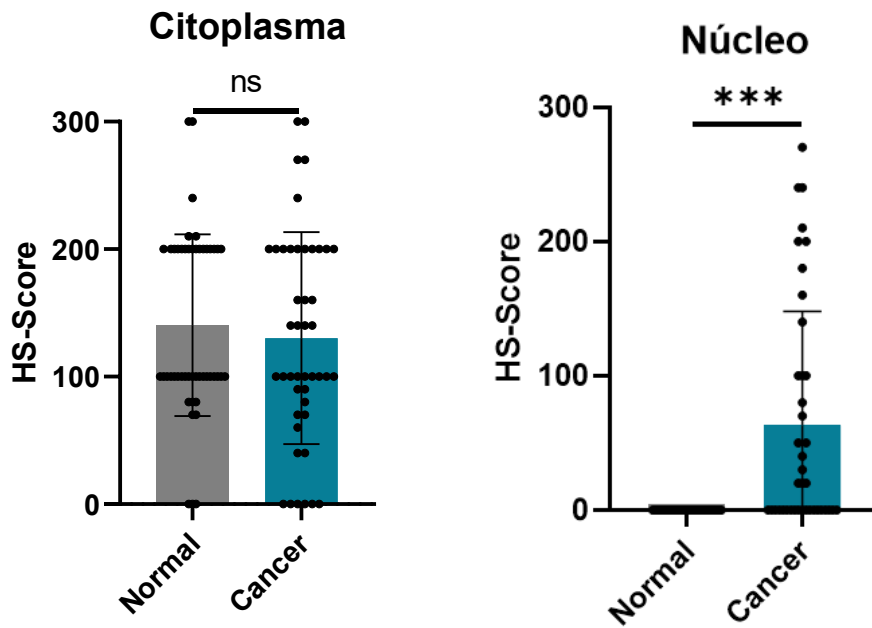


Figura 7. Análisis de la expresión de NUAK1. H-Score de la señal de NUAK1 citoplasmática y nuclear obtenida a partir de los tejidos de mucosa sana y cancerosa. **HS-SCORE= (1 x % células positivas) + (2 x % células positivas) + (3 x % células positivas)**. Se realizó un análisis estadístico a través de una prueba de Man-Whitney. NS= no significativo, ***p<0.001. N=42 NORMAL, N=48 CANCER.

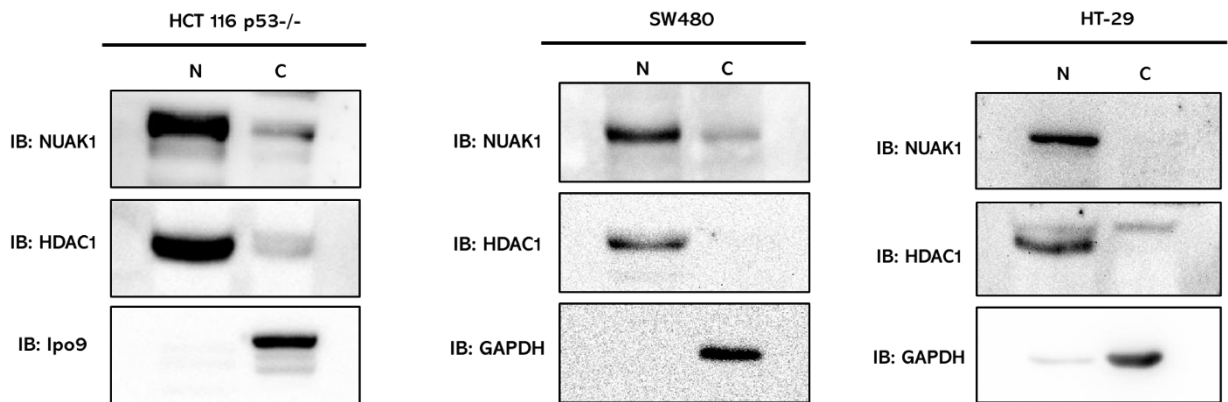


Figura 8. NUAK1 se localiza principalmente en el núcleo en líneas celulares de cáncer colorrectal. Fraccionamiento subcelular de líneas HCT116p53^{-/-}, SW480 y HT29. Las fracciones nucleares y citoplasmáticas fueron evaluadas mediante western blot, para las proteínas indicadas. HDAC1 y GAPDH o IPO9 fueron utilizados como controles nucleares o citoplasmáticos, respectivamente. N=Núcleo, C=Citosol.

Consistente con la localización nuclear de NUA1 en células de cáncer colorrectal (CRC), los análisis mediante MudPIT realizados para evaluar el interactoma de NUA1, mostraron un enriquecimiento de proteínas relacionadas con funciones nucleares, incluyendo la regulación del metabolismo del ARN y su asociación con el espliceosoma (**Fig. 9A-B**). Dentro de estas proteínas, hnRNP surgió como un potencial interactor nuclear de NUA1 (**Fig 9C**).

En base a esto, a través de co-inmunoprecipitación validamos que la interacción y colocalización entre NUA1 y hnRNP ocurre específicamente a nivel del núcleo (**Fig 9D y 10**). La interacción entre NUA1 y hnRNP en el núcleo fue confirmada a través de estudios de coimmunoprecipitación con la mutante citoplasmática de NUA1 (KR4370A), lo cual fue incapaz de interactuar con hnRNP (**Fig. 9A**). Teniendo en consideración que NUA1 es una proteína quinasa y dada la existencia de potenciales sitios de fosforilación dependientes de NUA1, planteamos la hipótesis de que NUA1 podría regular directamente la fosforilación de hnRNP. Para explorar esta posibilidad, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro*. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que NUA1 no es capaz de fosforilar directamente a hnRNP (**Fig 11A**). Este hallazgo se vio reforzado por ensayos de interacción *in vitro*, en los cuales las proteínas purificadas de NUA1 y hnRNP no demostraron una asociación física detectable (**Fig 11B**), lo que sugiere que la interacción observada en células requiere de componentes o cofactores adicionales presentes en el entorno nuclear.

Por otro lado, considerando que uno de los principales interactores conocidos de NUA1 es la fosfatasa PP1 β , cuya actividad es inhibida por NUA1 a través de la fosforilación de sus subunidades regulatorias, evaluamos la posibilidad de que la regulación de hnRNP pudiera ocurrir de manera indirecta. En este contexto, analizamos el estado de fosforilación global de hnRNP en células tratadas con un inhibidor específico de NUA1. Dado que **PP1B actúa como una fosfatasa que remueve la fosforilación en residuos de serina y treonina** (Shi., 2009), y considerando que **los principales residuos diana descritos para NUA1 corresponden a serinas**, centramos nuestro análisis exclusivamente en este tipo de residuos. De manera interesante, observamos una disminución en los niveles de fosforilación de hnRNP tras la inhibición de NUA1 (**Fig 11C**), lo que sugiere que esta quinasa podría mantener la fosforilación de hnRNP de forma indirecta, al modular negativamente la actividad de PP1 β . En conjunto, estos resultados indican que la regulación de hnRNP por NUA1 no depende de una fosforilación directa, sino que probablemente se orquesta a través del control de la actividad fosfatasa de PP1 β dentro del núcleo.

A

GO:BP		stats	
Term name	Term ID	Padj	$-\log_{10}(P_{adj})$
supramolecular fiber organization	GO:0097435	1.508×10^{-37}	
organelle organization	GO:0006996	2.603×10^{-33}	
regulation of mRNA splicing, via spliceosome	GO:0048024	1.364×10^{-20}	
regulation of mRNA processing	GO:0050584	2.595×10^{-20}	
regulation of RNA splicing	GO:0043484	2.877×10^{-20}	
carboxylic acid metabolic process	GO:0019752	3.417×10^{-11}	
oxoacid metabolic process	GO:0043436	1.089×10^{-10}	
generation of precursor metabolites and energy	GO:0006091	3.929×10^{-10}	
mitotic cell cycle	GO:0000278	2.267×10^{-9}	
homotypic cell-cell adhesion	GO:0034109	1.773×10^{-5}	
regulation of cell-substrate adhesion	GO:0010810	4.693×10^{-5}	
positive regulation of cytoplasmic translation	GO:2000767	1.273×10^{-4}	
establishment or maintenance of cell polarity	GO:0007163	6.439×10^{-4}	
cell motility	GO:0048970	3.449×10^{-4}	
muscle contraction	GO:0006936	1.656×10^{-3}	
modified amino acid metabolic process	GO:0006575	1.946×10^{-2}	
mRNA catabolic process	GO:0006402	3.647×10^{-2}	
DNA metabolic process	GO:0006259	3.667×10^{-2}	

GO:CC		stats	
Term name	Term ID	Padj	$-\log_{10}(P_{adj})$
extracellular exosome	GO:0070062	1.478×10^{-124}	
cytosol	GO:0005829	1.310×10^{-82}	
spliceosomal complex	GO:0005681	1.096×10^{-13}	
endoplasmic reticulum lumen	GO:0005788	4.681×10^{-10}	
exon-exon junction complex	GO:0035145	3.206×10^{-7}	
cornified envelope	GO:0001533	8.427×10^{-5}	
myosin II filament	GO:0097513	5.193×10^{-3}	
succinate-CoA ligase complex	GO:0042709	5.193×10^{-3}	
site of double-strand break	GO:0035861	3.602×10^{-2}	
chromosome, telomeric region	GO:0000781	4.721×10^{-2}	

B

Proteins	MW	MEF FLAG (Control)						MEF FLAG-NUAK1 WT					
		Control-NE_P			Control-CE_P			Control-NE_P			Control-CE_P		
		P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF	P	dS'	dNSAF
NUAK1	73377	0	0	0	0	0	0	45	542	0,0317	54	1317	0,01958
hnRNPk	50976	3	4	0,00023	4	7	0,00026	5	11	0,000904	4	9	0,00019
SRSF2	25476	1	2	0,00032	0	0	0	2	6	0,00103	0	0	0
Snrpd3	13916	0	0	0	2	8	0,00109	0	0	0	3	35	0,00268

C

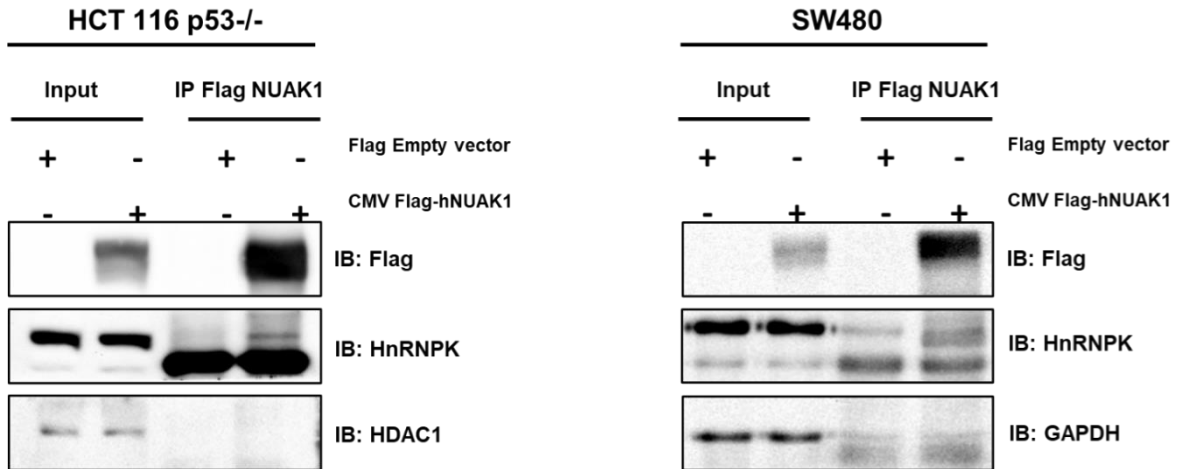
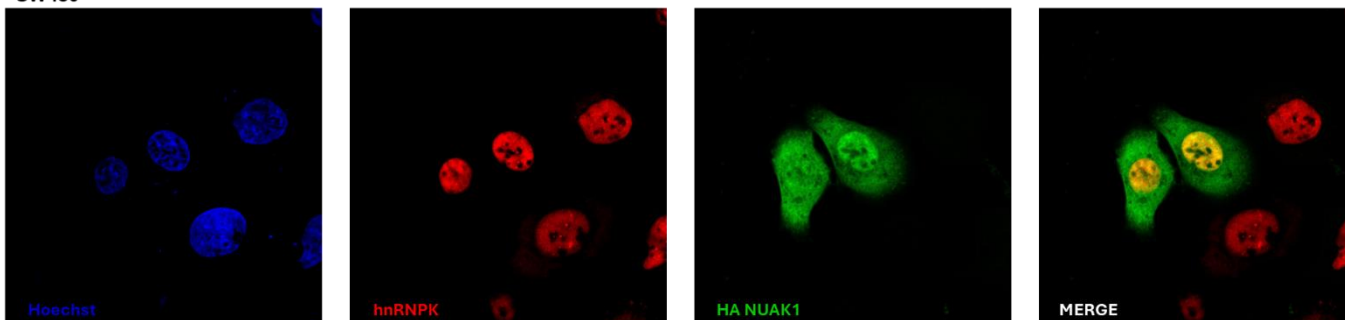


Figura 9: hnRNPk es un nuevo interactante de NUAK1 en cáncer colorrectal. A) Análisis ontológicos de los procesos biológicos asociados a los potenciales interactores de NUAK1. **B)** Análisis ontológicos de los componentes celulares asociados a los potenciales interactores de NUAK1. Todos los análisis fueron analizados mediante la base ShinyGO. **C)** Tabla que muestra el conteo total de péptidos (P), el conteo de la distribución espectral (dS) y la distribución del factor de abundancia espectral normalizado (dNSAF) para cada proteína identificada en la purificación de FLAG NUAK1 WT murino (n=3). EN: Extracto nuclear, EC: Extracto citoplasmático. **D)** Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT expresada en células HCT116p53^{-/-} y SW480 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de hnRNPk. GAPDH y HDAC1 fueron utilizados como controles negativos.

A

SW480



HCT116 p53-/-

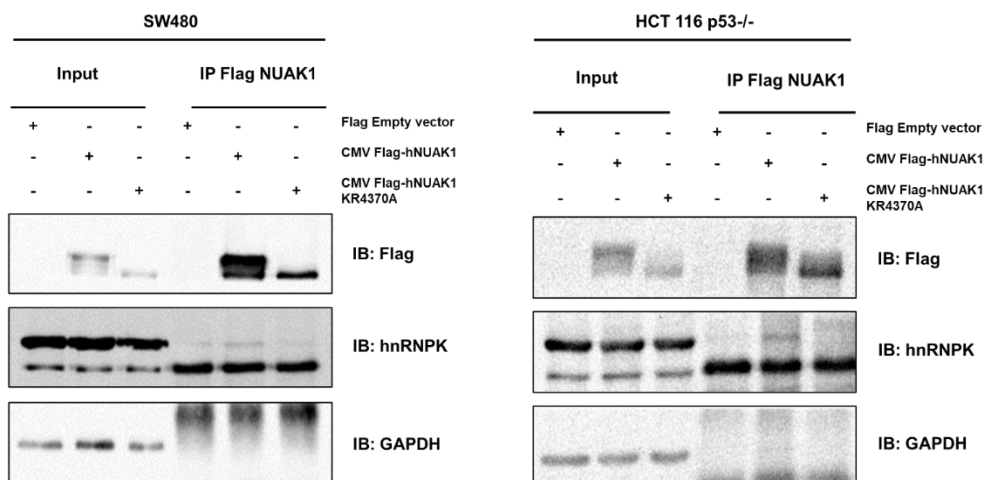
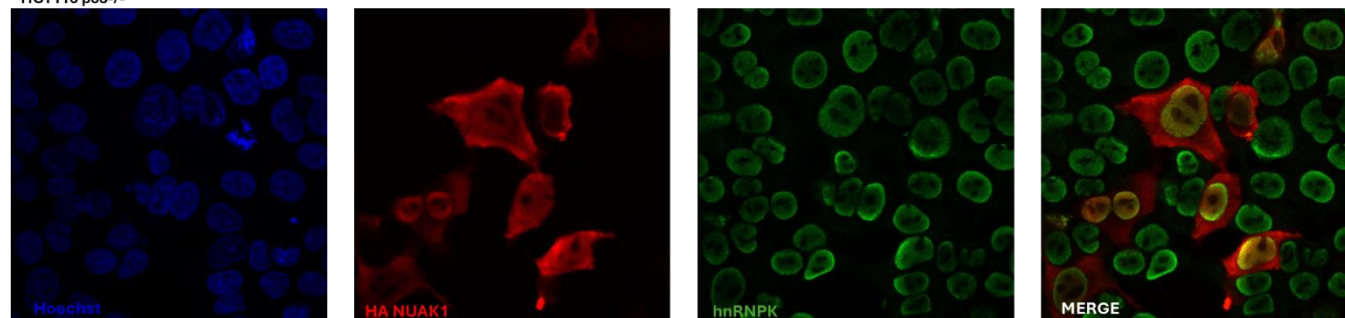


Figura 10: NUA1 interacta con hnRNPK en el núcleo de células de cáncer colorrectal. A) Imágenes de microscopía confocal de células HCT116 p53^{-/-} y SW480, transfectadas con el vector FLAG-hNUAK1 WT y hnRNPK. B) Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT y FLAG-hNUAK1 KR4370AA (mutante citosólica) expresada en células HCT116p53^{-/-} y SW480 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de hnRNPK. GAPDH fue utilizado como control negativo.

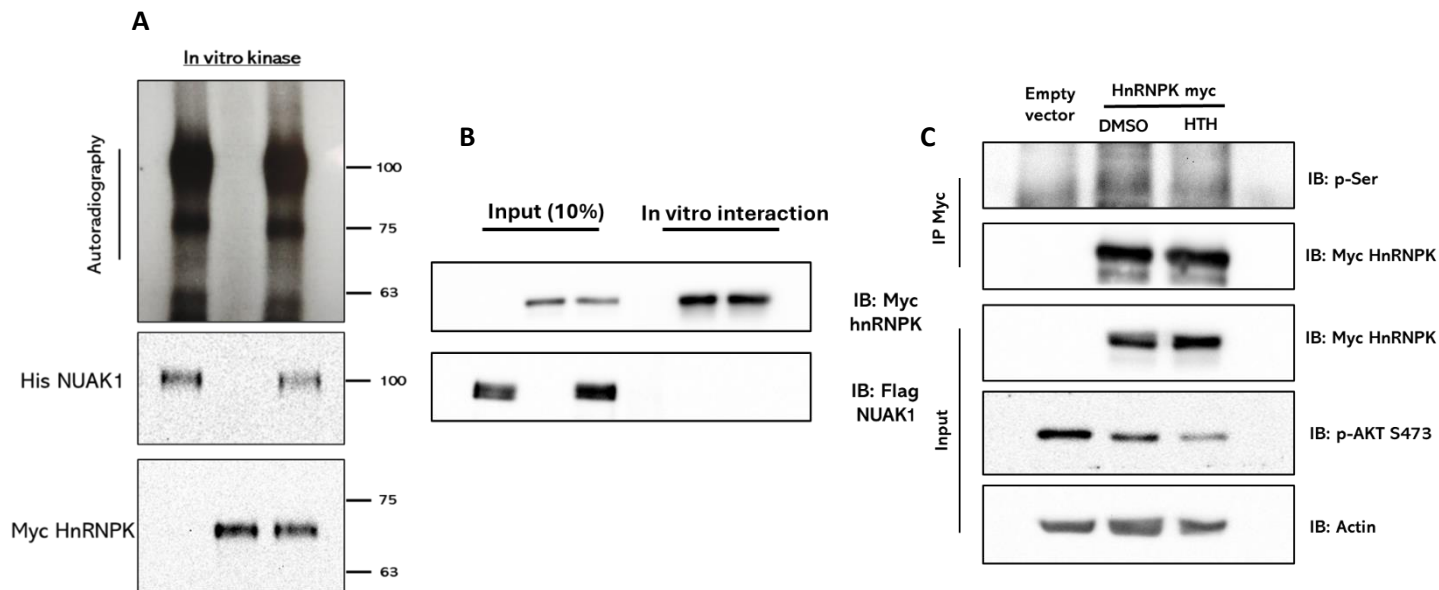


Figura 11: NUA1 promueve de manera indirecta la fosforilación de hnRNPK. A) Ensayo de fosforilación in vitro. Células HEK293T fueron transfectadas con el vector hnRNPK-Myc. Luego, hnRNPK fue inmunoprecipitado y defosforilado. El ensayo de fosforilación fue realizado mediante la incubación de hnRNPK-myc y 500ng de GST-NUAK1 purificado de baculovirus, en presencia de 10uCi de ATP radioactivo. Panel superior, autoradiografía de las muestras separadas por electroforesis después de la reacción de fosforilación. Panel inferior, 10% de la reacción fue colectada para corroborar la presencia de las proteínas purificadas mediante Western Blot N=5. B) Ensayos de interacción in vitro, células HEK293T fueron transfectadas con los vectores hnRNPK-MYC y FLAG-hNUAK1 WT. Luego fueron inmunoprecipitadas y FLAG-hNUAK1 eluida de la resina N=1. C) hnRNPK-myc fue transfectada en células HCT116p53^{-/-} en condiciones de incubación con DMSO o HTH-01-015 (inhibidor de NUA1), luego fue inmunoprecipitada y su estado de fosforilación se evaluó mediante un anticuerpo contra fosfo-serinas. El lisado total (50ug) fue utilizado previo a la inmunoprecipitación para corroborar la presencia de hnRNPK. La fosforilación de AKT en la serina 473 fue utilizada como control positivo de la inhibición de NUA1 N=1.

Los ensayos de co-inmunoprecipitación demostraron que, en células de cáncer colorrectal, **NUAK1 interactúa con la subunidad catalítica PP1 β y con sus subunidades regulatorias MYPT1 y PNUTS**, correspondientes a las subunidades regulatorias **citoplasmática y nuclear** (Choi et al., 2014), respectivamente, **evidenciando que NUAK1 se asocia a complejos PP1 β en ambos compartimentos celulares (Fig 12A)**. Estos resultados apoyan la idea de que NUAK1 podría modular la fosforilación de múltiples sustratos a través de la regulación de la actividad de PP1 en distintos contextos subcelulares. Con base en esta observación, evaluamos si hnRNPK podría formar parte de dichos complejos fosfatasa y, de este modo, constituir un posible intermediario de la regulación mediada por NUAK1. Sin embargo, los ensayos de co-inmunoprecipitación en células HCT116 p53^{-/-} **no aportaron evidencia concluyente** de una interacción entre hnRNPK y la subunidad catalítica PP1 β (**Fig 12B**), lo que sugiere que la regulación de hnRNPK por NUAK1 podría no depender de esta fosfatasa. No obstante, estos resultados no descartan la posibilidad de que otros complejos o subunidades reguladoras de PP1 puedan participar en este proceso, por lo que serán necesarios estudios adicionales para validar y precisar este mecanismo.

De manera complementaria, **evaluamos el estado de fosforilación de hnRNPK en el residuo serina 284, descrito previamente como un posible sitio regulatorio dependiente de PP1** (Kwieck et al., 2006) **que es fosforilado por ERK y CDK2**, utilizando un anticuerpo específico dirigido contra dicha modificación (**datos no mostrados**). Sin embargo, no fue posible detectar la fosforilación en este residuo, incluso al emplear hnRNPK purificada, lo que sugiere que el anticuerpo no presenta suficiente sensibilidad o especificidad.

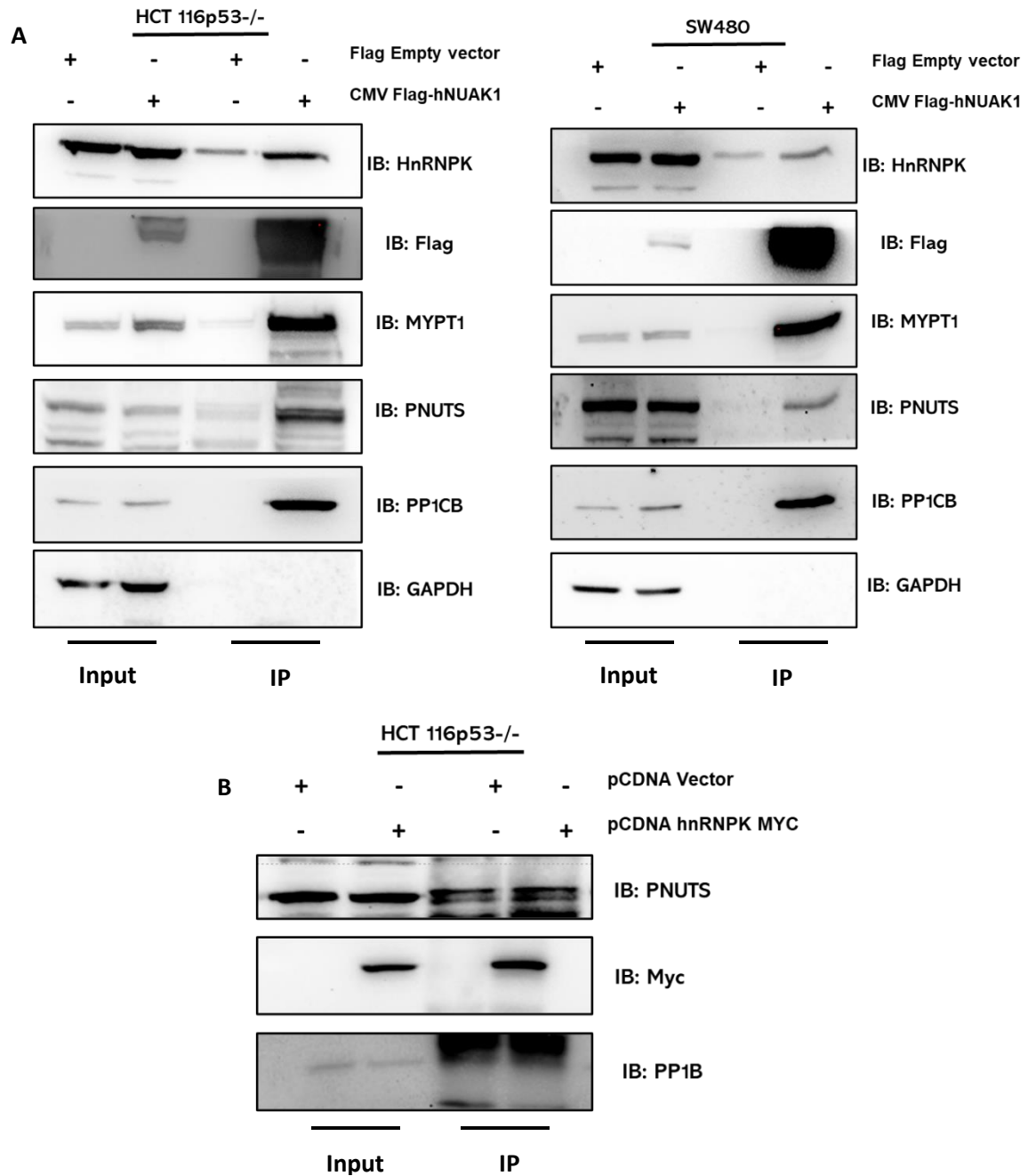


Figura 12: NUAK1 interacciona con los complejos de la proteína fosfatasa 1B citoplasmáticos y nucleares, pero no hnRNPK. A) Inmunoprecipitación (IP) de FLAG-hNUAK1 WT expresada en células HCT116p53^{-/-} y SW480 y co-inmunoprecipitación (Co-IP) de hnRNPK, MYPT1, PNUTS Y PP1CB. GAPDH fue utilizado como control negativo. B) Inmunoprecipitación (IP) de hnRNPK-Myc expresada en células HCT116p53^{-/-} y co-inmunoprecipitación de PNUTS y PP1B (PP1CB).

Resumen de los principales resultados del objetivo 1.

En conjunto, nuestros resultados revelan que NUA1 en cáncer colorrectal es una quinasa con una localización nuclear y citoplasmática, de manera similar, validamos que en células de CCR, NUA1 se localiza en principalmente el núcleo, donde interacciona con hnRNP. Sin embargo, **los ensayos de fosforilación in vitro mostraron que NUA1 no es capaz de fosforilar directamente a hnRNP**. En concordancia con estudios de interacción in vitro que evidenciaron la ausencia de una asociación física entre ambas proteínas purificadas. Considerando que NUA1 es un regulador conocido de la fosfatasa PP1, con la cual forma complejos tanto en el núcleo como en el citoplasma, planteamos que la regulación de hnRNP podría ocurrir de forma indirecta a través de esta vía. En apoyo de esta hipótesis, observamos que la inhibición farmacológica de NUA1 se asocia con una disminución en los niveles de fosforilación de hnRNP en células, sugiriendo un vínculo funcional entre ambas proteínas. No obstante, los ensayos de co-inmunoprecipitación no evidenciaron una interacción entre hnRNP y la subunidad catalítica PP1 β , lo que sugiere que esta regulación podría no depender de la interacción entre ambas proteínas (**Fig 13**).

Si bien no fue posible determinar con precisión el mecanismo mediante el cual NUA1 podría estar regulando la función de hnRNP, la evidencia de una asociación física entre ambas proteínas sugiere la existencia de un vínculo funcional relevante. Este hallazgo abre nuevas interrogantes respecto a cómo NUA1, a través de la modulación de hnRNP, podría influir en procesos nucleares clave, tales como el procesamiento de ARN, la respuesta al estrés o la regulación metabólica, y de qué manera esta interacción contribuye a la progresión del cáncer colorrectal.

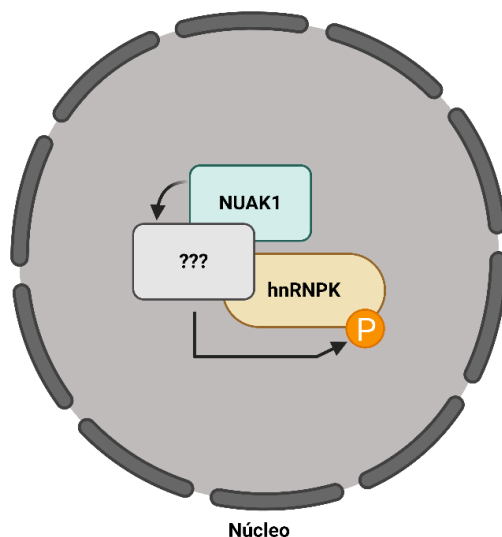


Figura 13: Modelo del mecanismo molecular propuesto para el objetivo 1. NUA1 es una quinasa principalmente nuclear donde interacciona con hnRNP y promueve su fosforilación a través de un mecanismo indirecto.

Experimentos adicionales para el objetivo 1. Determinar el efecto de NUA1 en la localización y expresión de hnRNP

hnRNP es una proteína localizada principalmente en el núcleo celular, donde participa en la regulación del empalme y la transcripción. Sin embargo, al igual que otras proteínas nucleares, su transporte depende de factores de importe nuclear. Aunque hasta la fecha no se han identificado las proteínas responsables de su importe al núcleo, estructuralmente hnRNP posee una secuencia de localización nuclear (SLN), la cual sería necesaria para asegurar su correcta distribución subcelular. En cáncer, se ha descrito un incremento de hnRNP en el citoplasma, fenómeno asociado a un fenotipo de mayor agresividad tumoral. Esto evidencia que en contexto patológico hnRNP puede relocalizarse hacia el citoplasma.

Estudios previos han demostrado que la fosforilación mediada por ERK en la **serina 284** promueve la acumulación citoplasmática de hnRNP, inhibiendo su interacción con sus blancos nucleares. Considerando esto y nuestros resultados previos, evaluamos si NUA1 podría modular la distribución subcelular de hnRNP y, de este modo, interferir con su interacción con el pre-mRNA de G6PD. Sin embargo, nuestros datos indican que, independientemente del contexto celular, la inhibición de NUA1 no modifica la localización subcelular de hnRNP en células de cáncer colorrectal (**Fig 14, 15A**).

Por otra parte, dada la evidencia que sugiere un posible efecto inhibitorio de NUA1 sobre hnRNP, analizamos si esta quinasa podría afectar sus niveles de expresión. Nuestros estudios de correlación entre NUA1 y hnRNP revelan una leve tendencia negativa (**Fig 15B**), compatible con un posible efecto represor. No obstante, los análisis de western blot muestran que los niveles de hnRNP no se ven alterados por la actividad de NUA1 (**Fig 15C**). En conjunto, estos resultados sugieren que la potencial función de NUA1 sobre hnRNP dependería de cambios en su actividad regulados por modificaciones postraduccionales, más que por alteraciones en su localización o expresión.

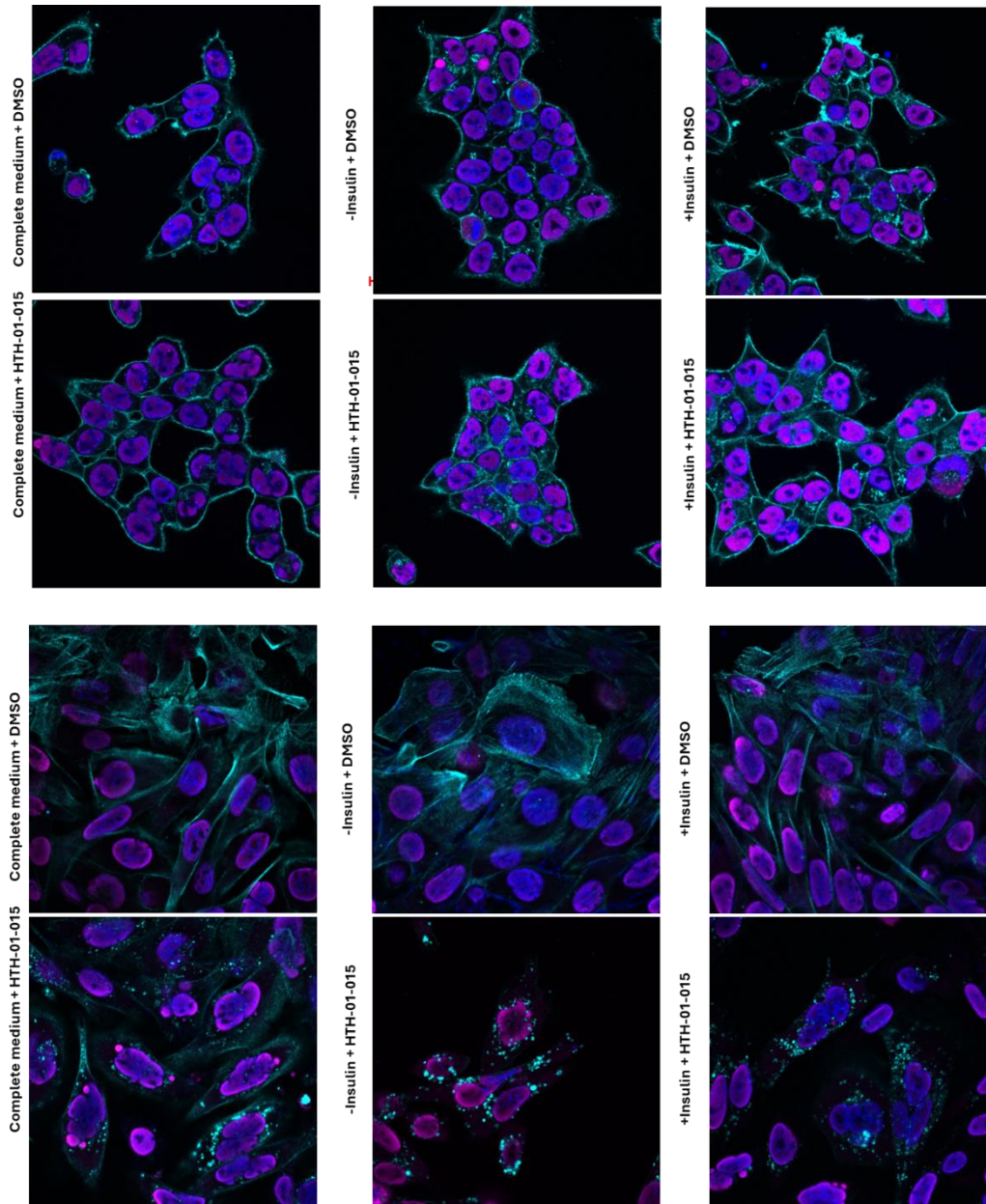


Figura 14: NUA1 no afecta la distribución nuclear de hnRNPK en diferentes contextos. Inmunofluorescencia de células HCT116p53^{-/-} y SW480 mantenidas en medio completo, privación de suero (-insulina) y estimuladas con insulina durante 12h. Las células fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 (HTH-01-015) o DMSO como control durante 24h. La distribución de hnRNPK endógena fue evaluado con un anticuerpo específico (Magenta) y los filamentos de actina fueron visualizados mediante Faloidina 488 (Cyan). Imágenes representativas tomadas bajo microscopia confocal.

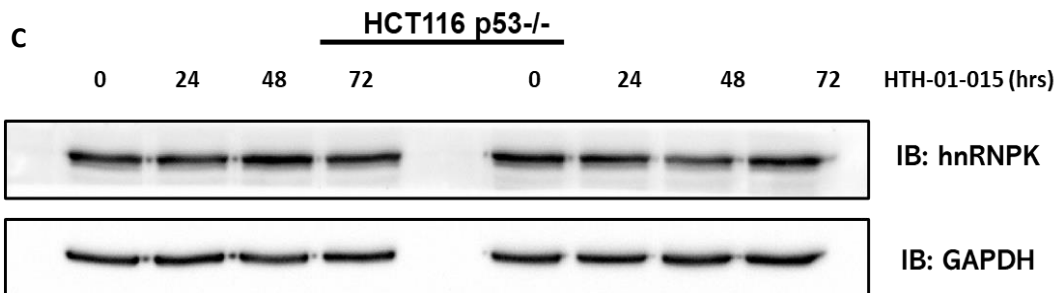
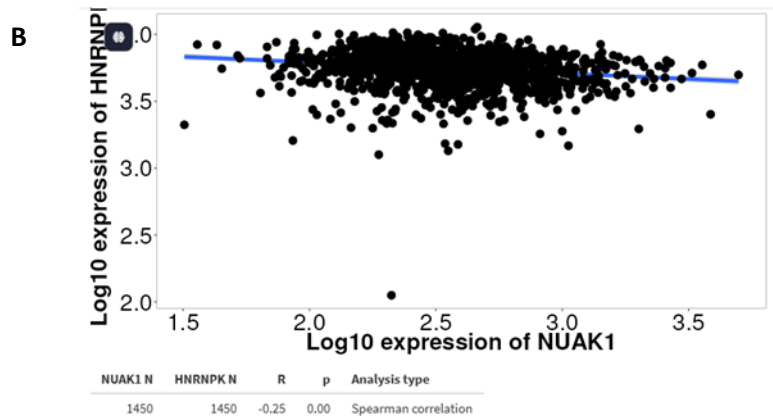
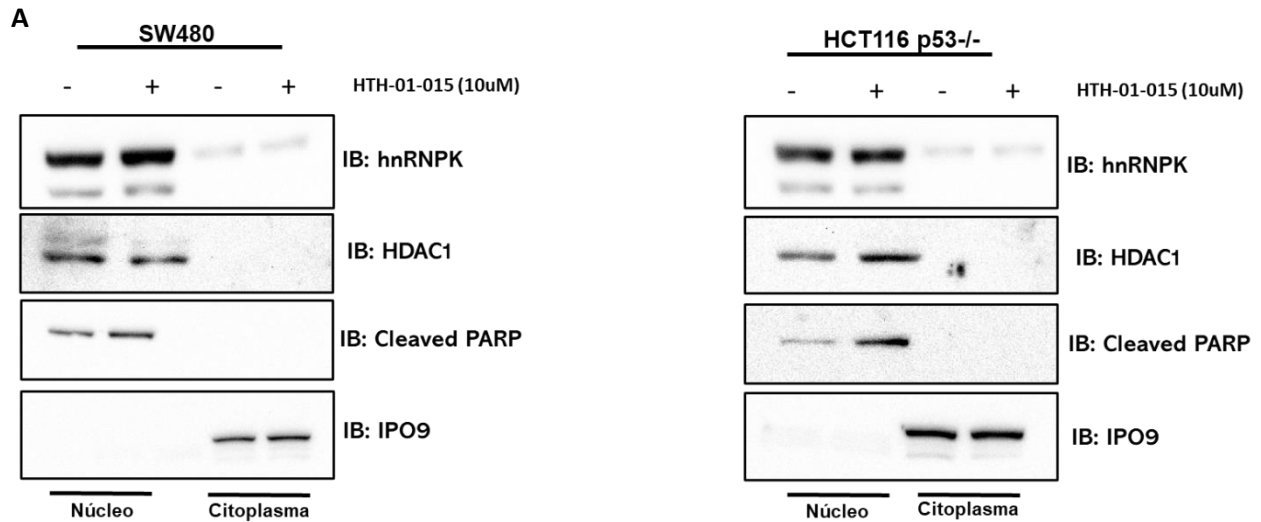


Figura 15: NUA1 no afecta la distribución subcelular ni la expresión de hnRNPk. A) Análisis de fraccionamiento subcelular de células HCT116p53^{-/-} y SW480, tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Las fracciones analizadas mediante western blot. HDAC1 fue utilizado como control nuclear, y GAPDH como control de la fracción citoplasmática. B) Análisis de la correlación entre NUA1 y hnRNPk en datos de CCR. El análisis fue realizado en TNMplot utilizando datos disponibles de TCGA. <https://tnmplot.com/analysis/>. C) Células HCT116p53^{-/-} fueron tratadas entre 0-72h con el inhibidor de NUA1, luego las proteínas fueron analizadas mediante western blot utilizando los anticuerpos correspondientes.

1. **Objetivo n°2: Evaluar el efecto de NUA1 sobre la asociación de hnRNP con ARNm de genes metabólicos y su impacto en la regulación del metabolismo y la homeostasis redox en cáncer colorrectal.**

Las evidencias obtenidas en el Objetivo 1 posicionan a hnRNP como un nuevo y potencial blanco de NUA1, sugiriendo mecanismos previamente no descritos mediante los cuales esta quinasa podría influir en la biología del cáncer. Estos hallazgos, además, respaldan la idea de que la localización nuclear de NUA1 está asociada a funciones moleculares específicas. Es importante destacar que NUA1 ha sido propuesta como una proteína con un rol activo en la regulación del empalme, aunque los mecanismos adyacentes aún no han sido completamente caracterizados.

En este contexto, la finalidad de este objetivo fue establecer una asociación funcional entre NUA1 y hnRNP, considerando la interacción física identificada en células de cáncer colorrectal. A partir de ello, buscamos determinar cómo NUA1 podría modular la expresión génica, particularmente aquella vinculada al metabolismo celular y a la respuesta frente al estrés oxidativo, en línea con antecedentes que indican que NUA1 podría impactar en la actividad de la vía de las pentosas fosfato.

Objetivo 2.1: Identificar nuevos blancos de NUA1 dependientes de hnRNP

Con el objetivo de identificar nuevos blancos de NUA1 asociados a la regulación del metabolismo y potencialmente vinculados a la función de hnRNP, se realizó un análisis integrativo de datos públicos de secuenciación masiva disponibles para ambas proteínas. Para ello, se examinó la información previamente descrita en el estudio de Yang et al. (Yang et al., 2022), donde se llevó a cabo un análisis comparativo de RNA-seq en células NCI-H1299 tratadas con un silenciador específico para hnRNP. Adicionalmente, se utilizaron dos conjuntos de datos de inmunoprecipitación de RNA disponibles para hnRNP: un análisis de RIP-seq y un análisis de eCLIP-seq (enhanced cross-linking immunoprecipitation sequencing). Estos datos permitieron identificar tanto los RNAs con los que hnRNP interacciona como aquellos cuya expresión regula (**Fig 16A,B**).

A partir de este análisis, se determinó que hnRNP controla un número considerable de genes involucrados en la regulación del metabolismo celular (**Fig 16C**). Posteriormente, al comparar los datos de RNA-seq disponibles para NUA1 y hnRNP, se observó que ambas proteínas comparten un conjunto de genes diana vinculados a procesos metabólicos (**Fig 16D**).

Entre los genes metabólicos regulados de manera compartida por NUA1 y hnRNP identificamos a G6PD, la enzima clave que cataliza la primera reacción de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. Basados en este hallazgo, evaluamos el efecto de la inhibición de NUA1 sobre la expresión de G6PD en líneas de cáncer colorrectal (**Fig 17**), observando que la inhibición de NUA1 reduce significativamente sus niveles de expresión.

Estudios recientes en cáncer de mama y pulmón (Babu & Manoharan., 2025) (Raj & Manoharan., 2025) han reportado resultados similares. Sin embargo, dichos trabajos concluyeron que el efecto de NUA1 sobre la expresión de genes metabólicos, incluyendo G6PD, dependía de la activación de la vía mTORC1, evidenciada por una disminución de la fosforilación de S6K tras la pérdida de NUA1. En contraste, nuestros resultados muestran que la inhibición de NUA1 incrementa la fosforilación de S6, el sustrato directo de S6K, lo que sugiere una hiperactivación de la señalización mediada por mTORC1 bajo estas condiciones (**Fig 17**). **Esto indica que la disminución observada en los niveles de G6PD depende de un mecanismo distinto al previamente descrito.**

Por otro lado, considerando el rol previamente descrito para hnRNP en el control del empalme y la expresión de G6PD, procedimos a validar si NUA1, podría regular a G6PD a través de este mecanismo en células de cáncer de colon. Para ello, mediante inmunoprecipitación de RNA (RIP)

seguida de qPCR, confirmamos que hnRNPK interactúa con el pre-mRNA de G6PD en células de CCR (Fig 18A). Adicionalmente, para evaluar el rol funcional de hnRNPK en la expresión de G6PD, generamos modelos celulares estables con silenciamiento de hnRNPK utilizando dos shRNA distintos (Fig 18B). **De manera consistente con los hallazgos obtenidos mediante RIP, observamos que el silenciamiento de hnRNPK incrementa los niveles de G6PD, validando así su función negativa sobre la expresión de este gen (Fig 17C).**

Con base en estos resultados, y mediante qPCR utilizando dos sets de partidores dirigidos a detectar el pre-mRNA y el mRNA de G6PD, evaluamos el rol de NUAK1 en el procesamiento del pre-mRNA de G6PD. Primero, analizamos el efecto de la inhibición y sobreexpresión de NUAK1 sobre este procesamiento bajo condiciones normales de crecimiento en líneas de cáncer colorrectal (Fig 19A), encontrando que NUAK1 promueve el correcto empalme del pre-mRNA de G6PD en ambas líneas celulares. Además, realizamos los mismos experimentos en células estimuladas con insulina, **debido a que estudios previos demostraron que la estimulación con insulina durante 12 horas incrementa los niveles de mRNA de G6PD (Wangle et al., 1998) (Fig 19B)**. Sumado a esto, resultados anteriores de nuestro laboratorio evidenciaron que la estimulación con insulina aumenta los niveles nucleares de NUAK1 en células de cáncer cervicouterino, lo que sugería que, bajo este estímulo, el efecto de NUAK1 sobre el procesamiento del pre-mRNA de G6PD podría ser mayor. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron similares a los observados bajo condiciones basales, indicando que, al menos en este contexto, la estimulación con insulina no modifica el rol de NUAK1 en este proceso.

Finalmente, para determinar si el efecto de NUAK1 depende de la regulación de hnRNPK, evaluamos el impacto de NUAK1 sobre la interacción entre hnRNPK y el pre-mRNA de G6PD. **Consistente con los datos previos, observamos que NUAK1 inhibe la interacción de hnRNPK con el pre-mRNA de G6PD (Fig 20), sugiriendo que el efecto dependiente de NUAK1 sobre la expresión de G6PD estaría mediado por la modulación que ejerce sobre la actividad de hnRNPK en el empalme de G6PD.** Finalmente, estas observaciones son consistentes con datos de TCGA que muestran que NUAK1 se correlaciona positivamente con G6PD mientras que hnRNPK muestran una fuerte correlación negativa con su expresión (Fig 21).

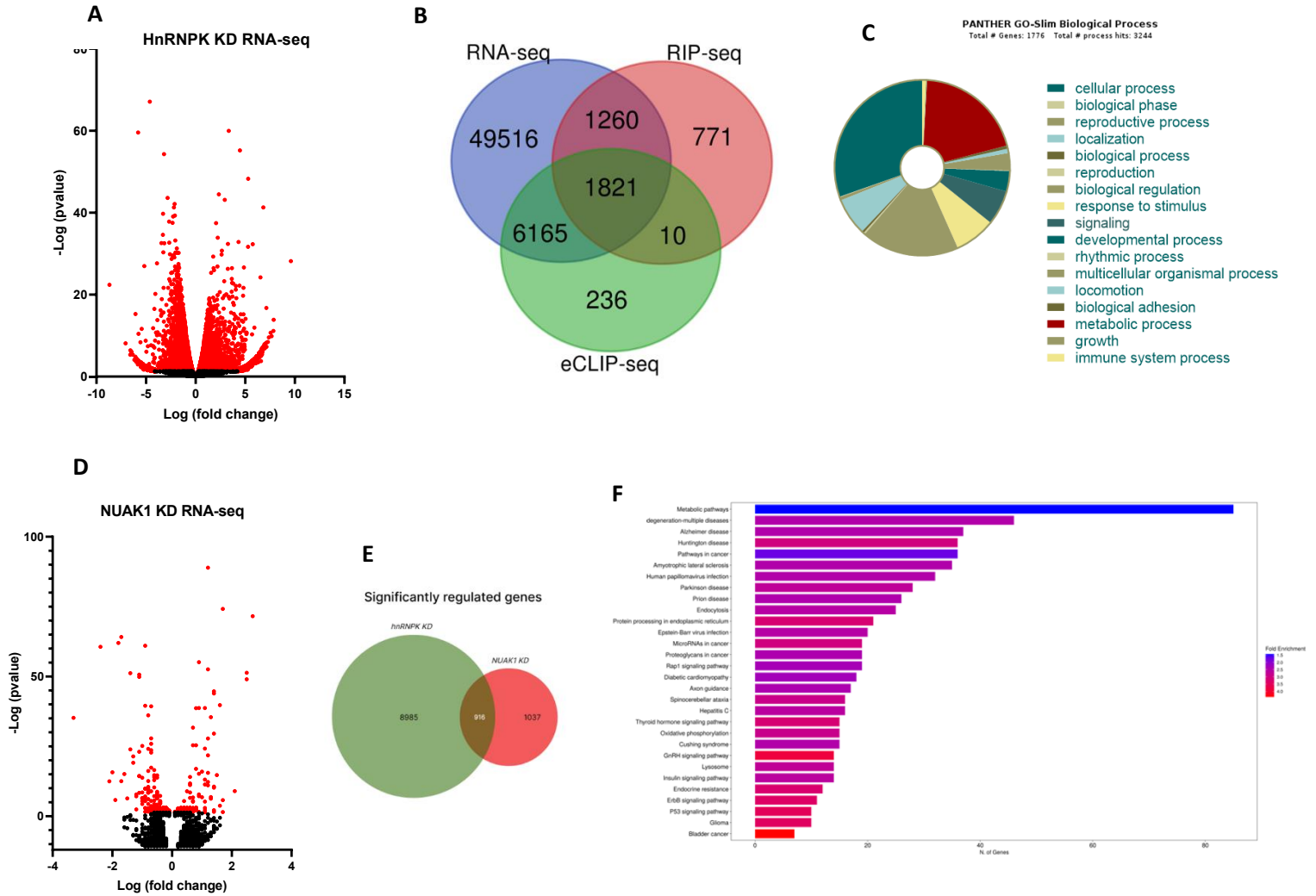


Figura 16: NUAK1 y hnRNPK regulan genes asociados al metabolismo celular. A) Gráfico tipo volcano de genes regulados por hnRNPK en células NCI H1299 hnRNPK KD. B) Diagrama de Venn mostrando los genes compartidos entre la data de hnRNPK KD, hnRNPK RIP-seq y hnRNPK e-CLIP seq. C) Análisis ontológico de los 1821 genes compartidos entre la data del interactoma de hnRNPK y sus genes regulados. D) Gráfico tipo volcán de genes regulados por NUAK1 en células U2OS NUAK1 KD. E) Diagrama de Venn, mostrando genes compartidos entre la data de hnRNPK KD y NUAK1 KD. F) Análisis de ontología, de los genes compartidos entre ambas condiciones. El análisis ontológico de hnRNPK fue analizados en PantherDB y el de la comparación entre NUAK1 y hnRNPK en ShinyGO DB.

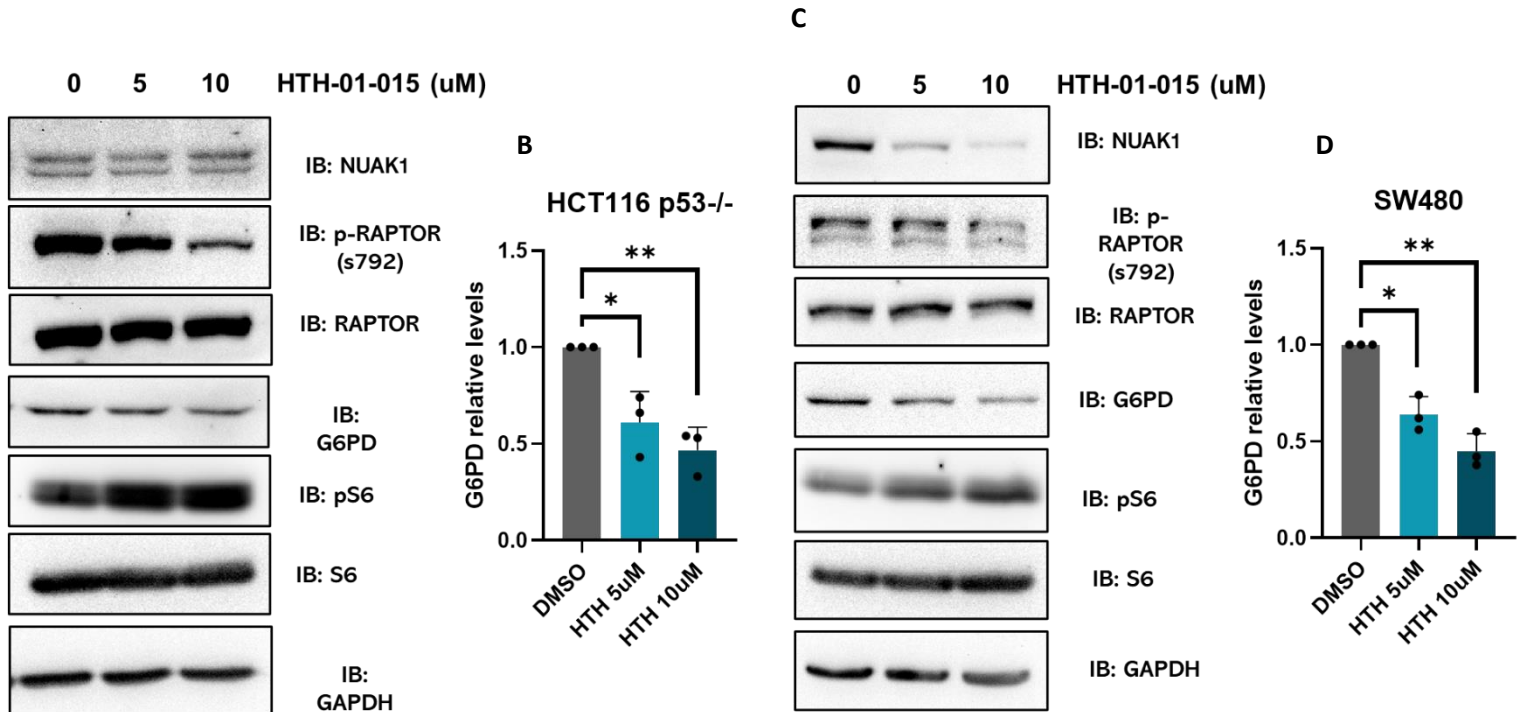


Figura 17: NUAAK1 promueve la expresión de G6PD en líneas de cáncer colorrectal. A,C) Células HCT116 y SW480, fueron tratadas con el inhibidor de NUAAK1 (HTH-01-015) durante 24h en condiciones normales de crecimiento a una concentración de 1, 5 y 10uM. Los niveles de G6PD fueron evaluados mediante western blot. La fosforilación de Raptor (serina 792) y la fosforilación de la proteína ribosoma S6 fueron utilizados como controles positivos de la droga B,D). Análisis densitométrico de la expresión relativa de G6PD. Cada barra presenta la media y la desviación estándar (N3). El análisis estadístico corresponde a un ANOVA de 1 vía *P<0,05, **P<0,01.

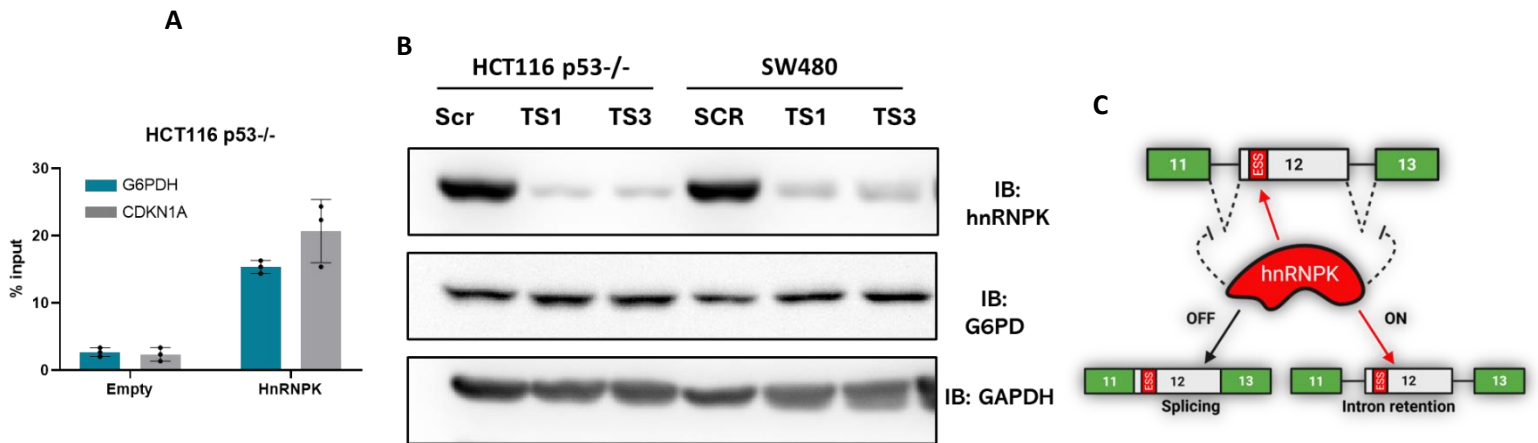


Figura 18: hnRNPk interacción con el pre-mRNA de G6PD y regula su expresión en líneas celulares de cáncer colorrectal. A) Inmunoprecipitación de ARN (RIP) de hnRNPk-Myc expresada en células HCT116p53^{-/-}. La interacción con el pre-mRNA fue evaluada mediante qPCR utilizando partidores específicos que detectan el exón 12 del pre-mRNA de G6PD. El gen de p21 (CDK1A) fue utilizado como control positivo de la técnica. B) Células HCT116p53^{-/-} y SW480 fueron transducidas con vectores lentivirales para la expresión de silenciadores (shRNA) específicos contra hnRNPk (TS1/TS3) y un silenciador inespecífico (Scr). El silenciamiento fue validado mediante western blot para evaluar los niveles de hnRNPk y G6PD en las condiciones especificadas. C) Diagrama que esquematiza la función de hnRNPk sobre el empalme y la expresión de G6PD.

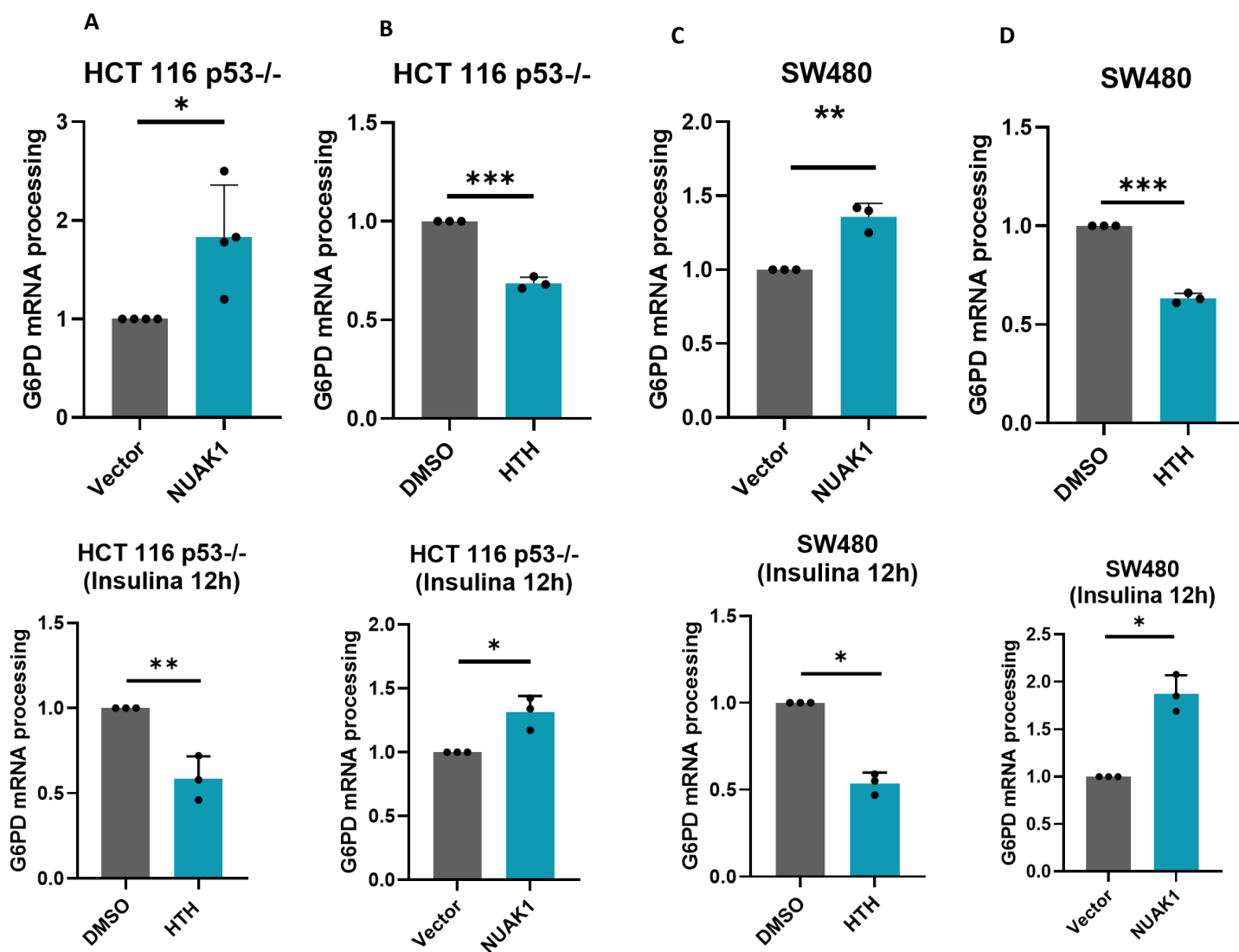


Figura 19: NUAK1 promueve el procesamiento del pre-mRNA de G6PD. A,C) Células HCT116p53^{-/-} y SW480 fueron transfectadas con el vector Flag-hNUAK1 WT durante 48h. B,D) Células HCT116p53^{-/-} y SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1, HTH-01-015 durante 16h. Panel inferior, las células fueron previamente estimuladas con insulina 50nM durante 12h en las condiciones especificadas. El procesamiento del pre-mRNA de G6PD fue evaluado mediante qPCR utilizando partidores específicos para el reconocimiento de la unión intrón-exón (Fracción inmadura) y la unión exón-exón (Fracción madura). Cada barra presenta la media y la desviación estándar (N3). El análisis estadístico corresponde a un t-student de una muestra (one sample t test) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

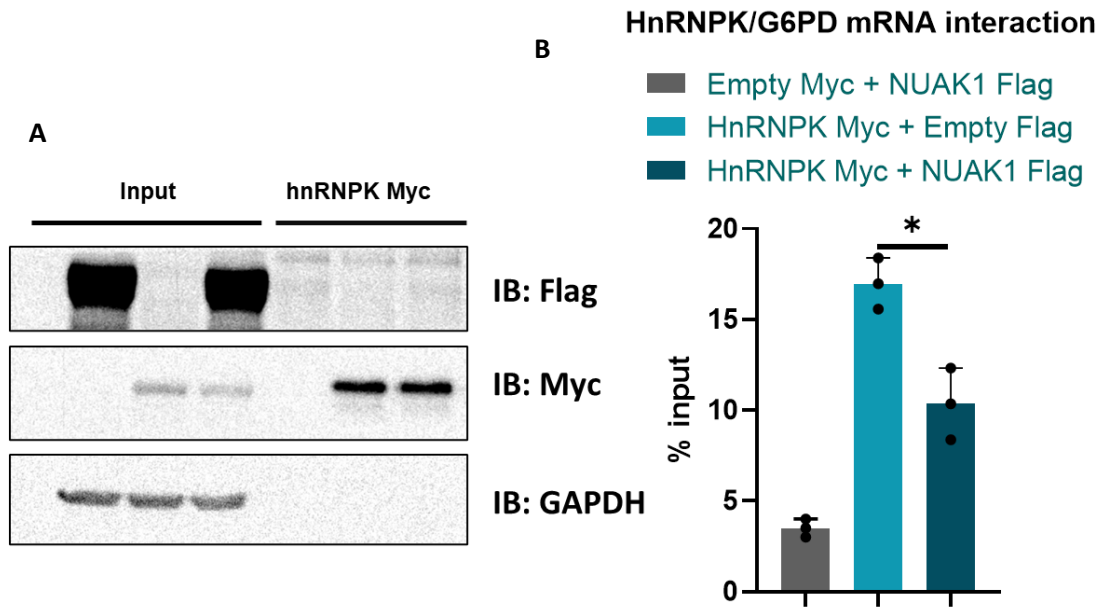
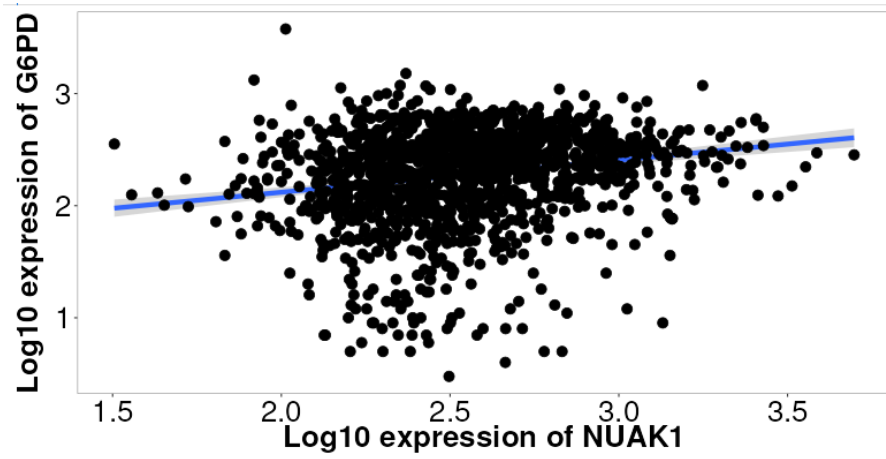
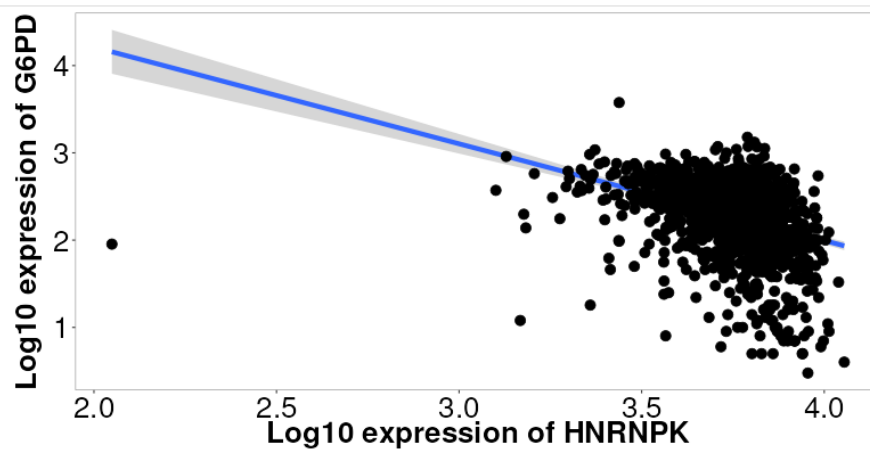


Figura 20: NUAK1 inhibe la interacción de hnRNPK con el pre-mRNA de G6PD. A) 30ug del lisado total (input) y 10% de la inmunoprecipitación fueron analizados mediante western blot para corroborar la expresión de hnRNPK Myc y Flag NUAK1 en los lisados de células HCT116p53^{-/-} transfectadas con ambos vectores. B) Análisis de inmunoprecipitación de ARN (RIP) en las condiciones especificadas. La interacción de hnRNPK y el pre-mRNA de G6PD fue evaluada mediante qPCR utilizando partidores específicos contra el exón 12 de G6PD. Cada barra presenta la media y la desviación estándar (N3). El análisis estadístico corresponde a un t-student *P<0.05.



NUAK1 N	G6PD N	R	p	Analysis type
1450	1450	0.24	0.00	Spearman correlation



HNRNPK N	G6PD N	R	p	Analysis type
1450	1450	-0.44	0.00	Spearman correlation

Figura 21: Correlación entre los niveles de NUAK1, hnRNPk y G6PD. Análisis de la correlación entre la expresión de NUAK1 y G6PD. Análisis de la correlación entre hnRNPk y G6PD. Todos los análisis fueron realizados en TNMplot utilizando datos disponibles de TCGA. <https://tnmplot.com/analysis/>.

Resumen de los principales resultados para el objetivo 2.1.

En conjunto, nuestros resultados indican que NUA1, a través de la función de hnRNP, podría modular la expresión génica de diversas proteínas involucradas en el metabolismo celular. Dado que hnRNP se encuentra principalmente asociada a la regulación de procesos postranscripcionales, particularmente el empalme (splicing), es plausible proponer que NUA1 ejerza su efecto de manera mecánica sobre esta etapa del procesamiento del RNA.

En este contexto, nos enfocamos en evaluar el rol de NUA1 en el procesamiento del pre-mRNA de G6PD, considerando que la participación de hnRNP en la regulación de esta enzima ya había sido previamente descrita. Además, datos de nuestro laboratorio demostraron anteriormente que la pérdida de NUA1 reduce la expresión de G6PD, lo que sugeriría una conexión funcional entre ambas proteínas.

Mediante ensayos de qPCR y RIP, mostramos que NUA1 promueve el adecuado procesamiento del pre-mRNA de G6PD, efecto que se correlaciona con una disminución en la función de hnRNP, apoyando así un modelo en el que NUA1 modula selectivamente la actividad de hnRNP para favorecer la maduración del transcrito de G6PD (Fig 22).

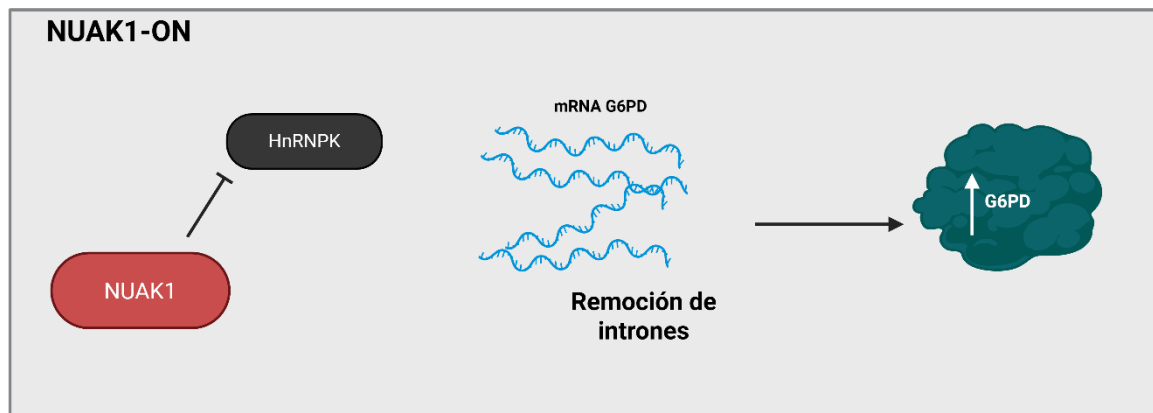


Figura 22: Modelo del mecanismo molecular de la regulación de NUA1 sobre el procesamiento del pre-mRNA de G6PD. NUA1 interacciona con hnRNP, inhibiendo su interacción con el pre-mRNA de G6PD. Como consecuencia, incrementa el procesamiento y promueve su expresión.

Objetivo 2.2. Evaluar el efecto de NUA1 sobre el metabolismo en células de cáncer colorrectal.

Dado que G6PD constituye el paso limitante y punto de entrada de la vía de las pentosas fosfato (PPP), y considerando que nuestros resultados previos sugieren una posible regulación por parte de NUA1, llevamos a cabo análisis metabólicos basados en trazado isotópico con glucosa marcada para evaluar su impacto sobre esta ruta metabólica. Para este propósito empleamos 1,2-¹³C₂-glucosa, un isótopo ampliamente validado por su mayor sensibilidad y precisión al momento de discriminar entre el flujo a través de la PPP y la glicólisis.

Dado que el flujo de carbono hacia la PPP representa aproximadamente un 5% del flujo glucolítico en condiciones basales, la detección de cambios en esta ruta puede resultar limitada cuando se evalúan únicamente pérdidas de función. Por esta razón, decidimos analizar el impacto de NUA1 mediante su sobreexpresión, considerando que un aumento de su actividad podría generar variaciones más evidentes.

Para este propósito, resultó crucial evaluar tanto el tiempo de incubación como la concentración de la glucosa marcada. Para evitar reorganizaciones del metabolismo debido a cambios en la concentración de glucosa, utilizamos 4,5 g/L de glucosa, la misma concentración presente en el medio rutinario utilizado para mantener las células SW480 (DMEM alto en glucosa). Por otra parte, la vía PPP comienza con la redirección de la glucosa-6-fosfato, es decir, el primer metabolito generado en la glucólisis. Debido a esto, la glucosa marcada se incubó por un tiempo reducido, con el fin de minimizar el reciclaje interno de metabolitos y evitar la contribución de flujos secundarios que pudieran dificultar la interpretación del destino del carbono. Además, este intervalo breve permitió aproximarnos a un estado estacionario (steady state) isotópico. Alcanzar este estado es fundamental, ya que garantiza que la proporción entre la entrada del trazador y su incorporación en las distintas rutas metabólicas se mantenga estable en el tiempo, permitiendo que las distribuciones isotópicas reflejen fielmente la actividad metabólica intrínseca de la célula y no variaciones transitorias derivadas de procesos de acumulación o dilución de metabolitos (Jang et al., 2018). Finalmente, dado que la presencia de moléculas con un carbono¹³ (¹³C) puede ocurrir de manera natural, la abundancia de los metabolitos m+1, aquellos que presentan únicamente un carbono marcado, fue corregida mediante la comparación con células mantenidas en ausencia del trazador.

En base a esto, se procedió a incubar las células SW480 en presencia de 4,5g/L de 1,2-¹³C₂-glucosa durante 2 y 4 horas (**Fig 23**), el fin de esto, era evaluar la presencia de metabolitos m+2, originados por el flujo directo de la glucosa hacia la glicólisis, y metabolitos M+2 o M+1 generados en la PPP

según el esquema (**Fig 24B**). Por otro lado, también se evaluó la presencia de metabolitos M+3 o de mayor nivel de marcaje según corresponda la molécula (Datos no mostrados), esto con fin de determinar la presencia de reciclaje de metabolitos. A partir de este experimento, observamos que, entre 2 y 4 horas, no hay diferencias en los flujos hacia la vía PPP y glicólisis, sugiriendo entonces que el intervalo evaluado corresponde a un punto donde los flujos están en estado estacionario. Por otro lado, la baja presencia de metabolitos M+3 o estado superior, en metabolitos de la vía PPP, sugiere que, en el tiempo evaluado, así como la concentración utilizada, es el correcto para evaluar el efecto de NUAK1 sobre la actividad de la PPP.

Basado en esto, evaluamos la distribución de marcaje con ^{13}C , en los distintos metabolitos correspondientes a glicólisis y PPP, siguiendo el esquema que representa las conversiones realizadas en cada paso (**Fig 24B**), esto bajo la sobreexpresión de NUAK1, dado que previamente habíamos validado que NUAK1 promovía la actividad de G6PD (**Fig 24A**). Basado en estos experimentos, evidenciamos que la sobreexpresión de NUAK1 disminuye el flujo de glucosa a través de la glicólisis, lo que se refleja en una reducción del marcaje M+2 en los intermediarios glucolíticos (**Fig 25**). En contraste, el aumento del 6-fosfogluconato M+2 (6PGA) y de las pentosas fosfato M+1 demuestra una mayor redirección del flujo metabólico hacia la vía de las pentosas fosfato (PPP). Adicionalmente, aunque no observamos un incremento en sedoheptulosa-7-fosfato (S7P), un metabolito de la rama no oxidativa de la PPP, sí detectamos un aumento en fructosa-1,6-bisfosfato M+1. Este metabolito podría originarse por la reincorporación del ^{13}C que ingresa a la PPP, transita desde la rama oxidativa hacia la no oxidativa y retorna en forma de fructosa-6-fosfato (F6P) hacia la glicólisis (**Fig 26**). **En conjunto, estos resultados indican que NUAK1 desvía activamente el flujo glucolítico hacia la PPP.**

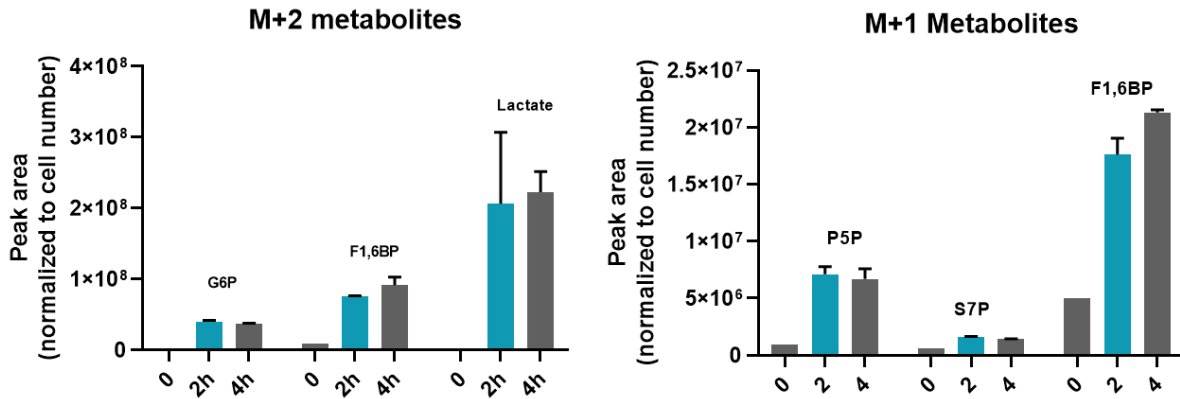


Figura 23: Estandarización de incubación con isótopo de glucosa. Células SW480, fueron crecidas en presencia de 4,5g/L de 1,2 ¹³C₂ glucosa, durante 0, 2 y 4h. Posteriormente, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en materiales y métodos. Glucosa-6-fosfato (G6P), Fructosa 1,6 bifosfato (F1,6BP), Lactato (Lactate), Pentosas 5 fosfato (P5P), Sehudoheptulosa 7 fosfato (S7P).

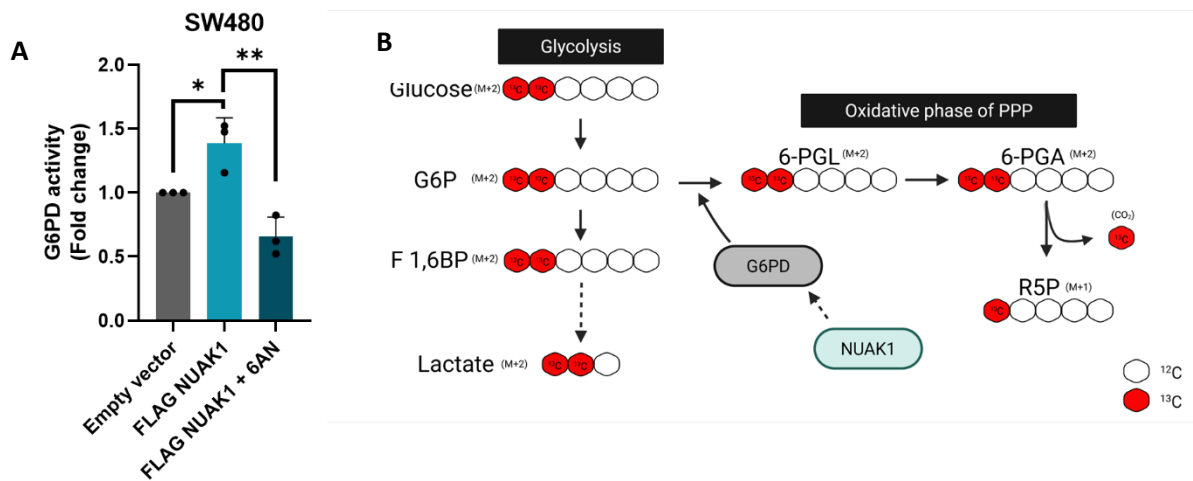


Figura 24: NUAK1 promueve la actividad de G6PD y esquema de análisis propuesto. A) Las células SW480, fueron transfectadas con el vector Flag hNUAK1 WT durante 48h o tratadas con el inhibidor de G6PD, 6-aminonicotinamida (6AN) a una concentración de 20uM durante 24h, luego la actividad de G6PD fue evaluada utilizando un kit comercial, los resultados obtenidos fueron normalizados en base a la concentración de proteína. B) Esquema propuesto para el análisis del efecto de NUAK1 sobre la actividad de la vía PPP.

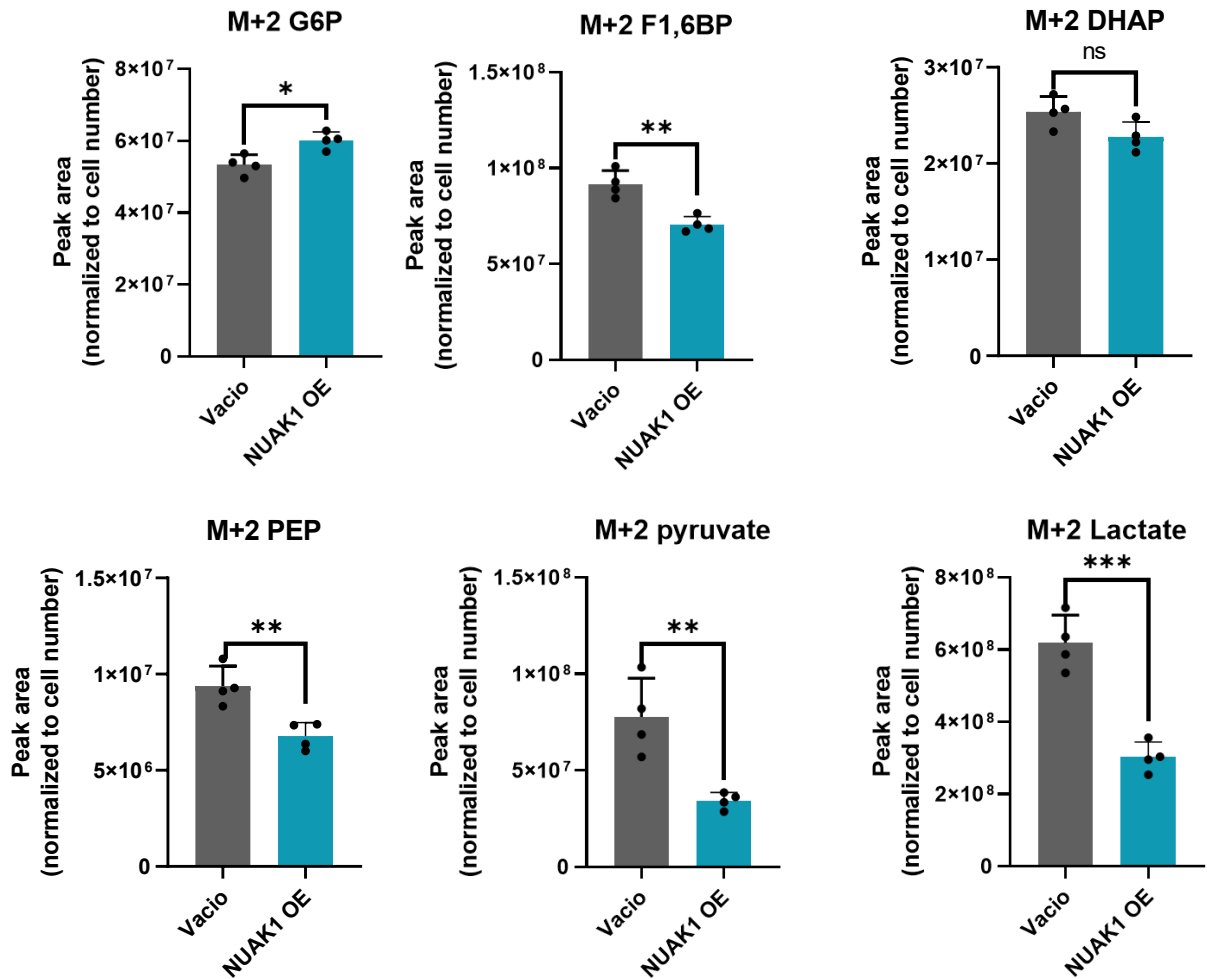


Figura 25: NUAK1 disminuye el flujo de 1,2-13C2 glucosa a través de la glicólisis. Células SW480 fueron transfectadas con el vector Flag hNUAK1 WT durante 48h, luego, fueron mantenidas durante 4h en presencia de 4,5g/L de 1,2-13C2 glucosa. Posteriormente, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en materiales y métodos. Glucosa-6-fosfato (G6P), Fructosa 1,6 bifosfato (F1,6BP), Dihidroxi acetona fosfato (DHAP), Fosfoenolpiruvato (PEP), Piruvato (Pyruvate), Lactato (Lactate). Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante t-student. *P<0,05, **P<0.01, ***P<0,001, No significativo (NS).

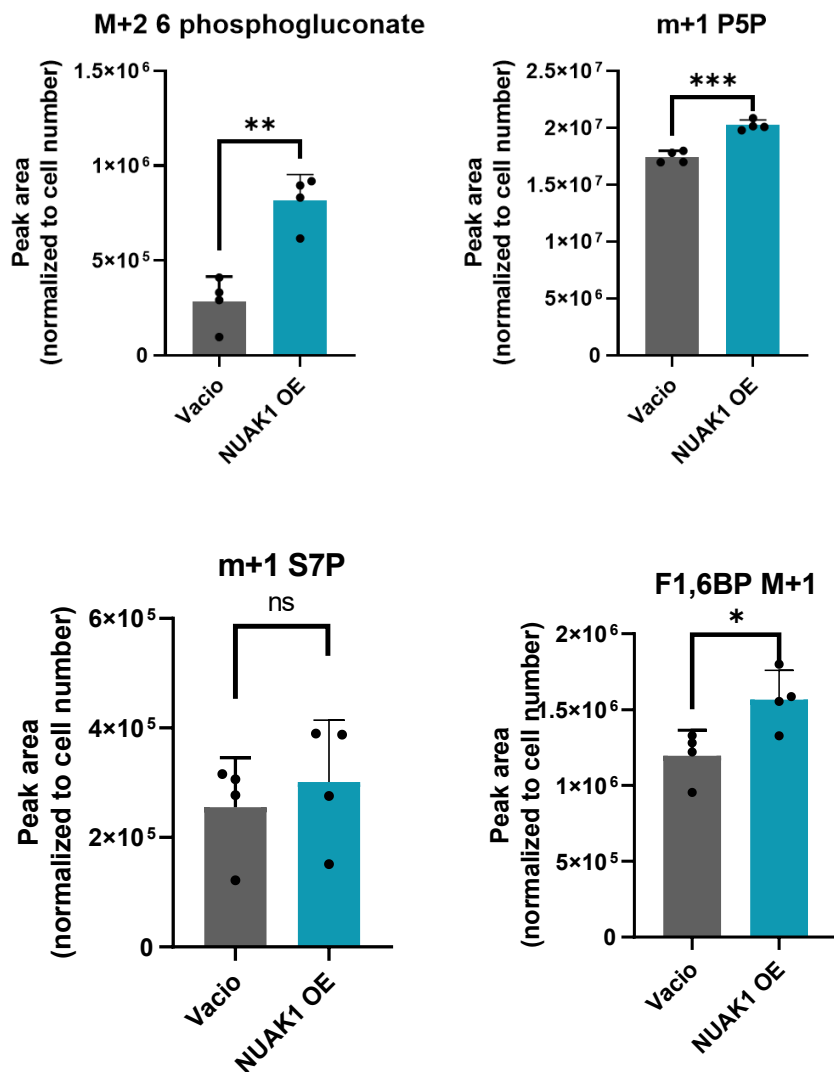


Figura 26: NUAK1 promueve el flujo de 1,2-13C2 glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato. Células SW480 fueron transfectadas con el vector Flag hNUAK1 WT durante 48h, luego, fueron mantenidas durante 4h en presencia de 4,5g/L de 1,2-13C2 glucosa. Posteriormente, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en materiales y métodos. 6 fosfogluconate (6 phosphogluconate), Pentosas 5 fosfato (P5P), Sedoheptulosa 7 fosfato (S7P), Fructosa 1,6 bifosfato (F1,6BP). Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante t-student. *P<0,05, **P<0.01, ***P<0,001, No significativo (NS).

Dado el rol de NUA1 en la activación de la vía de las pentosas fosfato (PPP), nos propusimos evaluar procesos celulares asociados a esta ruta metabólica. La PPP no solo contribuye al mantenimiento del equilibrio redox mediante la generación de NADPH, sino que también provee intermediarios esenciales para la biosíntesis anabólica (Patra et al., 2014). Por ello, resultaba fundamental determinar si la activación de la PPP dependiente de NUA1 se traducían en cambios funcionales medibles en células de cáncer colorrectal.

En primer lugar, investigamos la producción de NADPH y los niveles de ROS, parámetros que reflejan directamente el impacto de la PPP sobre la homeostasis redox. Dado que un aumento en el flujo hacia la PPP debiera favorecer la capacidad antioxidante celular, analizamos si la modulación de NUA1 alteraba esta relación. **En primer lugar, dado el rol de NUA1 en la expresión de G6PD, evaluamos su impacto a nivel de su actividad enzimática. Esto debido a que, una variación en los niveles de expresión de la proteína no se podría reflejar de manera estricta en cambios equivalentes en su actividad, debido a potenciales mecanismos postraduccionales compensatorios que ajusten su función.**

Sin embargo, consistente con datos anteriores, la inhibición de NUA1 disminuye de manera significativa la actividad de G6PD (**Fig 27A**). En base a esto, evaluamos los niveles de NADPH el cual es un metabolito central, en la regulación de diversos procesos, tales como la respuesta a estrés oxidativo, síntesis de lípidos y migración. Para esto, tratamos las células de CCR con el inhibidor de NUA1 y, consistente con otros estudios, la pérdida de función de NUA1 disminuye los niveles de NADPH (**Fig 27B**) e incrementa los niveles de ROS (**Fig 27C**). Estos resultados sugieren que NUA1, a través de la activación de la PPP, estaría regulando la homeostasis redox. Para validar esta hipótesis, evaluamos la dependencia de la PPP en la regulación de ROS mediada por NUA1. Analizamos los niveles de ROS en células con sobreexpresión de NUA1 en presencia o ausencia de inhibición de G6PD. Encontramos que la inhibición de G6PD revierte la disminución de ROS inducida por la sobreexpresión de NUA1, confirmando que la activación de la PPP es esencial para el rol de NUA1 en el control de la homeostasis redox (**Fig 28**).

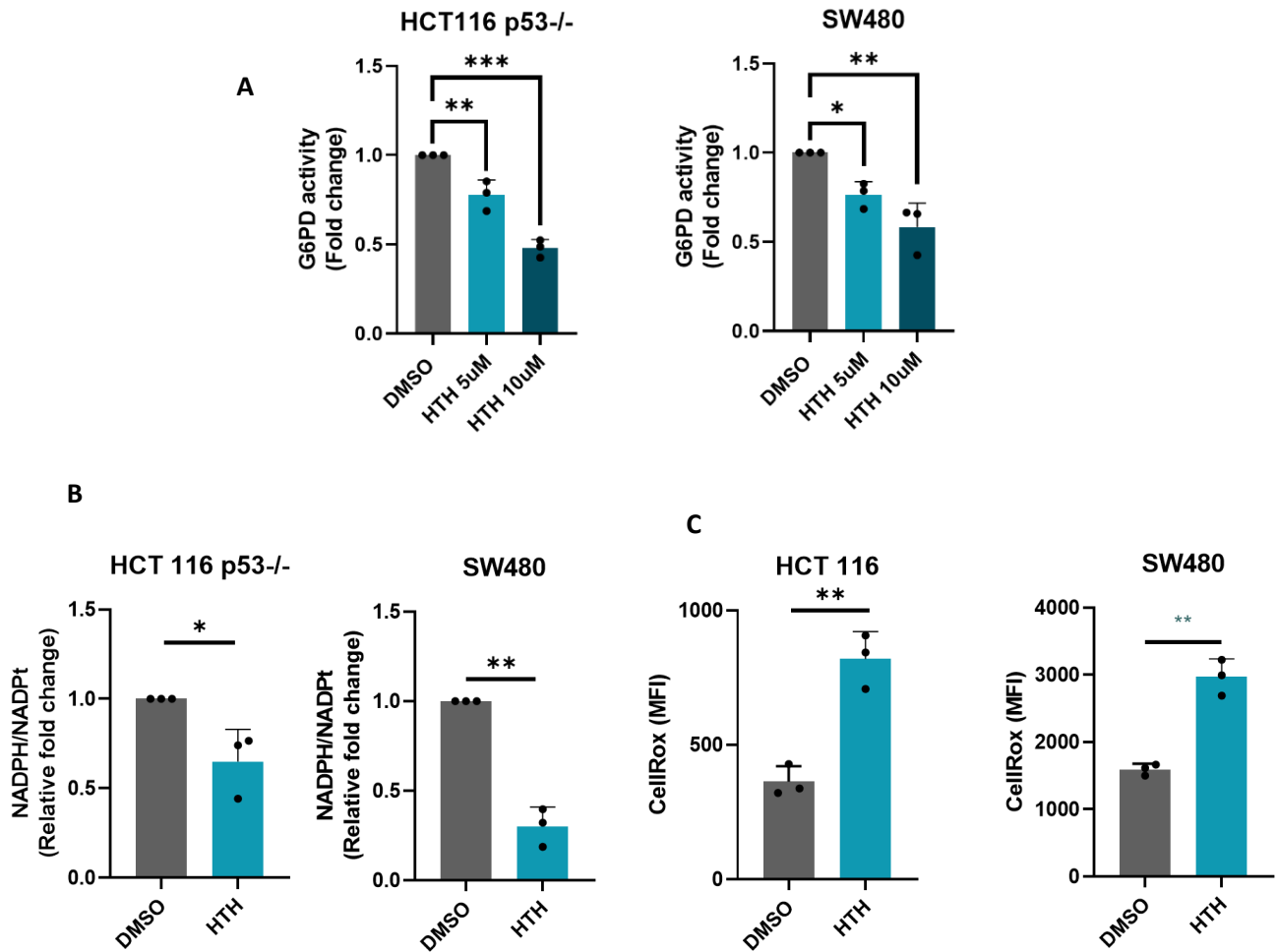


Figura 27: La inhibición de NUA1 disminuye la actividad de G6PD, disminuyendo los niveles de NADPH e incrementando el ROS. A) Células HCT116p53^{-/-} y SW480, fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 a 5 y 10uM durante 24h. Posteriormente la actividad de G6PD fue evaluada mediante un kit comercial y normalizada en base a la concentración de proteínas. B) Células HCT116p53^{-/-} y SW480, fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 a 10uM durante 24h. Los niveles de NADPH fueron evaluados mediante un kit comercial. C) Células HCT116p53^{-/-} y SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 a 10uM durante 24h, luego las células fueron teñidas con el colorante CellROX DeepRed, la intensidad de fluorescencia fue evaluada mediante citometría de flujo. Las barras representan la media y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante t-student. *P<0,05, **P<0.01.

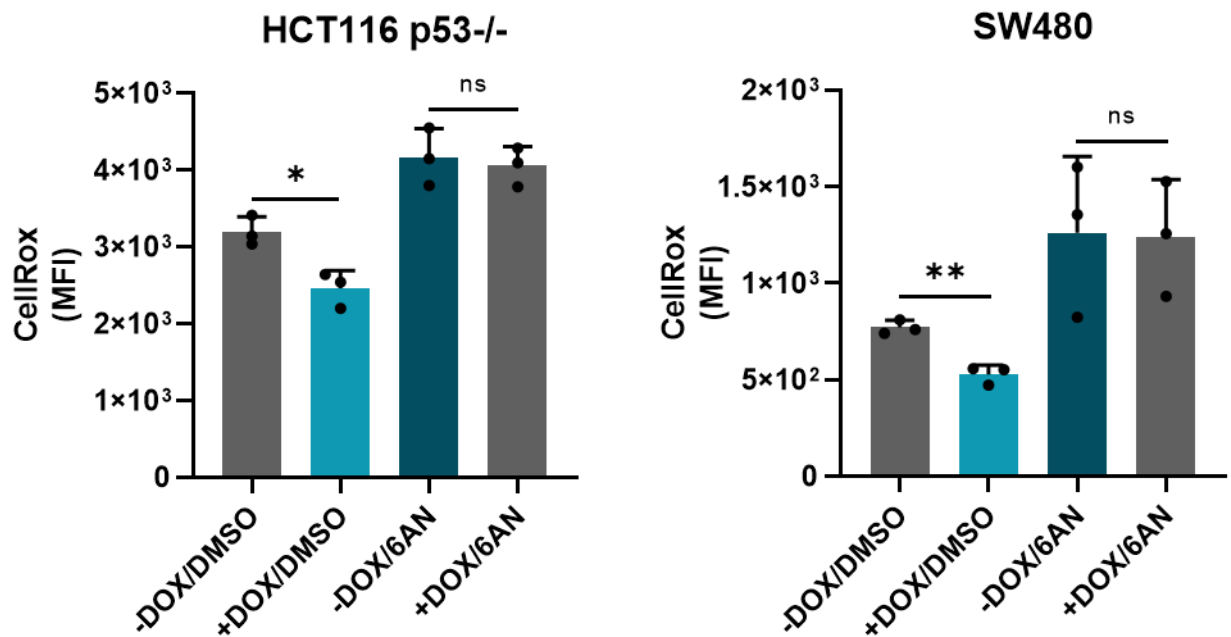


Figura 28: NUA1 disminuye los niveles de ROS dependiente de la función de G6PD. Células HCT116p53^{-/-} Flag hNUAK1 tet/on y SW480 Flag hNUAK1 tet/on, fueron estimuladas con doxiciclina (48h) y tratadas con el inhibidor de G6PD (6AN) durante 24h a 40uM. Luego, las células fueron teñidas con el colorante CellROX DeepRed, la intensidad de fluorescencia fue evaluada mediante citometría de flujo. Las barras representan la media y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante t-student. *P<0,05, **P<0.01, ns (no significativo).

De manera complementaria, evaluamos el rol de NUA1 en la acumulación lipídica. Estudios previos han mostrado que la pérdida de NUA1 induce una acumulación de colesterol como un mecanismo compensatorio para detoxificar el aumento de ROS intracelular (Gui et al., 2025). Sin embargo, este efecto se posiciona más bien como una consecuencia de la pérdida de NUA1, y no necesariamente como un proceso que NUA1 regule directamente. Basados en esto, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de NUA1 en la acumulación lipídica y la dependencia de G6PD en este proceso.

De manera interesante, la sobreexpresión de NUA1 incrementó la acumulación de lípidos intracelulares, y la inhibición de G6PD revirtió por completo este fenómeno, sugiriendo una dependencia de la PPP para esta función mediada por NUA1 (Fig 29). Para determinar si dicha acumulación lipídica se debía a la incorporación de lípidos desde el medio extracelular o a procesos intracelulares, como un aumento en la biosíntesis, estos experimentos fueron realizados en células mantenidas en medio sin FBS. La ausencia de suero elimina no solo factores de crecimiento, sino también una fuente relevante de lípidos exógenos. Por otro lado, la depleción de suero activa al factor SREBP1, el principal regulador de genes asociados a la síntesis de lípidos (Damiano et al., 2010). Por ello, esta condición permite potenciar la maquinaria biosintética, de modo que los cambios observados deberían reflejar principalmente procesos endógenos de síntesis lipídica.

Por otro lado, intermediarios de la PPP, como las pentosas fosfato, son fundamentales para la síntesis de novo de nucleótidos, un proceso indispensable para sostener la proliferación celular. Dado que la activación de la PPP por NUA1 podría impactar directamente la disponibilidad de estos precursores, surgió el interés de evaluar su rol en la progresión del ciclo celular. Esta idea se ve reforzada por estudios que muestran un aumento en los niveles de NUA1 durante la fase S (Banerjee et al., 2014), etapa en la que ocurre la replicación del ADN y, por lo tanto, existe una alta demanda de nucleótidos. En conjunto, estos antecedentes plantean la posibilidad de que NUA1 contribuya a la proliferación celular a través de la regulación metabólica mediada por la PPP.

Para explorar esta hipótesis, inicialmente evaluamos los niveles de bases nitrogenadas frente a la inhibición de NUA1. De manera interesante, observamos que la inhibición de NUA1 disminuye los niveles de guanina y citosina, pero incrementa los niveles de adenina (Fig 30). Estos datos sugieren que la pérdida de NUA1 genera un desbalance en el perfil de bases nitrogenadas y potencialmente a nivel de los desoxinucleótidos. **Sin embargo, aunque estos resultados apuntan a un posible impacto de NUA1 sobre la proliferación a través de la PPP, era necesario evaluar directamente este proceso. Por ello, medimos la proliferación en células HCT116 p53-/- tratadas con un**

inhibidor de NUA1, un inhibidor de G6PD y la combinación de ambos. De manera interesante, la inhibición de NUA1 tuvo un efecto más pronunciado sobre la proliferación que la inhibición de G6PD, y la combinación de ambas drogas potenció aún más este efecto. En conjunto, estos resultados sugieren que el rol de NUA1 sobre la proliferación celular podría ser, al menos en parte, independiente de la función de G6PD (Fig 31).

Para evaluar esta posibilidad, analizamos el ciclo celular bajo las mismas condiciones farmacológicas. **A partir de estos ensayos, determinamos que la inhibición de NUA1 induce un arresto en fase G1, en concordancia con estudios previos en otros tipos celulares (Banerjee et al., 2014). Por su parte, la inhibición de G6PD provoca un marcado arresto en fase S, mientras que la combinación de ambas drogas genera un patrón mixto, consistente con los efectos individuales (Fig 32).** En conjunto, estos resultados permiten concluir que, si bien NUA1 impacta en la disponibilidad de bases nitrogenadas, su efecto sobre la proliferación celular sería independiente de su rol en la regulación de G6PD y, por consiguiente, de la PPP.

Finalmente, tanto NUA1 como G6PD han sido relacionados con la regulación de la migración celular. En particular, NUA1 regula la expresión de diversos genes asociados a la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) (Yang et al., 2023), mientras que G6PD, al promover la actividad de la PPP, genera NADPH que es utilizado por las enzimas NADPH oxidasas (NOX) (Azevedo et al., 2015) para producir ROS en el frente de avance celular y, de este modo, favorecer la migración. Basados en estos antecedentes, evaluamos la dependencia metabólica en la regulación de la migración mediada por NUA1. Para ello, analizamos el efecto de la sobreexpresión de NUA1 en células tratadas con un inhibidor de G6PD.

Como era de esperarse, NUA1 promovió la migración celular, efecto que fue parcialmente revertido por la inhibición de G6PD. Esto sugiere que la regulación de la migración mediada por NUA1 depende en parte de su impacto sobre el metabolismo celular, particularmente a través de la PPP (Fig 33). Sin embargo, la reversión parcial también indica que existirían mecanismos adicionales mediante los cuales NUA1 regula este proceso, posiblemente vinculados a su papel en la expresión de genes asociados a la EMT.

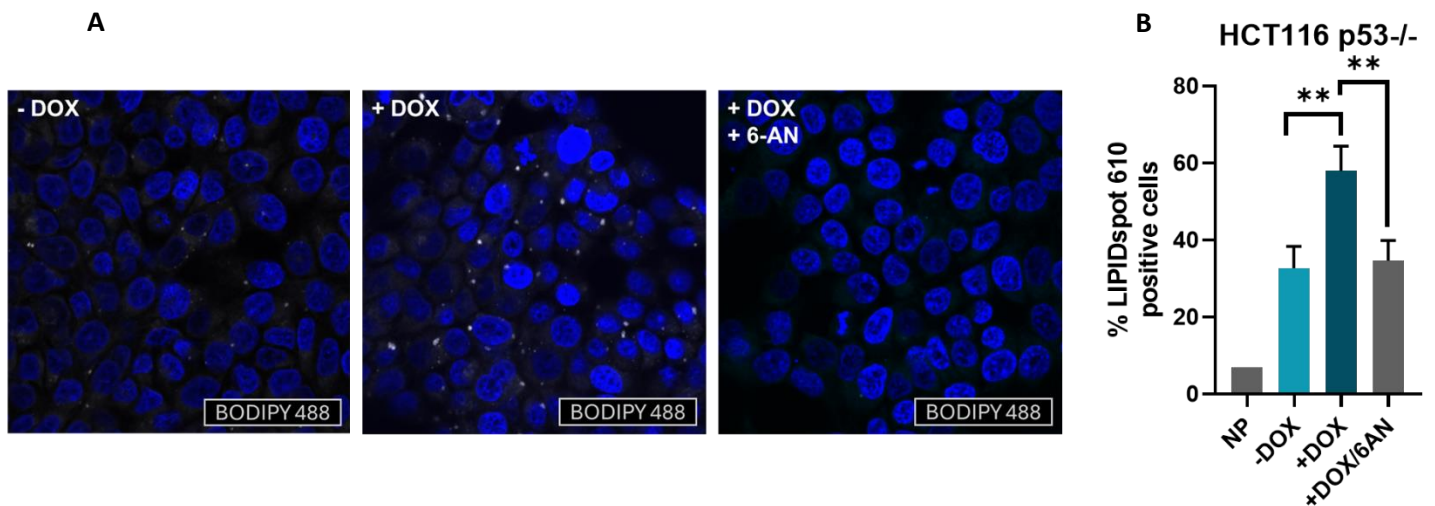


Figura 29: NUA1 promueve la acumulación lipídica dependiente de su función sobre G6PD. A) Análisis de microscopía confocal de células HCT116p53^{-/-} Flag hNUAK1 Tet/on, tratadas con doxiciclina (DOX) durante 48h y mantenidas en medio sin suero, en presencia o ausencia del inhibidor de G6PD (6-AN) durante 24h a 40uM. Las células fueron fijadas y teñidas con el colorante BODIPY-488 específico para la tinción de lípidos neutros. B) análisis de citometría de flujo de células HCT116p53^{-/-} Flag hNUAK1 Tet/on, tratadas con doxiciclina (DOX) durante 48h y mantenidas en medio sin suero, en presencia o ausencia del inhibidor de G6PD (6-AN) durante 24h a 40uM. Las células fueron fijadas y teñidas con el colorante LipidSpot610 específico para la tinción de lípidos neutros. Las barras representan la media y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante t-student. **P<0.01.

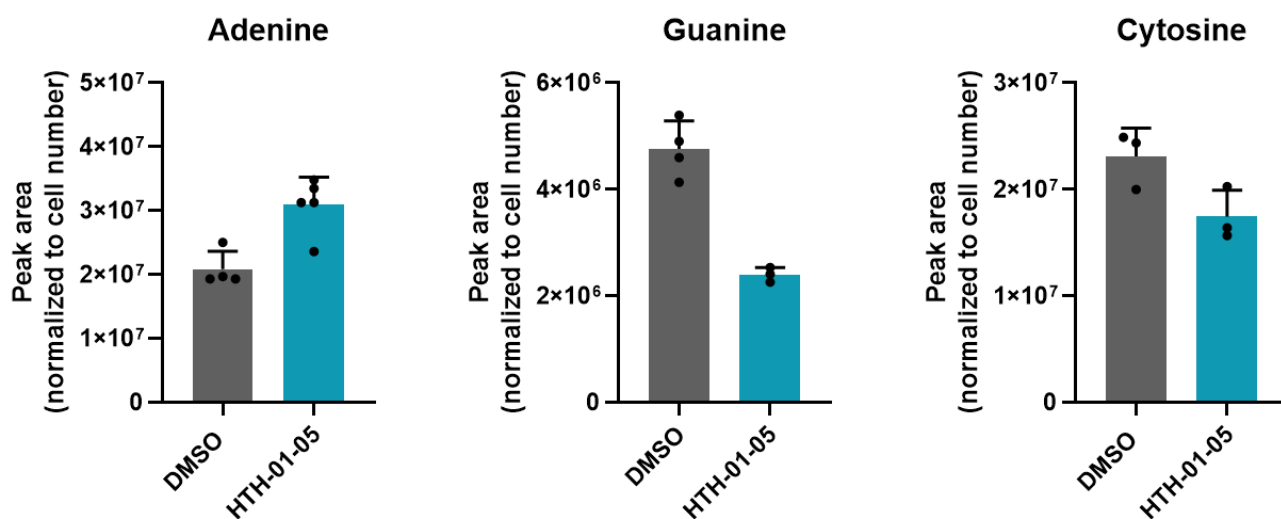
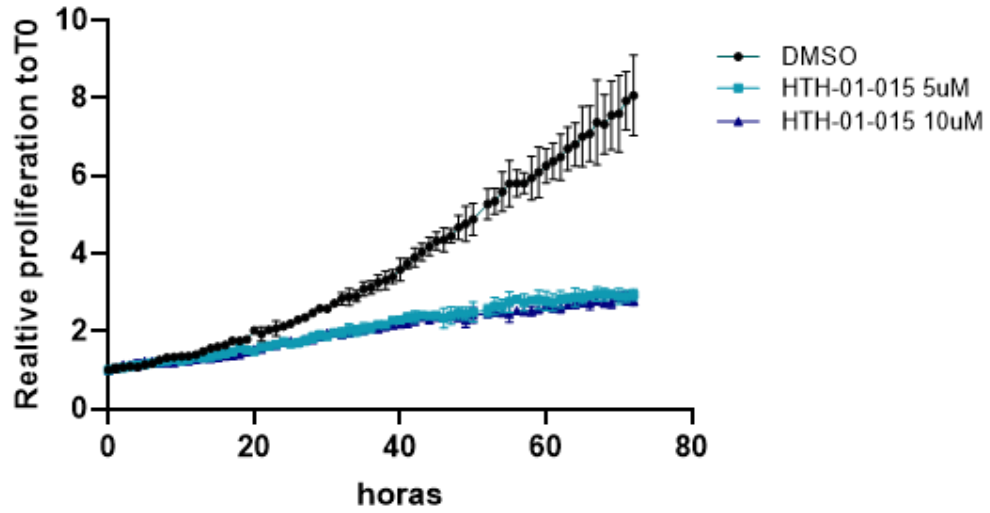
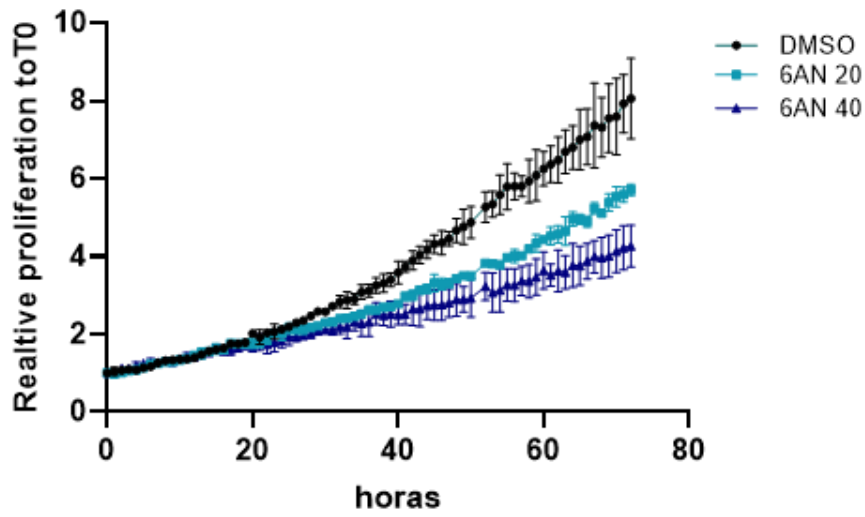


Figura 30: La inhibición de NUA1 produce un desbalance en los niveles de bases nitrogenadas. Células SW480, fueron tratadas con el inhibidor específico de NUA1 durante 24h a 10uM. Luego los distintos metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en materiales y métodos. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante t-student.

HCT116 p53^{-/-}



HCT116 p53^{-/-}



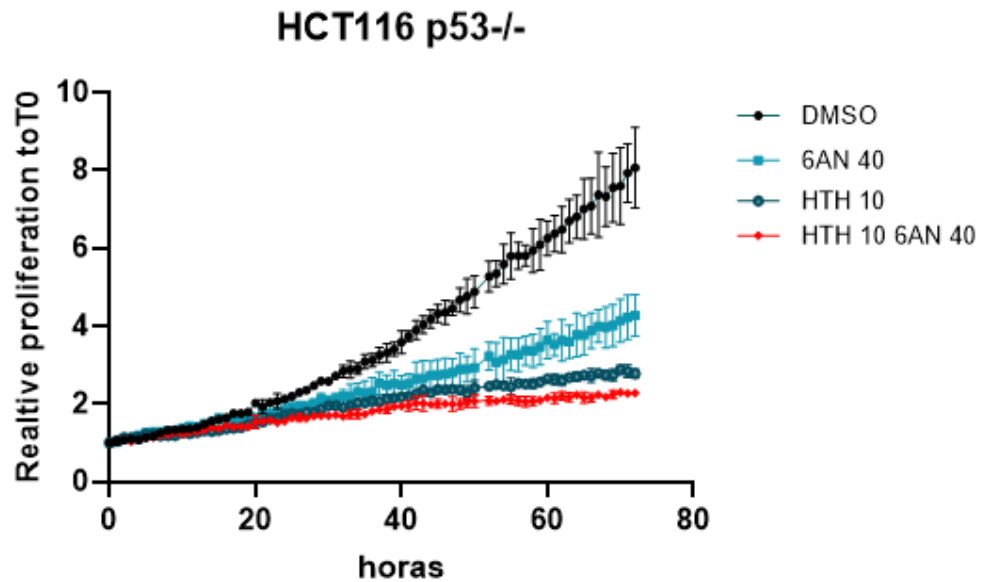


Figura 31: NUA1 afecta la proliferación celular en un mecanismo independiente de G6PD. Células HCT116p53^{-/-} fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 a 5 y 10uM (figura arriba) o el inhibidor de G6PD a 20 y 40uM (figura al medio), o las respectivas combinaciones (figura abajo) según lo descrito en la figuras, por 72h. La proliferación celular fue evaluada mediante el conteo celular a través de Incucyte.

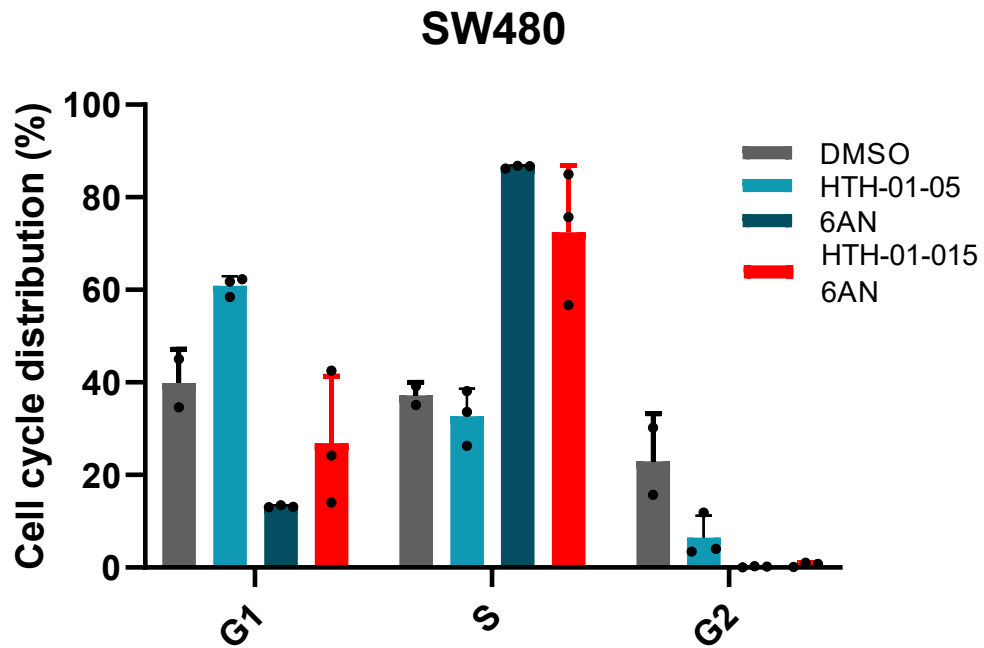


Figura 32: NUA1 afecta el ciclo celular en un mecanismo independiente de G6PD. A) Células SW480, fueron tratadas con el inhibidor de NAUK1 (10uM), G6PD (40uM) o la mezcla durante 24h. Luego, las células fueron fijadas en etanol y teñidas con yoduro de propidio para evaluar la cantidad de ADN. Los análisis fueron realizados mediante citometría de flujo, y la cuantificación del ciclo celular se realizó mediante el software Floreada.

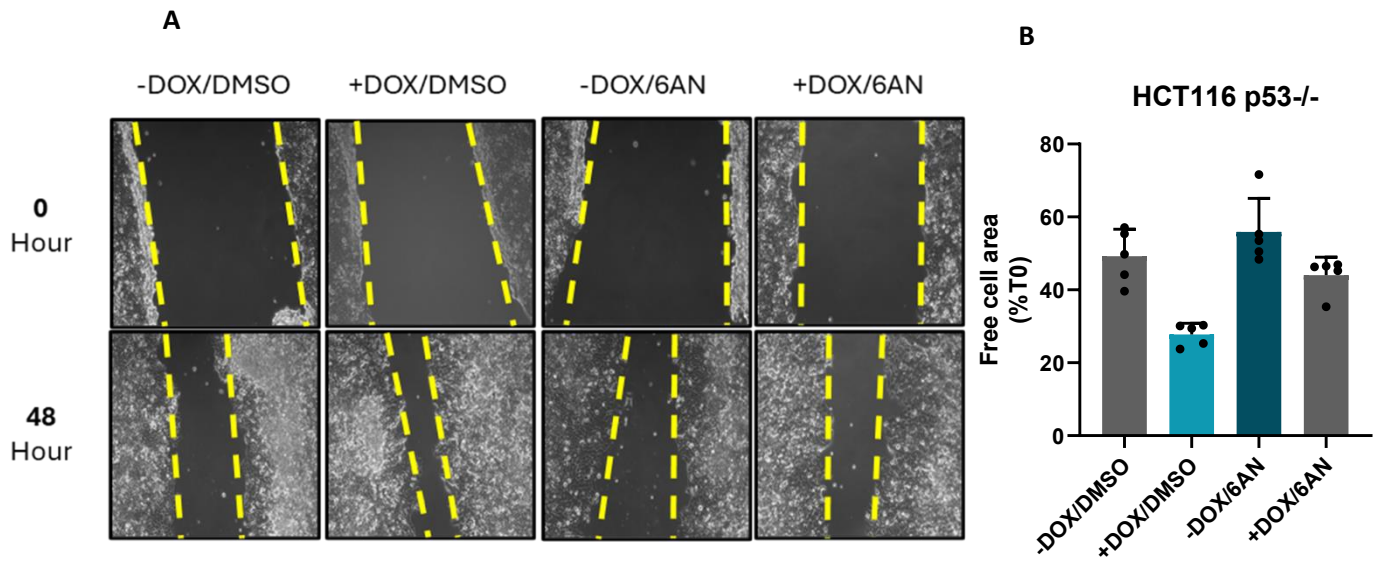


Figura 33: NUAK1 promueve la migración celular parcialmente a través de G6PD. A) Ensayo de cierre de herida en células HCT116p53^{-/-} Flag hNUAK1 tet/on tratadas con doxociclina (Dox) en presencia o ausencia del inhibidor de G6PD (40uM). B) Cuantificación de las condiciones evaluadas. El cierre de herida fue normalizado respecto al tamaño de la herida en tiempo 0h (T0). Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis de anova de dos vías como análisis estadístico de los datos.

Experimentos adicionales para el objetivo 2.2: Evaluación del efecto de NUA1 sobre la bioenergética celular y la homeostasis de purinas.

Dado que NUA1 ha sido previamente asociado a la regulación de la energía celular (Escalona et al., 2020), evaluamos los niveles de ATP y AMP para determinar su impacto sobre el metabolismo energético. Consistentemente, observamos que la pérdida de NUA1 reduce significativamente los niveles intracelulares de ATP, indicando una disminución en la capacidad celular para generar energía. De manera interesante, esta condición también se acompañó de un aumento en los niveles de AICAR (**Fig 34**), un intermediario de la biosíntesis de purinas que actúa como un “sensor” metabólico. Este metabolito participa en la activación de rutas de señalización en respuesta al estrés energético; en particular, AICAR es conocido por activar AMPK (Ducommun et al., 2013), promoviendo la inhibición de procesos biosintéticos y favoreciendo vías orientadas a restaurar el balance energético. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la pérdida de NUA1 no afecta la función de AMPK. **Adicionalmente, nuestros resultados indican que mTORC1 se activa frente a la pérdida de NUA1, lo que tampoco es consistente con la potencial acción de AICAR sobre AMPK.** En conjunto, estos hallazgos muestran que NUA1 contribuye a mantener la homeostasis energética, y que su ausencia conduce a un estado metabólico desfavorable cuya comprensión requiere estudios adicionales.

Consistente con el aumento observado en AICAR, detectamos un incremento en los niveles de IMP, lo que sugiere una regulación alterada del metabolismo de purinas. Por otra parte, aunque los niveles de xantina permanecieron sin cambios tras la inhibición de NUA1, observamos un aumento considerable en ácido úrico, el metabolito final del catabolismo de purinas (**Fig 35**). **Este patrón apunta a un posible incremento en la síntesis de nucleótidos seguido de una mayor degradación.**

Dado que parte de la vía de purinas converge en la generación de AMP y GMP, analizamos los niveles de sus productos finales, adenosina y guanosina respectivamente. **De manera interesante, observamos una disminución de adenosina y aumento de guanosina, acompañado de un incremento paralelo en sus niveles extracelulares (Fig 36)**, En conjunto, estos resultados apuntan a un desbalance global en el metabolismo de purinas asociado a la pérdida de NUA1, afectando tanto la síntesis, como la degradación y la redistribución de nucleósidos dentro y fuera de la célula.

Finalmente, dado que la pérdida de NUA1 resultó en una disminución significativa de los niveles intracelulares de ATP, examinamos rutas metabólicas adicionales que contribuyen al sostenimiento energético celular. En particular, evaluamos la β -oxidación de ácidos grasos, una vía esencial para la

generación de acetyl-CoA, NADH y FADH₂, con el objetivo de determinar si la reducción de ATP reflejaba una alteración global de la homeostasis energética. De manera interesante, observamos una disminución tanto en los niveles de carnitina como en los de acil-carnitinas, metabolitos indispensables para el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria a través del sistema carnitina-aciltransferasa. Estos resultados sugieren que la pérdida de NUA1 compromete la β -oxidación al limitar el ingreso de lípidos a la mitocondria, contribuyendo así al déficit energético observado (**Fig 37**).

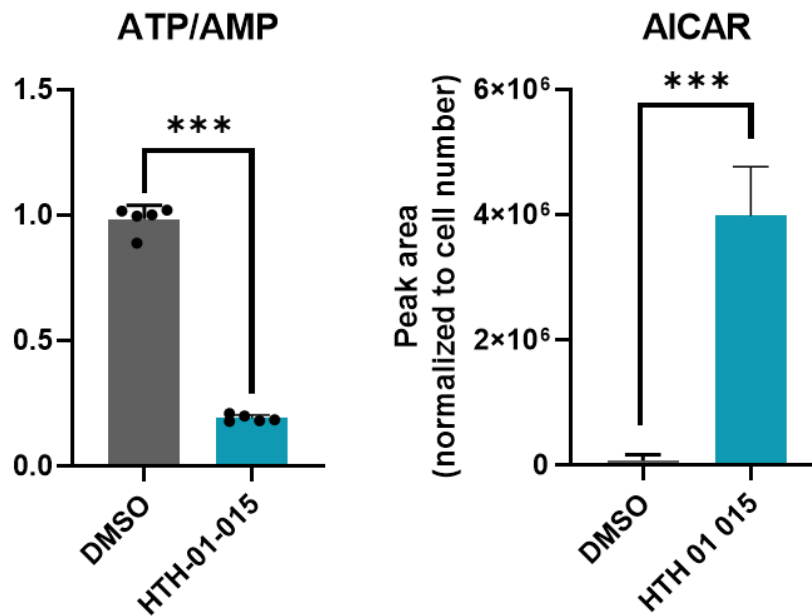


Figura 34: La pérdida de NUA1 disminuye los niveles de ATP e incrementa los niveles de AICAR. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico t-student. ***P<0.001.

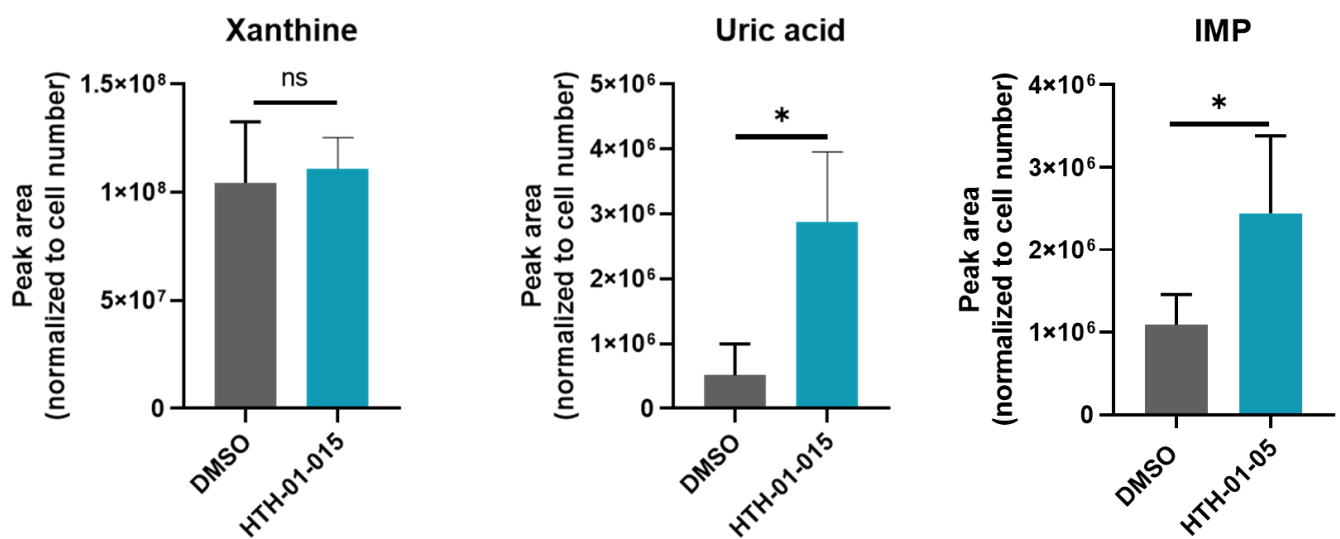


Figura 35: La pérdida de NUA1 incrementa el catabolismo de purinas. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico t-student. ***P<0.001.

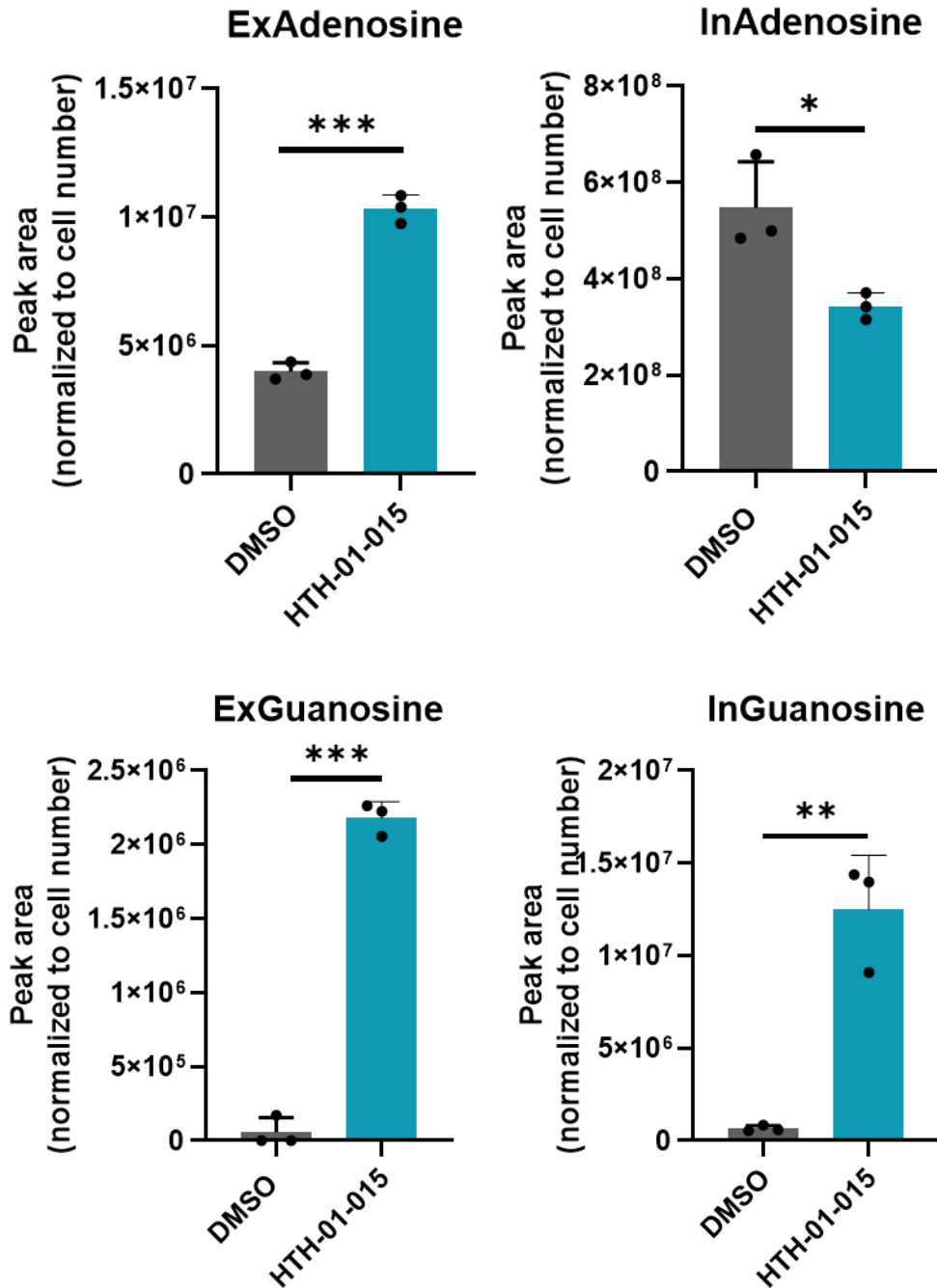


Figura 36: La pérdida de NUA1 promueve la excreción de adenosina y guanosina. Las células SW480, fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego los metabolitos extracelulares (Ex) e intracelulares (In) fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar.

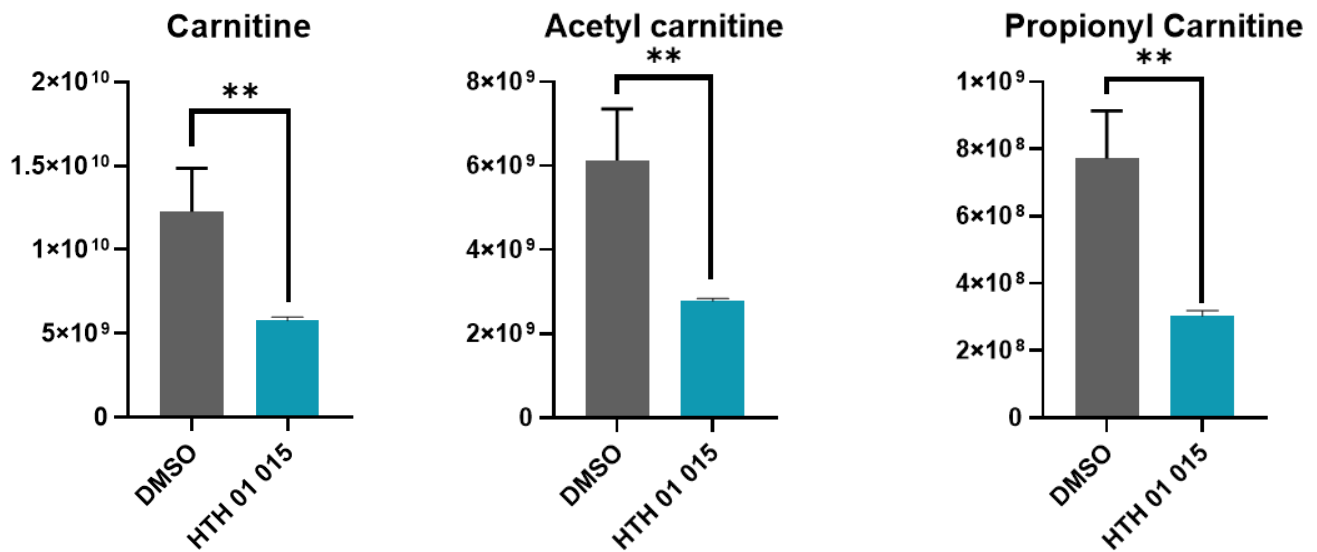


Figura 37: La pérdida de NUA1 disminuye metabolitos asociados a la B-oxidación. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico t-student. ***P<0.001.

Resumen de los principales resultados obtenidos para los experimentos del objetivo 2.2.

Con el fin de caracterizar el rol de NUAK1 sobre la vía de las pentosas fosfato (PPP) y los procesos celulares asociados, realizamos un conjunto de aproximaciones metabólicas y funcionales orientadas a determinar cómo esta quinasa modula el metabolismo en células de cáncer colorrectal. En primer lugar, implementamos análisis de trazado isotópico empleando 1,2-¹³C₂-glucosa. A partir de estos análisis, evidenciamos que NUAK1 redirecciona el flujo de glucosa hacia la PPP en cáncer colorrectal.

A continuación, evaluamos si la regulación de la PPP por NUAK1 se reflejaba en parámetros funcionales asociados a esta vía. En concordancia con la participación de G6PD como paso limitante de la PPP, observamos que la inhibición de NUAK1 redujo los niveles de NADPH y aumentó los niveles de ROS, evidenciando un compromiso en la capacidad antioxidante celular. De manera complementaria, la sobreexpresión de NUAK1 promovió una disminución de ROS, efecto que fue completamente revertido mediante la inhibición de G6PD. Estos resultados confirman que NUAK1 regula la homeostasis redox en un proceso dependiente de la activación de la PPP.

En el contexto de la biosíntesis lipídica, un proceso estrechamente ligado a la generación de NADPH por la PPP, evaluamos la acumulación de lípidos bajo sobreexpresión de NUAK1. De manera interesante, la sobreexpresión de esta quinasa aumentó significativamente la acumulación lipídica. Además, la inhibición de G6PD revirtió completamente este efecto, demostrando que NUAK1 modula la biosíntesis lipídica a través de su impacto sobre la PPP (**Fig 38A**).

La contribución de la PPP a la disponibilidad de precursores para la síntesis de nucleótidos motivó la evaluación del rol de NUAK1 en la proliferación celular. La inhibición de NUAK1 produjo un desbalance en el perfil de nucleótidos, con una disminución de guanina y citosina y un aumento de adenina. Aunque estos resultados sugerían una alteración metabólica con potencial impacto proliferativo, los ensayos funcionales mostraron que NUAK1 regula la proliferación mediante mecanismos parcialmente independientes de G6PD. Específicamente, la inhibición de NUAK1 tuvo un efecto más pronunciado sobre la proliferación que la inhibición de G6PD, y la combinación de ambos inhibidores produjo efectos aditivos. Los análisis de ciclo celular revelaron que la inhibición de NUAK1 induce un arresto en G1, mientras que la inhibición de G6PD provoca un arresto en fase S. En conjunto, estos resultados indican que NUAK1 afecta la proliferación celular a través de mecanismos independientes de la PPP.

Considerando la relevancia tanto de NUAK1 como de G6PD en la regulación de la migración celular, exploramos la dependencia metabólica de este proceso. La sobreexpresión de NUAK1 incrementó la capacidad migratoria de las células, y este efecto fue parcialmente revertido por la inhibición de G6PD. Esto sugiere que NUAK1 favorece la migración a través de mecanismos metabólicos dependientes de la PPP, aunque también podría ejercer efectos adicionales mediante la regulación de programas transcripcionales asociados a la transición epitelio-mesénquima.

Finalmente, examinamos la contribución de NUAK1 al mantenimiento de la energética celular. La pérdida de NUAK1 redujo de forma marcada los niveles intracelulares de ATP y aumentó los niveles de AICAR, un metabolito asociado al estrés energético. Junto con esto, detectamos un incremento de IMP y ácido úrico, sugiriendo que la biosíntesis de purina y la degradación se encontraban activas simultáneamente, demostrando una clara desregulación en esta ruta metabólica. Por otro parte, evidenciamos que la inhibición de NUAK1, paralelamente aumenta los niveles de adenosina y guanosina extracelular, los cuales podrían finalmente asociarse a las condiciones de estrés energético a las cuales están sometidas las células por la pérdida de esta quinasa.

Finalmente, consistente con la disminución en los niveles de ATP, observamos una disminución en metabolitos asociados a la B-oxidación, sugiriendo que la disminución de la energética celular, inducida por la pérdida de NUAK1, podría involucrar la desregulación de distintas rutas metabólicas asociadas a la síntesis de ATP (**Fig 38B**).

En conjunto, estos resultados muestran que NUAK1 constituye un regulador central del metabolismo celular en cáncer colorrectal. Su influencia abarca el flujo por la PPP, el control del estado redox, la biosíntesis lipídica, la disponibilidad de nucleótidos, la proliferación, la migración y la homeostasis energética. Estos hallazgos no solo permiten comprender de manera integrada el rol de NUAK1 en la biología tumoral, sino que también abren nuevas líneas de investigación sobre su potencial como diana terapéutica.

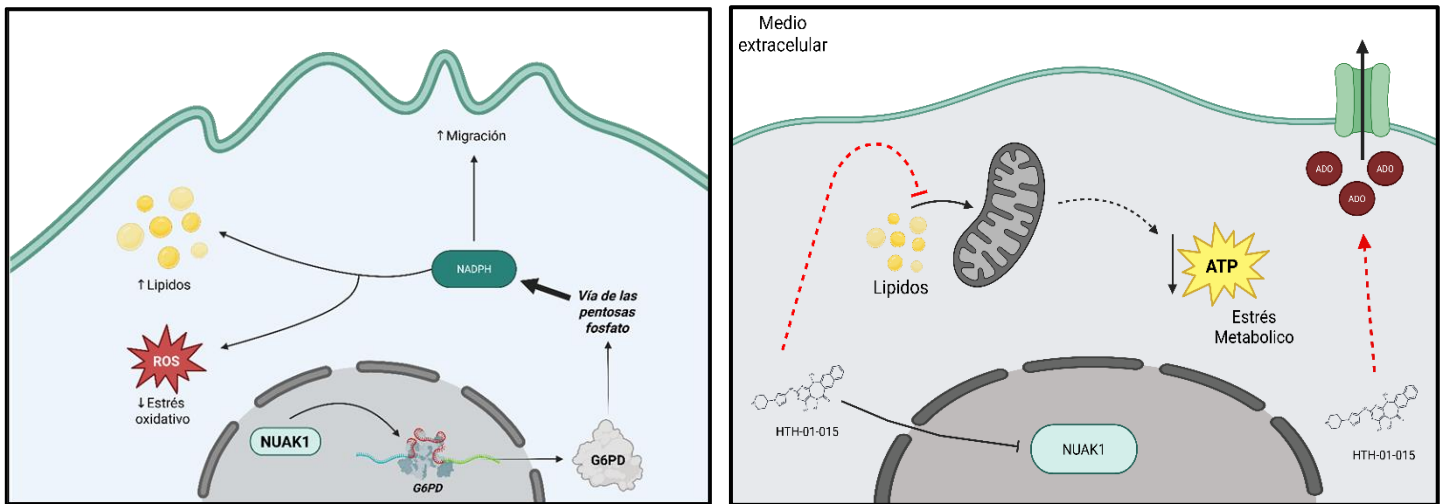


Figura 38. Representación gráfica de los principales efectos metabólicos de NUA1. NUA1 promueve el procesamiento del pre-mRNA de G6PD, incrementando su expresión y activando la PPP. El NADPH generado a través de la PPP, permite contrarrestar el estrés oxidativo, promover la síntesis de lípidos e incrementar la migración celular. La pérdida de NUA1, disminuye los niveles de ATP y la B-oxidación. Frente a este estrés energético, las células liberan adenosina al medio extracelular.

Experimentos adicionales objetivo 2. Evaluar el efecto de NUA1 en la resistencia a quimioterapéuticos.

La vía de las pentosas fosfato (PPP) constituye un eje central del metabolismo en cáncer, no solo por su contribución al anabolismo celular, sino también por su rol crítico en la generación de NADPH y en la respuesta frente al estrés oxidativo. En este contexto, múltiples estudios han demostrado que la activación de la PPP favorece mecanismos de quimioresistencia, posicionándola como un nodo metabólico clave en la adaptación tumoral a agentes citotóxicos (Chen et al., 2020). En cáncer colorrectal, esta reprogramación metabólica adquiere particular relevancia frente al uso de quimioterapéuticos basados en platino, como el oxaliplatino, un componente fundamental de los esquemas de segunda línea utilizados en pacientes en estadios avanzados del cáncer colorrectal.

El mecanismo de acción del oxaliplatino se basa principalmente en su capacidad para inducir daño genómico mediante la formación de entrecruzamientos intra e intercadena en el ADN. Sin embargo, solo una fracción menor del platino intracelular alcanza el núcleo, lo que sugiere la existencia de mecanismos citotóxicos adicionales (Arango et al., 2004). Entre ellos destaca la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que inducen estrés oxidativo y daño en múltiples componentes celulares. Como respuesta, las células tumorales activan rutas metabólicas antioxidantes, incluyendo la PPP, para contrarrestar estos efectos. De hecho, estudios en organoides derivados de pacientes y en modelos de cáncer colorrectal han demostrado que el tratamiento con oxaliplatino incrementa la actividad de la PPP y la expresión de G6PD, cuya disminución sensibiliza significativamente a las células al tratamiento (Ju et al., 2017).

Considerando estos antecedentes, y dado nuestro hallazgo previo de que NUA1 modula la expresión de G6PD, planteamos que esta quinasa podría influir en la respuesta al oxaliplatino mediante la regulación del metabolismo redox. Por ello, evaluamos experimentalmente el rol de NUA1 en la sensibilidad a oxaliplatino en modelos de cáncer colorrectal.

Dado que G6PD aumenta sus niveles en respuesta a oxaliplatino, evaluamos la expresión de NUA1 en células expuestas al fármaco. De manera interesante, el tratamiento incrementó significativamente la expresión de NUA1 (**Fig 39**). Considerando que Nrf2 se activa bajo tratamiento con oxaliplatino (Yang et al., 2021) y que el promotor de NUA1 contiene sitios ARE dependientes de Nrf2 (Port et al., 2018), analizamos la actividad del promotor de NUA1 mediante ensayos de luciferasa y evaluamos sus niveles de ARNm mediante qPCR. Estos experimentos mostraron una disminución tanto en la actividad del promotor como en los niveles de ARNm de NUA1 tras la

exposición al fármaco (**Fig 40**), sugiriendo que el aumento proteico observado podría deberse a otros mecanismos, como cambios en la estabilidad proteica o en un aumento en la traducción de NUA1. Cabe destacar que oxaliplatino activa la vía mTORC1, por lo que un aumento en la traducción proteica podría contribuir a este efecto; sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia que vincule directamente la actividad de mTORC1 con la regulación de NUA1, planteando una hipótesis interesante para estudios futuros.

El aumento de G6PD tras oxaliplatino es un proceso que podría depender de Nrf2 y NUA1, por su parte, NUA1 se ha asociado con la regulación de Nrf2 a través del control de GSK3 β en el citosol. Entonces, evaluamos la distribución subcelular de NUA1 bajo oxaliplatino, para determinar si su rol en la quimioresistencia al fármaco podría deberse a mecanismos nucleares o citosólicos. De manera interesante, **observamos que el aumento total de NUA1 inducido por oxaliplatino corresponde específicamente a un incremento de la fracción nuclear (Fig 41)**, reforzando la idea de que las funciones protumorales de NUA1 en cáncer de colon se ejercen principalmente en el núcleo. Este aumento nuclear es coherente además con su rol en el splicing de G6PD, sugiriendo que NUA1 podría ser necesario para promover su expresión en respuesta al fármaco. En concordancia con esta hipótesis, la inhibición de NUA1 en células SW480 bloqueó por completo el aumento de G6PD inducido por oxaliplatino (**Fig 42**), indicando que la actividad de NUA1 es crucial para esta respuesta.

Mediante ensayos de Incucyte, evaluamos el efecto de inhibir NUA1 en combinación con oxaliplatino. Tal como se ha descrito, las células de cáncer colorrectal presentan alta tolerancia a ambos agentes individualmente, con una muerte celular que no supera el 30%. Sin embargo, la combinación de HTH-01-015 y oxaliplatino generó un incremento sustancial de la muerte celular en ambas líneas, demostrando que la inhibición de NUA1 sensibiliza a las células al tratamiento (**Fig 43**). Dado que el principal mecanismo por el cual Oxaliplatino desencadena la muerte celular corresponde a la generación de daño en el ADN, evaluamos si este aumento en la muerte celular, observado en la combinación de ambos fármacos, se correlacionaría con un aumento en el estrés genotóxico, para esto, realizamos ensayos de cometa, los cuales mostraron que la inhibición de NUA1 potencia significativamente el daño en el ADN inducido por oxaliplatino (**Fig 44A**). De manera consistente, los análisis de Inmunocitoquímica revelaron un aumento en la señal de la variante de histona fosforilada γ H2A.X, marcador de roturas de doble cadena de ADN, en las células tratadas con la combinación (**Fig 44B**).

Además, este análisis permitió evaluar la morfología nuclear, mostrando que la pérdida de NUA1 induce fragmentación nuclear (núcleos en “donut”), mientras que oxaliplatino por sí solo no genera alteraciones marcadas. Sin embargo, la combinación de ambos fármacos aumenta la fragmentación nuclear, apoyando la hipótesis de que la mayor muerte celular estaría dado por un incremento en el estrés genotóxico.

Si bien estos hallazgos en líneas celulares son relevantes, los cultivos en 2D presentan limitaciones y no siempre replican la respuesta clínica. Por ello, utilizamos organoides derivados de pacientes (PDOs), una herramienta que recapitula de mejor manera la arquitectura y heterogeneidad tumoral. Antes de abordar la respuesta farmacológica, validamos que NUA1 regula la expresión de G6PD también en este sistema (**Fig 45**). Posteriormente, los ensayos de viabilidad demostraron que, al igual que en líneas celulares, la inhibición de NUA1 sensibiliza a los PDOs al oxaliplatino (**Fig 46**). No obstante, este efecto fue más evidente en organoides provenientes de tumores avanzados. En contraste, un PDO derivado de un tumor en estadio inicial no respondió a la inhibición de NUA1, sugiriendo que la eficacia terapéutica de esta combinación podría depender del estadio y posiblemente de la agresividad tumoral.

Finalmente, un análisis de correlación entre los niveles de expresión de NUA1 y la sensibilidad a oxaliplatino en diversas líneas celulares mostró que niveles elevados de NUA1 se asocian con menor respuesta al fármaco (**Fig 47**). En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de NUA1, en combinación con oxaliplatino, podría constituir una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer colorrectal.

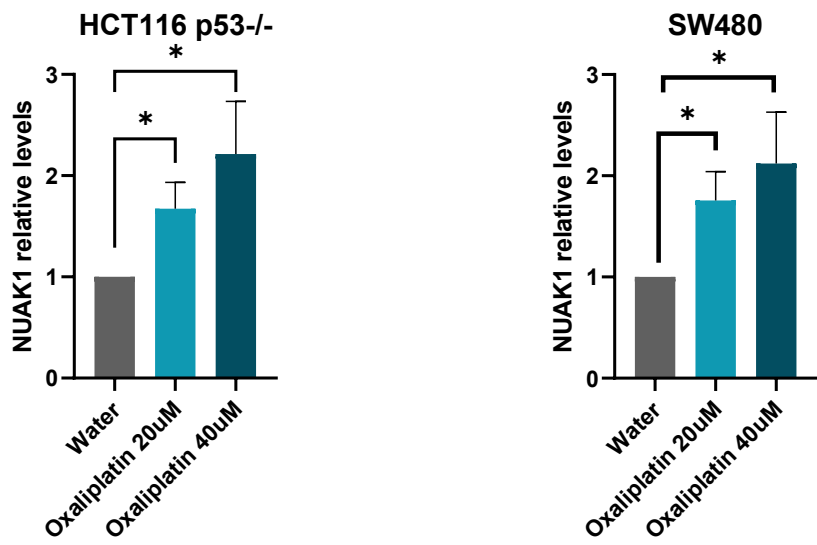
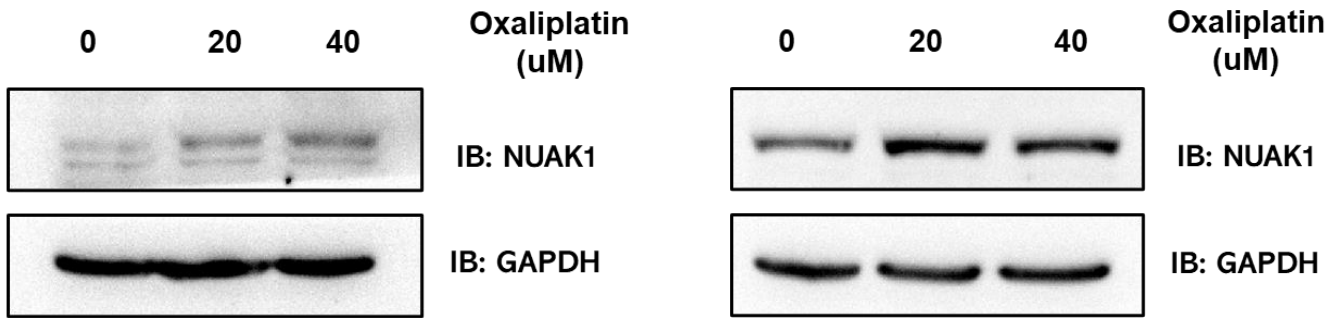


Figura 39: NUAK1 incrementa su expresión frente a Oxaliplatino. Panel superior: Células HCT116 p53-/- y SW480, fueron tratadas con oxaliplatino a 20 y 40 uM durante 24h. Los niveles de NUAK1 fueron evaluados mediante western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga. Panel inferior: Densitometría de los niveles de NUAK1 normalizados respecto a GAPDH, las barras corresponden al promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de t-student de una muestra. *P<0.05.

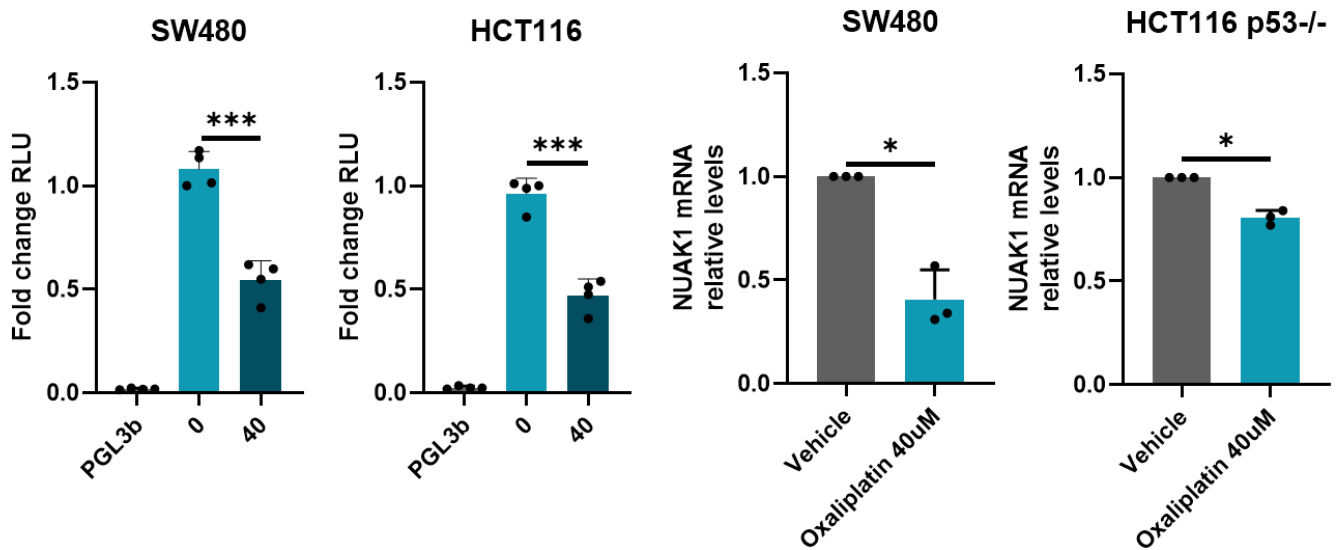


Figura 40: La actividad del promotor y los niveles de ARNm de NUAK1 disminuyen frente a Oxaliplatino. Células HCT116 p53^{-/-} y SW480, fueron transfectadas con el vector pGL3 mNUAK1 promotor, durante 48h. Adicionalmente, las células fueron estimuladas con oxaliplatino (40uM) durante 24h. Luego la actividad del reportero fue evaluada mediante el kit luciferase assay system. La actividad del reportero de NUAK1 fue normalizada utilizando la señal del reportero SV40- Bgal. B) Análisis de qPCR utilizando partidores específicos para la detección de NUAK1. Las células fueron tratadas con oxaliplatino (40uM) durante 24h. Los niveles de NUAK1 fueron normalizados a los niveles de B-actina para cada condición. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis de t-student de una muestra, respectivamente. *P<0.05, ***P<0.001.

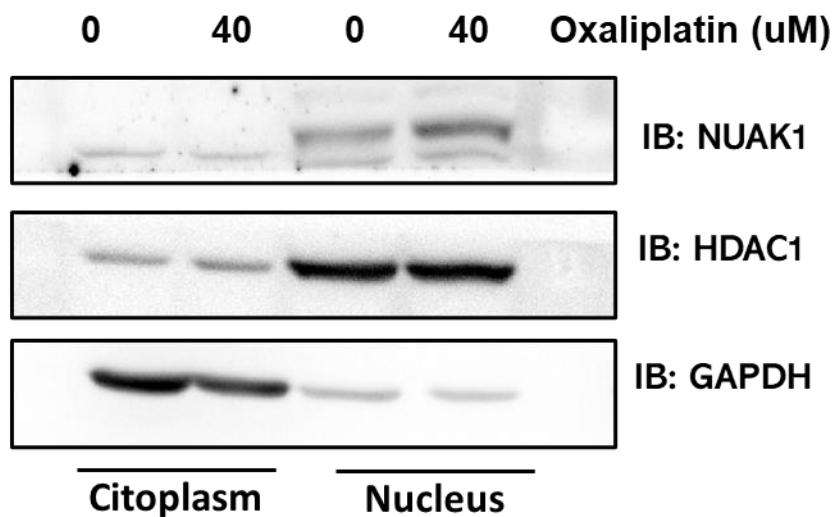


Figura 41: NUAK1 aumenta a nivel del núcleo de células HCT116p53^{-/-} frente a oxaliplatino. Células HCT116 p53^{-/-} fueron tratadas con oxaliplatino (40uM) durante 24h. Luego, las fracciones nucleares y citoplasmáticas fueron aisladas, mediante fraccionamiento subcelular. Los niveles de NUAK1 en las fracciones fue evaluada mediante western blot. HDAC1 y GAPDH fueron utilizados como control de la fracción nuclear y citoplasmática, respectivamente.

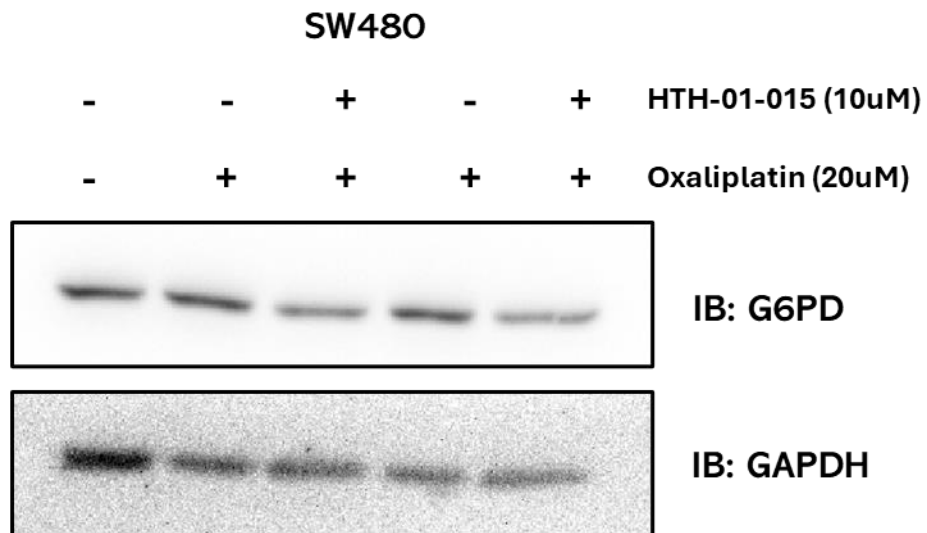


Figura 42. La pérdida de NUA1, disminuye el aumento en G6PD mediado por oxaliplatino. Celulas SW480 fueron tratadas durante 48h con oxaliplatino (20uM) y HTH-01-015 (10uM). Luego los niveles de G6PD fueron evaluados mediante western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga.

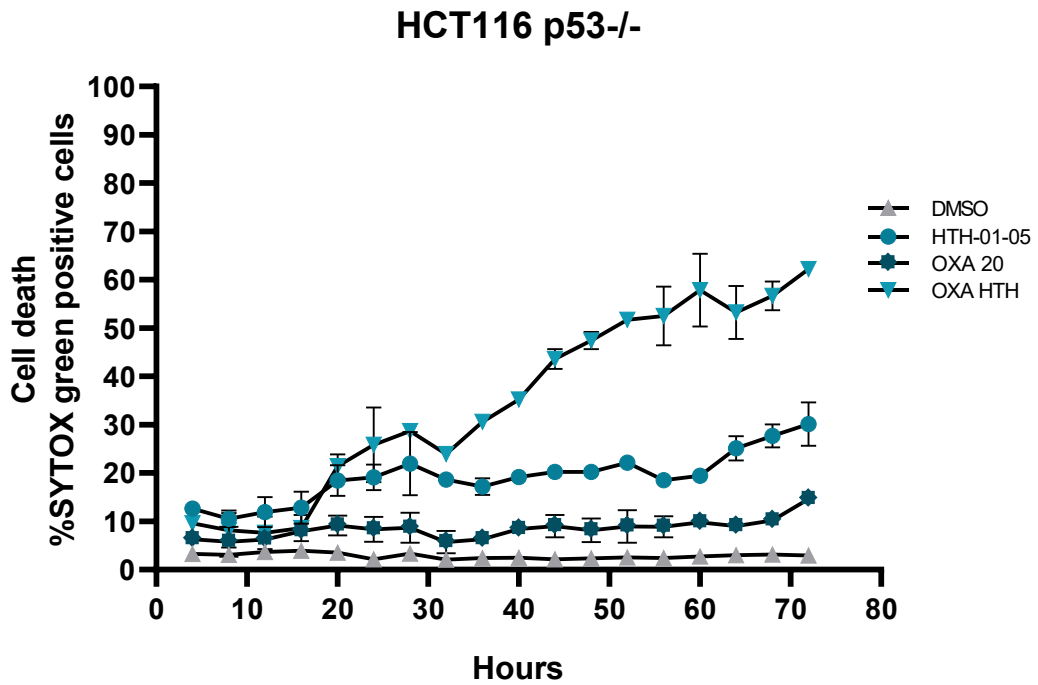
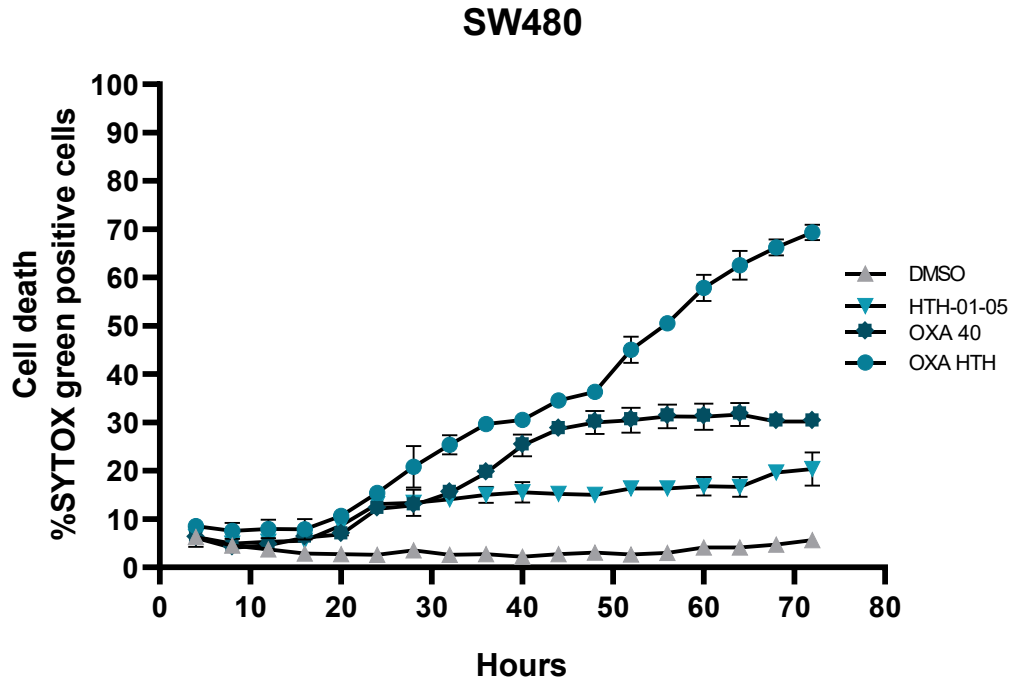
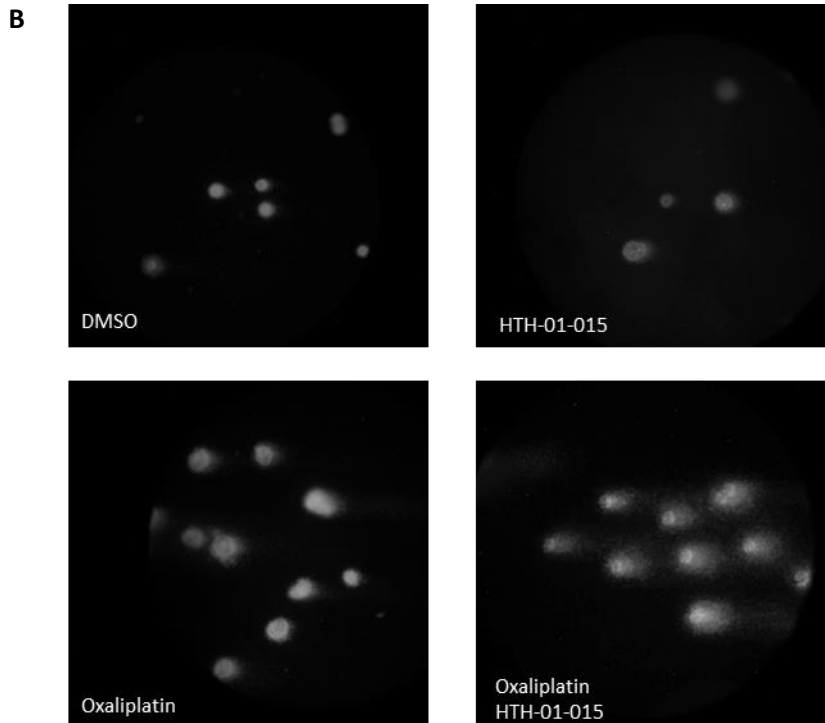
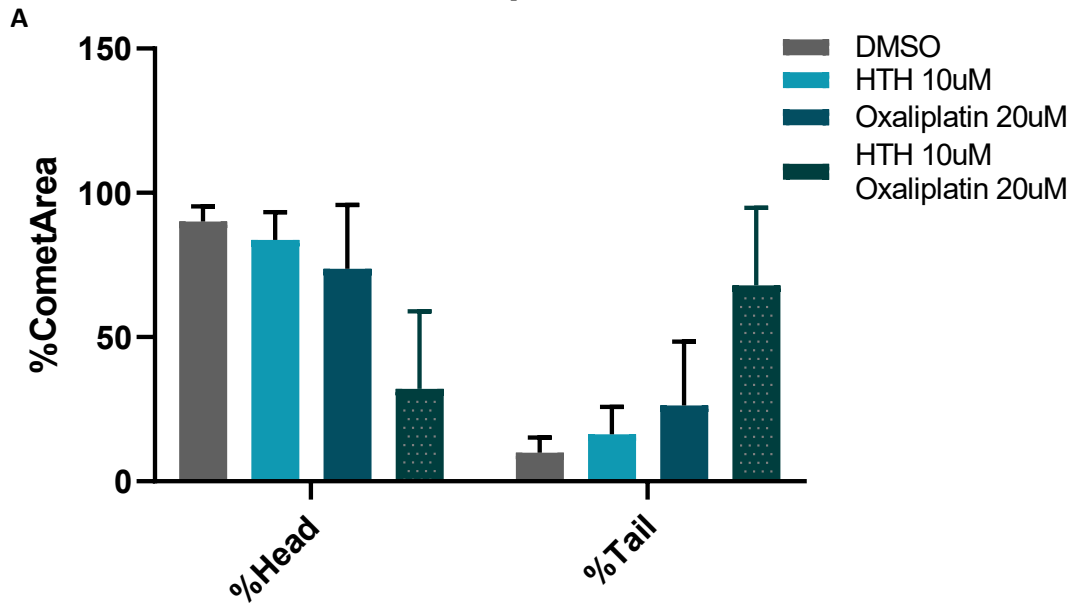


Figura 43: La inhibición de NUA1 sensibiliza a células de CCR frente a Oxaliplatino. Células HCT116p53^{-/-} y SW480, fueron tratadas con Oxaliplatino (20uM) y HTH-01-015 (10uM) durante 72h. La viabilidad celular fue evaluada mediante IncuCyte utilizando el reactivo SytoxGreen. Las imágenes fueron tomadas cada 1h.

HCT116 p53^{-/-}



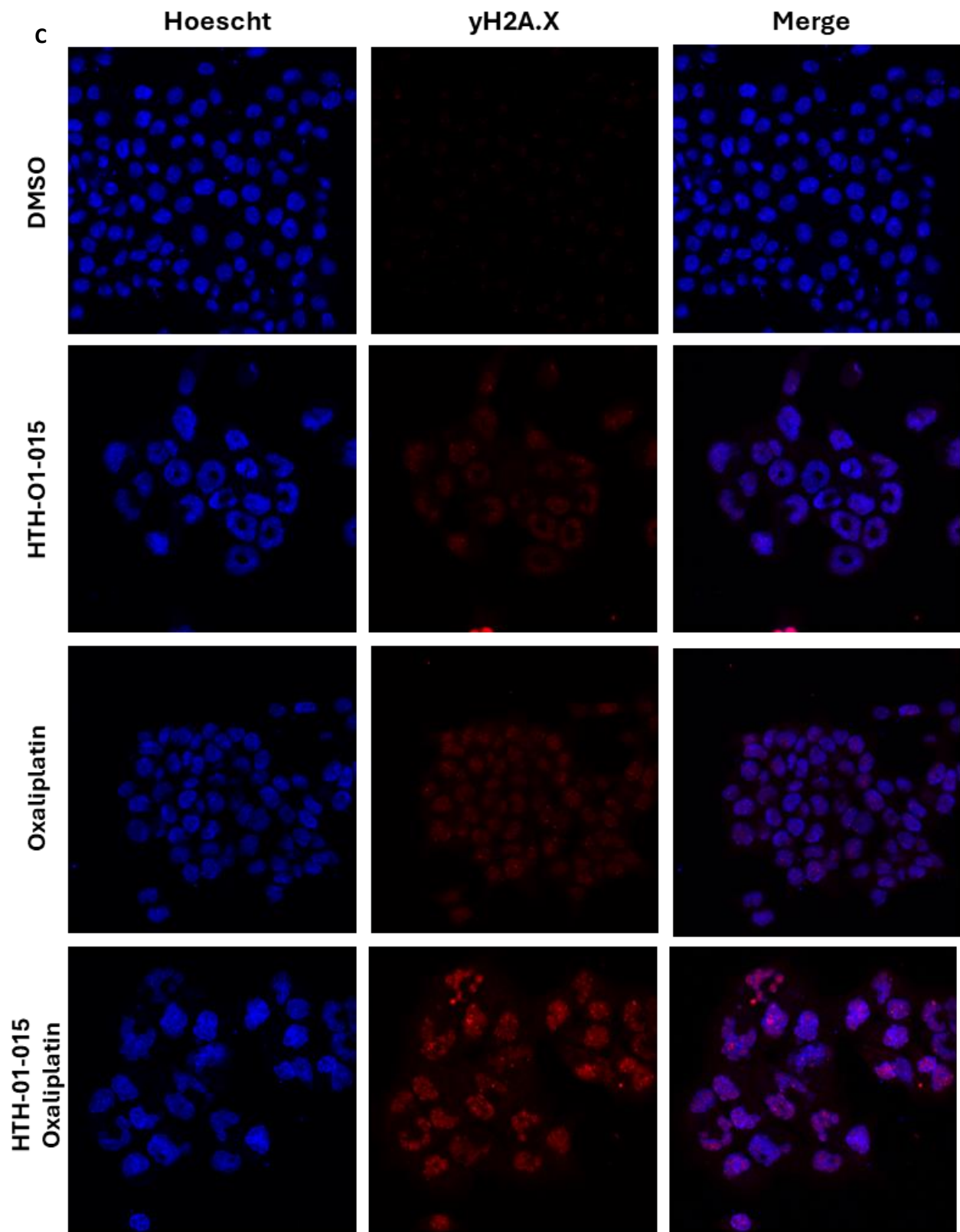


Figura 44. La inhibición de NUA1 incrementa el estrés genotóxico inducido por Oxaliplatino. A) Células HCT116p53^{-/-} fueron tratadas con oxaliplatino (20uM), HTH-01-015 (10uM) y la combinación durante 48h. Luego, se realizó un ensayo cometa para evaluar la fragmentación del ADN. Luego de la electroforesis, el ADN fue teñido utilizando el reactivo GelRed, y las células fueron fotografiadas mediante microscopia de fluorescencia. La longitud de la cabeza y cola fue evaluada mediante un paquete de ImageJ, las barras representan el promedio y la desviación estándar, se aplicó un análisis anova de dos vías como test estadístico. B) Imágenes representativas tomadas por microscopia de fluorescencia para cada condición. C) Células HCT116p53^{-/-} fueron tratadas con oxaliplatino (20uM), HTH-01-015 (10uM) y la combinación durante 48h. Luego las células fueron fijadas y teñida utilizando el anticuerpo γ H2A.X y Hoescht 3342 para visualizar el núcleo. Imágenes representativas tomadas mediante microscopia confocal a un aumento de 63X.

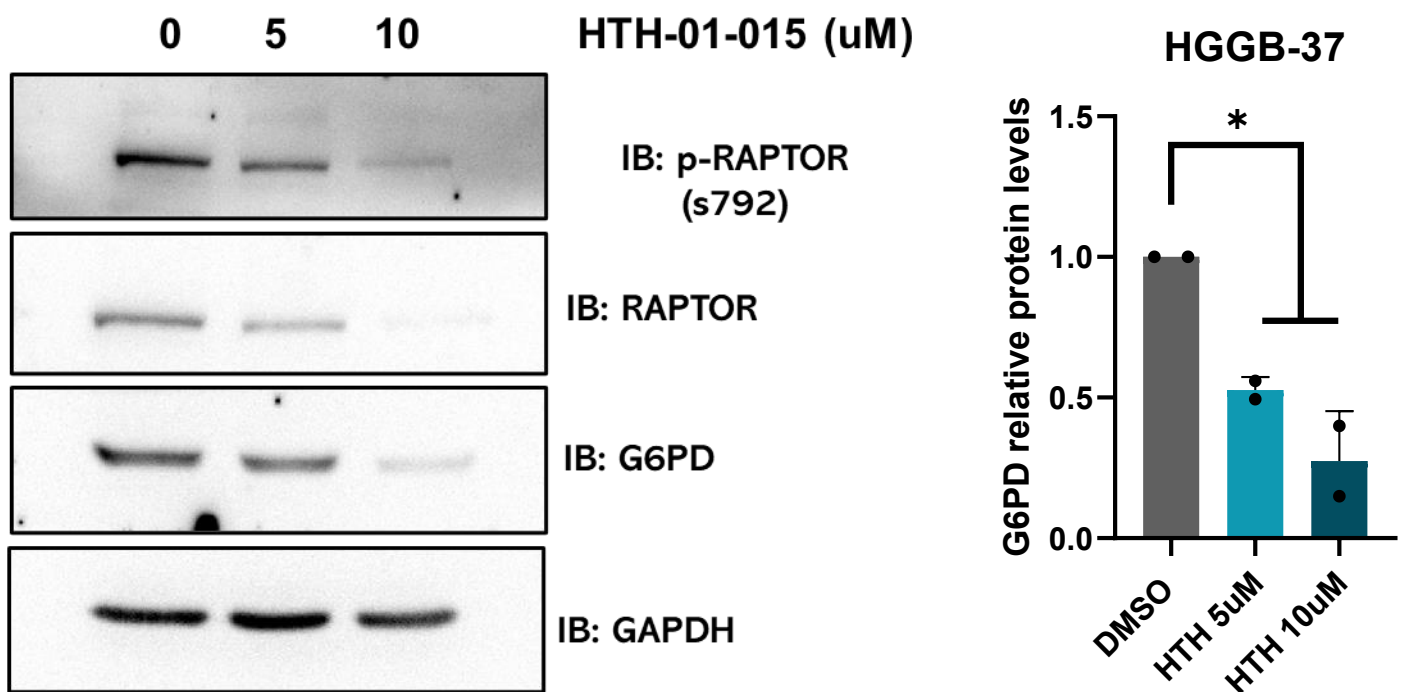


Figura 45: NUA1 promueve la expresión de G6PD en organoides de cáncer colorrectal. Los organoides fueron tratados con HTH-01-015 a 5 y 10uM durante 24h. Luego los niveles de G6PD fueron analizados mediante western blot. La fosforilación de RAPTOR en la serina 792 fue utilizados como control de la droga. GAPDH fue utilizado como control de carga. B) Análisis densimétrico de la expresión de NUA1 relativa a GAPDH. Las barras muestran el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadística de t-student de una muestra. *P<0.05.

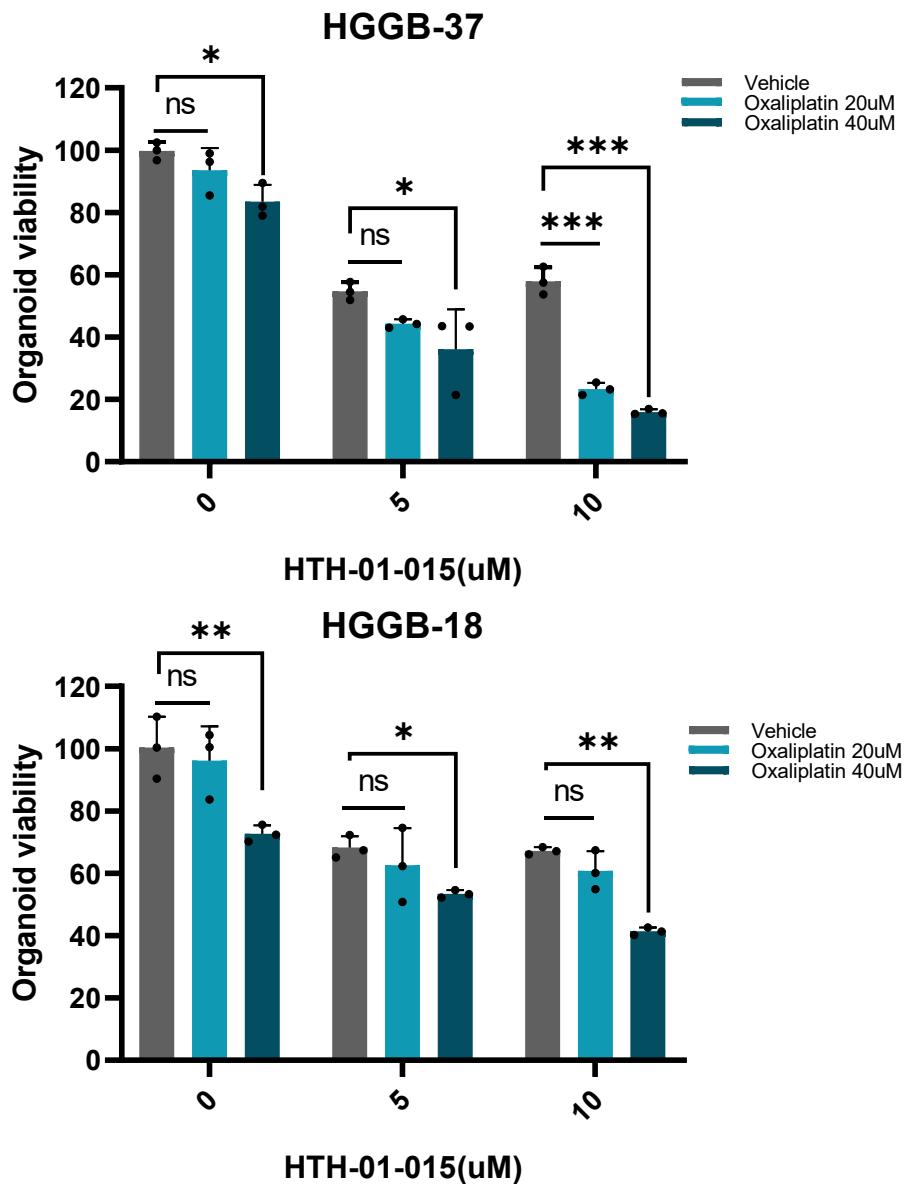


Figura 46: La inhibición de NUA1 sensibiliza a organoides derivados de cáncer colorrectal frente a Oxaliplatino. Los PDO fueron tratados con HTH-01-015 (5 y 10uM) y Oxaliplatino (20 y 40uM) durante 96h. La viabilidad celular fue evaluada mediante el uso del reactivo azul de alamar según lo descrito en materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar para cada condición. Se realizó un ensayo anova de 2 vías como test estadístico. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. **HGGB-37** organoide estadio avanzado. **HGGB-18** organoide estadio intermedio.



Figura 47: Correlación entre la expresión de NUA1 y la sensibilidad a oxaliplatino en líneas celulares de cáncer. Gráfico de dispersión que muestra la relación entre la expresión de NUA1 ($\log_2(\text{TPM}+1)$) y la sensibilidad a oxaliplatino, evaluada como área bajo la curva (AUC) del ensayo PRISM (repurposing secondary screen). Cada punto representa una línea celular. La línea de tendencia indica una correlación positiva entre la expresión de NUA1 y una menor sensibilidad al fármaco (AUC más alto).

Conclusiones de los principales resultados para los experimentos adicionales del objetivo 2.

Nuestros resultados muestran que NUA1 es un regulador central de la respuesta al oxaliplatino en cáncer colorrectal, actuando a través del control de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y del metabolismo redox. Observamos que el tratamiento con oxaliplatino incrementa de manera significativa los niveles proteicos de NUA1, pese a reducir su actividad promotora y sus niveles de ARNm, lo que indica un mecanismo predominantemente postranscripcional. Este aumento se concentra específicamente en el núcleo, coherente con el rol de NUA1 en el empalme y la expresión de G6PD. Consistentemente, la inhibición de NUA1 bloquea por completo la inducción de G6PD, mostrando que su actividad es esencial para la activación de la PPP en respuesta al fármaco.

A nivel funcional, la combinación de un inhibidor de NUA1 con oxaliplatino provoca un marcado incremento de la muerte celular (**Fig 48**), explicado por un aumento del daño genómico, evidenciado por mayores niveles de fragmentación del ADN, incremento de γ H2A.X y exacerbación de la fragmentación nuclear. Esta sinergia también se observó en organoides derivados de pacientes, donde la inhibición de NUA1 sensibilizó especialmente a los tumores avanzados, mientras que un organoide de estadio temprano mostró refractariedad a la pérdida de NUA1.

Finalmente, un análisis comparativo en distintas líneas celulares reveló que niveles elevados de NUA1 se correlacionan con menor sensibilidad al oxaliplatino. En conjunto, estos hallazgos posicionan a NUA1 como un determinante de quimioresistencia y respaldan su inhibición como **una estrategia prometedora para potenciar la eficacia del oxaliplatino en cáncer colorrectal.**

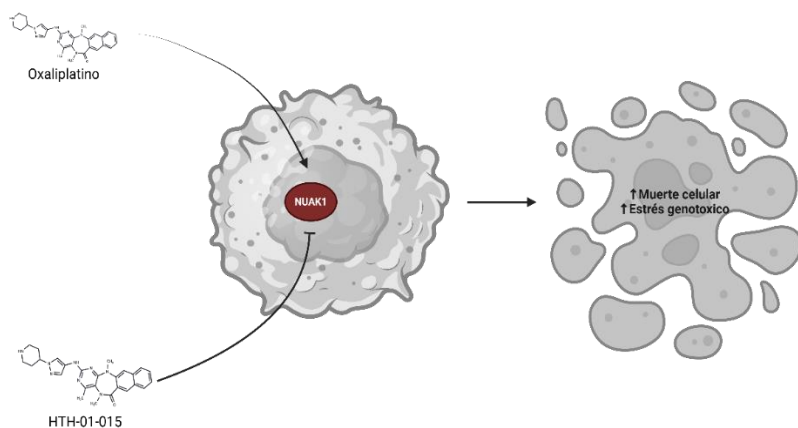


Figura 48. Esquema resumen. Oxaliplatino induce la expresión nuclear de NUA1 como respuesta, por lo que la combinación de Oxaliplatino e inhibición de NUA1, incrementa la muerte celular y el estrés genotóxico.

Discusión

En este estudio demostramos que NUA1 se localiza predominantemente en el núcleo en cáncer colorrectal, lo que sugiere una función nuclear relevante más allá de sus roles citoplasmáticos previamente descritos. Esta observación es consistente con reportes previos que describen interacciones entre NUA1 y componentes de la maquinaria de empalme, como SF3B1 (Cossa et al., 2020), lo que apunta a un posible rol de esta quinasa en la regulación del procesamiento del RNA.

La localización nuclear de NUA1 no parece ser un fenómeno aislado, ya que otras quinasas relacionadas con AMPK (ARKs) también exhiben una distribución nuclear marcada. Por ejemplo, SIK1 en osteoblastos presenta una localización citoplasmática y nuclear (Kim et al., 2019), formando estructuras puntiformes que coinciden con los *nuclear speckles* (NS), compartimentos nucleares no membranosos enriquecidos en factores de empalme y reguladores del procesamiento del RNA. En concordancia con esta idea, se ha descrito que NUA1 colocaliza con SRSF2 (Cossa et al., 2019), uno de los principales componentes de los NS, lo que sugiere que algunas ARKs podrían desempeñar funciones específicas en dominios nucleares especializados. Asimismo, el hecho de que LKB1 (Dorfman & Macaran, 2008), el regulador maestro de las ARKs (con excepción de MELK), también presente una distribución nuclear, refuerza la hipótesis de una señalización mediada por ARKs a nivel nuclear.

En este contexto, nuestros ensayos de co-inmunoprecipitación e inmunofluorescencia demostraron que la interacción entre NUA1 y hnRNP ocurre predominantemente en el núcleo de células de cáncer colorrectal. Sin embargo, a diferencia de lo descrito para SRSF2, ambas proteínas mostraron mayoritariamente una distribución homogénea dentro del núcleo, lo que sugiere que su asociación tendría lugar principalmente en el nucleoplasma, sin descartar una interacción transitoria en compartimentos subnucleares especializados. Dado que tratamientos con actinomicina D inducen la reorganización de los NS, este tipo de estímulos podría constituir una herramienta útil para evaluar si NUA1 y hnRNP son reclutadas a estos complejos bajo condiciones de estrés.

Desde un punto de vista mecanístico, nuestros análisis indicaron que NUA1 no fosforila directamente a hnRNP *in vitro*, y que la interacción entre ambas proteínas es indirecta, apoyando un modelo en el cual NUA1 y hnRNP forman parte de complejos multiproteicos nucleares. En cáncer colorrectal se ha descrito que diversas proteínas de la familia hnRNP, incluyendo hnRNP, hnRNP A1, hnRNP U y hnRNP R, participan en complejos funcionales dinámicos asociados al procesamiento del RNA (Li et al., 2022). En este marco, resulta relevante que NUA1 haya sido

previamente descrita como una quinasa capaz de fosforilar a hnRNP A1 bajo condiciones de estrés hipertónico (Bhattarai et al., 2022). No obstante, dado que la región fosforilada por NUA1 es exclusiva de hnRNP A1, este mecanismo no sería extrapolable a hnRNPK, lo que sugiere que NUA1 regula a distintos miembros de la familia hnRNP mediante mecanismos moleculares diferenciados.

Por otra parte, además de hnRNP A1, se han descrito múltiples blancos de NUA1, incluyendo p53, LATS y, más recientemente, AKT bajo estímulos de factores de crecimiento (Palma et al., 2023) Sin embargo, el blanco mejor caracterizado de NUA1 corresponde a MYPT1, la subunidad regulatoria de la proteína fosfatasa 1B (PP1B). NUA1 fosforila múltiples residuos en MYPT1, incluyendo la serina 445, lo que conduce a la inhibición de la actividad de PP1B (Zagorska et al., 2010). Como consecuencia, NUA1 puede modular el estado de fosforilación de un amplio conjunto de proteínas de manera indirecta, mediante la inhibición de su desfosforilación.

De manera consistente con este modelo, los interactomas de NUA1 y PP1B presentan una amplia superposición de proteínas, muchas de las cuales están asociadas a procesos nucleares, de acuerdo con análisis ontológicos. Si bien MYPT1 se localiza predominantemente en el citoplasma, se ha demostrado que, en el núcleo, NUA1 interactúa con PNUTS, la contraparte nuclear de MYPT1, fosforilándola e inhibiendo la actividad de PP1B nuclear (Cossa et al., 2020).

No obstante, aunque detectamos que NUA1 regula la fosforilación de hnRNPK, nuestros resultados no son concluyentes respecto a una interacción entre PP1B y hnRNPK. Por ello, serán necesarios estudios adicionales que permitan esclarecer el mecanismo molecular mediante el cual NUA1 estaría regulando la función de hnRNPK. **Sin embargo, desde un punto de vista funcional**, nuestros análisis de data pública de secuenciación revelaron que NUA1 y hnRNPK comparten la regulación de un conjunto similar de genes, los cuales se asocian principalmente a procesos metabólicos. Dentro de este grupo, validamos experimentalmente el rol de NUA1 en la regulación de la expresión de G6PD, una enzima clave de la PPP. **Este hallazgo resulta particularmente relevante, considerando que existían antecedentes que sugerían que NUA1 podría impactar la función de la PPP** (Liu et al., 2012); **no obstante, el mecanismo que conecta a NUA1 con esta vía metabólica permanecía hasta ahora sin dilucidar.**

Cabe destacar, que estudios en cáncer de mama y pulmón, ya habían evidenciado un rol de NUA1/2 sobre la expresión de G6PD, lo cual fue atribuido a efectos sobre la señalización de mTORC1 (Babu & Manoharan., 2025) (Raj & Manoharan., 2025). Sin embargo, diversas evidencias cuestionan esta conclusión. Por una parte, la inhibición dual de NUA1/2 mediante WZ4003 genera efectos mucho

más pronunciados sobre el consumo de glucosa, los niveles de NADPH y procesos asociados, como migración y proliferación, que el tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTORC1. Además, la inhibición de NUAK1 reduce el consumo de glucosa y los niveles de NADPH incluso en presencia de rapamicina (Babu & Manoharan., 2025) (Raj & Manoharan., 2025).

Por otra parte, en cáncer pancreático se ha demostrado que la inhibición de NUAK1 induce una hiperactivación de mTORC1, lo que conduce a una disminución de ATP y a muerte celular; de hecho, el tratamiento con rapamicina en células con NUAK1 silenciado tiene un efecto protector, al rescatar los niveles de ATP y reducir la muerte celular (Liu et al., 2012). En concordancia con estos hallazgos, en células de cáncer colorrectal observamos que la inhibición de NUAK1 incrementa la fosforilación de la proteína ribosomal S6, un blanco de S6K activada por mTORC1, lo que sugiere que la pérdida de NUAK1 también provoca hiperactivación de la señalización mTORC1 en este contexto. En conjunto, estos antecedentes indican que mTORC1 no sería el mediador principal de los efectos metabólicos de NUAK1.

De manera consistente con un mecanismo independiente de mTORC1 y en concordancia con la función nuclear de NUAK1, demostramos que esta quinasa regula la expresión de G6PD mediante el aumento en el procesamiento de su pre-mRNA. Estos resultados sugieren que el principal mecanismo por el cual NUAK1 modula la expresión de G6PD podría depender de su impacto sobre la función de hnRNPK. En línea con esta hipótesis, evidenciamos que NUAK1 disminuye la asociación de hnRNPK con el pre-mRNA de G6PD.

A pesar de ello, dado que la región regulatoria presente en este transcrito también constituye un blanco para otras proteínas reguladoras del empalme, el efecto observado sobre la interacción hnRNPK–pre-mRNA de G6PD podría reflejar un fenómeno de competencia entre distintos factores de unión al RNA, más que una regulación exclusiva mediada por hnRNPK. Por lo tanto, si bien nuestros resultados posicionan a hnRNPK como un mediador relevante en este proceso es probable que NUAK1 module el procesamiento del pre-mRNA de G6PD a través de un mecanismo más complejo, que involucre la acción coordinada de múltiples reguladores del empalme.

De todas maneras, nuestros resultados en conjunto validan un rol claro de NUAK1 en la regulación de la expresión de G6PD y demuestran que NUAK1 participa de manera central en la regulación del metabolismo celular, particularmente a nivel de la vía de las pentosas fosfato.

Para determinar que NUA1 promueve la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP), realizamos un análisis metabolómico utilizando glucosa $1,2-^{13}\text{C}_2$, un trazador en el que los dos primeros átomos de carbono se encuentran sustituidos por el isótopo estable ^{13}C . Existen múltiples variantes comerciales de glucosa marcada, cada una con distribuciones isotópicas distintas; sin embargo, la isoforma $1,2-^{13}\text{C}_2$ ha sido ampliamente descrita como una de las más adecuadas para discriminar el destino metabólico de la glucosa entre glicólisis y PPP (Antoniewicz., 2018), debido a cómo las reacciones de descarboxilación y las interconversiones de la vía no oxidativa afectan el patrón isotópico final. Sobre esta base metodológica, evaluamos el flujo de glucosa utilizando este trazador para determinar si NUA1 altera la distribución metabólica entre ambas rutas.

En condiciones basales, la PPP representa aproximadamente entre un 1–10% del flujo total de la glucosa, aunque puede alcanzar valores cercanos al 80% bajo estrés oxidativo. Debido a esta baja participación basal y a la posibilidad de que reducciones en la PPP sean más difíciles de detectar sobre un sustrato ya limitado, decidimos evaluar inicialmente el efecto de la **sobreexpresión de NUA1**, bajo la premisa de que aumentos en el flujo serían más fácilmente cuantificables que disminuciones.

Entre las estrategias disponibles para diferenciar el flujo hacia glicólisis de aquel dirigido a la PPP, una de las aproximaciones más utilizadas consiste en determinar la **razón entre lactato M+2 y lactato M+1**. El lactato M+2 conserva los dos carbonos marcados y refleja el paso de la glucosa por glicólisis y fermentación sin desviarse hacia la PPP. Por el contrario, el lactato M+1 representa la contribución de la vía no oxidativa de la PPP, donde la conversión de 6-fosfogluconato a ribulosa-5-fosfato libera el carbono 1 en forma de CO_2 , generando intermediarios con solo un carbono marcado que luego pueden reingresar a la glicólisis en forma de F6P o G3P. No obstante, en nuestros experimentos la razón lactato M+2/M+1 **no mostró cambios significativos** frente a la modulación de NUA1. **Este resultado probablemente se explica porque la sobreexpresión de NUA1 reduce de manera pronunciada la generación de piruvato y lactato**, disminuyendo fuertemente el flujo fermentativo y, por ende, imposibilitando el uso de esta razón isotópica como indicador fiable del balance entre glicólisis y PPP en este contexto.

Ante esta limitación, optamos por una estrategia complementaria basada en la **reconstrucción comparativa de ambas rutas metabólicas**, considerando los cambios observados en metabolitos glicolíticos y de la PPP bajo sobreexpresión de NUA1. Este análisis reveló que la sobreexpresión de NUA1 **promueve una redirección del flujo hacia la PPP**, evidenciada por un aumento en 6-

fosfogluconato y en metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato. Aunque los incrementos en 6-fosfogluconato fueron consistentes y robustos, los cambios en las pentosas fosfato resultaron más modestos. Esto podría deberse a que nuestras mediciones agrupan tres metabolitos R5P, X5P y Ru5P, bajo un mismo parámetro, por lo que la ausencia de cambio en uno de ellos podría atenuar la señal final y subestimar el impacto real sobre la vía.

Por otra parte, el análisis de los metabolitos glicolíticos reveló que, además de la disminución en piruvato y lactato, la reducción del flujo glicolítico es notable incluso en etapas tempranas de la vía, como la producción de fructosa-1,6-bisfosfato, el tercer intermediario tras la entrada de glucosa a la célula. Estos hallazgos sugieren que, además de modular G6PD, **NUAK1 podría actuar sobre la expresión o actividad de enzimas glicolíticas**. En este contexto, la tesis doctoral de Mario Palma reportó que NUAK1 interacciona con distintas isoformas de **PFK1**, la enzima responsable de la conversión de F6P a F1,6BP, lo que refuerza la posibilidad de un papel regulador directo de NUAK1 sobre la función de PFK1. Sin embargo, estudios previos han demostrado que **NUAK2 fosforila PFK1** (Pan et al., 2025) en la treonina 386 para activar la glicólisis. Dado que NUAK1 y NUAK2 comparten similitud en varios efectores y mecanismos de acción, esta hipótesis requiere una evaluación experimental exhaustiva para determinar si NUAK1 ejerce un efecto opuesto, complementario o convergente sobre la regulación de PFK1 y, por extensión, sobre la dinámica global del metabolismo glicolítico; más aún, teniendo en consideración que la sobreexpresión de NUAK1, pese a disminuir la generación de F1,6BP M+2, aumenta la generación de **F1,6BP M+1, originada a partir del reingreso de F6P generado en la rama no oxidativa de la PPP**.

De manera consistente con los resultados obtenidos bajo sobreexpresión, la inhibición de NUAK1 produjo un **aumento en el marcaje de metabolitos glucolíticos**, incluyendo F1,6BP, PEP y piruvato (**Anexo 1**). Si bien los niveles de lactato mostraron una tendencia al alza, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística. Un hallazgo particularmente relevante fue que, frente a la pérdida de NUAK1, se observó un **incremento significativo en P5P M+2 y S7P M+2**, lo cual indica que la inhibición de NUAK1 **favorece el flujo hacia la rama no oxidativa de la PPP (Anexo 2)**, mediante la reincorporación de intermediarios glucolíticos a través de F6P o G3P.

A pesar de este aumento en la vía no oxidativa, los niveles de **6-fosfogluconato M+2** disminuyeron tras la inhibición de NUAK1 (**Anexo 2**). Esta reducción refuerza la idea de que la pérdida de NUAK1 limita la rama oxidativa de la PPP, y que la célula responde compensatoriamente redirigiendo el metabolismo hacia rutas alternativas dentro de la propia vía de las pentosas. En concordancia con

este hipótesis, análisis transcriptómicos de células SW480 NUA1 KD mostraron un **aumento significativo en la expresión de transaldolasa**, enzima que cataliza la conversión de F6P y eritrosa-4-fosfato (E4P) en S7P, lo que podría explicar el incremento observado en esta rama no oxidativa.

Adicionalmente, el interactoma de NUA1 identificó como posible interactor a **transketolasa (TKT)**, enzima clave en la conversión de S7P y G3P hacia distintas pentosas fosfato. Por otra parte, análisis de fosfoproteómica revelaron un **potencial residuo modulado por NUA1 en TKT**, correspondiente a la serina 295. Predicciones obtenidas desde la base de datos *The Kinome Atlas* mostraron una **alta probabilidad de que la serina 295 sea blanco de caseína quinasa 1 (CK1)**, y una probabilidad considerablemente menor de que sea blanco directo de NUA1 (**Anexo 3**). Esto sugiere un **mecanismo indirecto de regulación**, pero abre al mismo tiempo hipótesis de alto interés respecto a cómo NUA1 podría modular, de forma directa o indirecta, la dinámica de la rama no oxidativa de la PPP, planteando así interrogantes relevantes que deberán ser abordados en investigaciones futuras.

A nivel de procesos metabólicos, encontramos que NUA1 regula los niveles de NADPH y ROS. Previamente, el grupo dirigido por el Dr. Daniel Murphy, con quienes colaboramos en los análisis metabólicos, demostró que, **bajo condiciones de estrés oxidativo en osteosarcoma, NUA1 es esencial para la translocación nuclear de Nrf2** y, en consecuencia, para la activación de genes asociados a la respuesta antioxidante (Port et al., 2018). Sin embargo, en ese mismo estudio se observó que, en células no estimuladas, la inhibición de NUA1 no produce cambios consistentes en la localización de Nrf2 entre distintas líneas celulares. Este punto es particularmente relevante para nuestro trabajo, ya que G6PD es un blanco clásico de Nrf2; por lo tanto, una hipótesis inicial podría haber sido que los efectos de la pérdida de NUA1 sobre G6PD se explicaran a través de alteraciones en la actividad o translocación de Nrf2.

No obstante, en nuestras condiciones basales, donde las células no están sometidas a estrés oxidativo exógeno, **tampoco observamos diferencias relevantes en la translocación de NRF2 tras la pérdida de NUA1 (no mostrados)**, reproduciendo lo señalado en el estudio previo. Esto sugiere que, en ausencia de estímulos que activen Nrf2, el efecto de NUA1 sobre esta vía es mínimo o no constituye un mecanismo dominante. Esta observación es especialmente importante porque, en estas mismas condiciones, describieron que la pérdida de NUA1 incrementa los niveles de estrés oxidativo (Port et al., 2018), indicando que deben existir mecanismos alternativos mediante los cuales NUA1 sostiene la homeostasis redox, como por ejemplo su rol a nivel de la expresión de

G6PD. Basados en esto, **demostramos que NUAK1 regula los niveles de ROS a través de un mecanismo dependiente de G6PD en CCR.**

El NADPH es esencial para la biosíntesis *de novo* de lípidos, en particular durante la síntesis y elongación de ácidos grasos, un proceso altamente demandante en términos redox; por ejemplo, la síntesis de una molécula de ácido palmítico requiere 14 moléculas de NADPH. En este contexto, estudios previos en modelos murinos de cáncer colorrectal reportaron que la inhibición de NUAK1 aumenta la biosíntesis de colesterol, interpretándose este efecto como una respuesta compensatoria al incremento de ROS, más que como una regulación directa de la lipogénesis por NUAK1 (Gui et al., 2025). Consistente con estos antecedentes, observamos que la inhibición de NUAK1 induce una acumulación aberrante de lípidos intracelulares (datos no mostrados). Sin embargo, los niveles de ácido palmítico disminuyeron frente a la pérdida de NUAK1 (**Anexo 4**), sugiriendo que estos lípidos podrían corresponder principalmente a esteroides u otros lípidos neutros, como triglicéridos o ceramidas.

Sobre esta base, evaluamos la acumulación lipídica bajo sobreexpresión de NUAK1 y observamos que esta quinasa promueve la biosíntesis de lípidos mediante un mecanismo dependiente de G6PD. Para distinguir entre síntesis *de novo* e incorporación exógena de lípidos, los experimentos se realizaron en ausencia de suero. Si bien la deprivación de suero activa la lipogénesis a través de SREBP1 (Damiano et al., 2010), no detectamos cambios en su activación bajo sobreexpresión de NUAK1 (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que NUAK1 favorece la biosíntesis lipídica principalmente al aumentar la disponibilidad de poder reductor y metabolitos derivados de la vía de las pentosas fosfato, más que mediante la activación transcripcional del programa lipogénico.

La vía de las pentosas fosfato PPP es esencial para la proliferación celular, ya que genera pentosas fosfato necesarias para la síntesis de nucleótidos y la replicación del ADN. En concordancia, su actividad aumenta durante la fase S del ciclo celular (Ma et al., 2017). Sin embargo, dado que la expresión de G6PD se mantiene relativamente constante entre las distintas fases, este aumento parece depender principalmente de cambios en su actividad más que en su abundancia. De manera interesante, NUAK1 también presenta un pico de expresión en fase S (Banerjee et al., 2014), lo que sugiere un posible rol de esta quinasa en la progresión del ciclo celular.

Estudios previos han mostrado que la pérdida de NUAK1 induce un arresto en G1 (Banerjee et al., 2014) (Babu & Manoharan., 2025) (Raj & Manoharan., 2025) Por otro lado, nuestros análisis

metabolómicos revelaron que la pérdida de NUA1 altera la abundancia de bases nitrogenadas, lo que apunta a un impacto funcional sobre la proliferación celular.

Sin embargo, observamos que NUA1 regula el ciclo celular a través de mecanismos independientes de G6PD. La pérdida de NUA1 induce un arresto en G1, mientras que la inhibición de G6PD provoca un marcado arresto en S, reflejando funciones diferenciales en torno a la progresión del ciclo celular. Por otro lado, dado que la pérdida de NUA1 aumenta el flujo a través de la rama no oxidativa, e incrementa los niveles de pentosas fosfato, es esperable entonces que el **efecto de NUA1 a nivel del ciclo celular no responda finalmente a una regulación sobre la actividad de la PPP.**

Con el objetivo de ampliar el rol metabólico de NUA1 más allá de la vía de PPP, evaluamos su posible impacto sobre otros procesos metabólicos. Estudios previos han vinculado a NUA1 con la regulación de la función mitocondrial (Escalona et al., 2020) (Lafranchi et al., 2024), y trabajos de nuestro laboratorio demostraron que esta quinasa modula la respiración mitocondrial, sugiriendo un rol central en la homeostasis energética. En este contexto, resulta llamativo que AICAR, pero no AMP, induzca la fosforilación de NUA1 (Lafranchi et al., 2024) y de su sustrato MYPT1, lo que sugiere que esta activación no responde a un estrés energético clásico.

Dado que AICAR es un intermediario clave de la biosíntesis de purinas, estos resultados apuntan a un vínculo funcional entre NUA1 y esta ruta metabólica. En concordancia, observamos que la pérdida de NUA1 reduce los niveles de ATP e induce una acumulación marcada de AICAR, metabolito prácticamente indetectable en condiciones basales. Este fenómeno podría reflejar una alteración en el flujo metabólico de purinas o, alternativamente, una respuesta compensatoria destinada a activar NUA1.

El análisis de metabolitos río abajo reveló un aumento de IMP y de ácido úrico, sin cambios en xantina, lo que sugiere una activación del catabolismo de purinas. Sin embargo, este aumento no explica por sí solo la acumulación de AICAR e IMP, lo que indica que la biosíntesis *de novo* de purinas también se encuentra activada. En apoyo a esta idea, detectamos un aumento de guanosina y una redistribución de nucleósidos hacia el medio extracelular, consistente con mecanismos de excreción activa frente a estrés metabólico.

Estos efectos pueden integrarse en un modelo donde la pérdida de NUA1 incrementa el flujo por la rama no oxidativa de la PPP, aumentando la disponibilidad de PRPP y AICAR, favoreciendo la

síntesis de purinas. Sin embargo, la disfunción mitocondrial asociada a la inhibición de NUA1 limitaría la conversión eficiente de AMP a ATP, generando una acumulación de intermediarios que son desviados hacia degradación y excreción para evitar toxicidad metabólica.

En conjunto, nuestros resultados posicionan a NUA1 como un regulador clave de la homeostasis de purinas, integrando el metabolismo de la PPP con la función mitocondrial. Aunque la relevancia funcional de la excreción de nucleósidos en cáncer requiere mayor exploración, estos hallazgos abren una hipótesis terapéutica atractiva: **la inhibición de NUA1 genera una dependencia crítica de los transportadores de nucleósidos, lo que permitiría explotar combinaciones terapéuticas dirigidas a ambos ejes metabólicos.**

Dado el rol de NUA1 en la mantención de los niveles de ATP, evaluamos qué rutas metabólicas podrían contribuir a la marcada disminución energética observada tras su pérdida. Al analizar el ciclo de Krebs, no detectamos alteraciones relevantes en la mayoría de sus intermediarios. Las únicas excepciones fueron el citrato y el α -cetoglutarato, cuyos niveles disminuyeron y aumentaron, respectivamente (**Anexo 5**), en concordancia con reportes previos (Liu et al., 2012). En conjunto, estos resultados indican que la caída de ATP no puede explicarse exclusivamente por una disfunción global del ciclo de Krebs, lo que sugiere el compromiso de otras vías energéticas.

Considerando que la β -oxidación de ácidos grasos constituye una fuente eficiente de acetil-CoA y energía, evaluamos su posible regulación por NUA1. **Observamos que la pérdida de NUA1 reduce significativamente los niveles de carnitina**, molécula clave para el transporte mitocondrial de ácidos grasos, así como de acil-carnitinas, reflejando una disminución en la activación y entrada de lípidos a la mitocondria. Estos datos sugieren que la β -oxidación se encuentra comprometida en ausencia de NUA1.

A su vez, la disminución en la degradación de ácidos grasos podría además contribuir a la acumulación lipídica intracelular observada bajo esta condición, indicando que NUA1 no solo sostiene la producción de ATP, sino que también regula el balance entre oxidación y almacenamiento de lípidos. **En conjunto, estos resultados revelan que NUA1 coordina múltiples rutas metabólicas para mantener la homeostasis energética, ampliando su rol más allá de funciones previamente descritas y posicionándola como un regulador central del metabolismo en cáncer colorrectal.**

Finalmente, considerando la estrecha relación de NUA1 con la regulación del metabolismo celular y el hecho de que la reprogramación metabólica constituye un mecanismo central de adaptación al

estrés, evaluamos si esta quinasa podría contribuir a la resistencia a quimioterapéuticos en cáncer colorrectal. En distintos modelos tumorales se ha demostrado que la activación de la vía de las pentosas fosfato favorece la tolerancia a quimioterapia, particularmente a través del aumento de NADPH y del mantenimiento del balance redox. En concordancia, enzimas como transketolasa, transaldolasa (Fu et al., 2025) y G6PD (Ju et al., 2017) han sido implicadas en la resistencia a temozolomida y oxaliplatino, respectivamente. En este contexto, trabajos previos en cáncer colorrectal sugirieron que el silenciamiento de **NUAK1 re-sensibiliza células resistentes a oxaliplatino; sin embargo, dichos estudios atribuyeron este efecto a la regulación de la translocación de Nrf2** (Yang et al., 2021), **una hipótesis que presenta inconsistencias conceptuales y experimentales.**

En nuestras condiciones, NUAK1 no modificó los niveles ni la localización subcelular de Nrf2, lo que cuestiona su rol como mediador central de este fenómeno. Además, la utilización de activadores de Nrf2 basados en la inhibición de KEAP1 resulta problemática en cáncer colorrectal, dado que KEAP1 se encuentra frecuentemente silenciado por hipermetilación de su promotor (Hanada et al., 2012), explicando la localización nuclear constitutiva de Nrf2 descrita en múltiples estudios. No obstante, y más allá de estas limitaciones, la posibilidad de que NUAK1 contribuya a la resistencia a oxaliplatino a través de mecanismos metabólicos alternativos, particularmente mediante la regulación de G6PD, sigue siendo altamente plausible.

Consistente con esta hipótesis, observamos que los niveles de NUAK1 aumentan tras el tratamiento con oxaliplatino. De manera inesperada, este incremento no se explicó por un aumento transcripcional, ya que tanto la actividad del promotor de NUAK1 como sus niveles de ARNm disminuyeron tras el tratamiento. Estos resultados apuntan a un control postranscripcional de NUAK1 bajo estrés quimioterapéutico. En este contexto, resulta relevante que el oxaliplatino induzca la activación de la vía mTORC1, un regulador clave de la traducción proteica. Por lo tanto, es plausible que el aumento de NUAK1 responda a una mayor eficiencia traduccional o a cambios en su estabilidad proteica, aunque estos mecanismos requieren validación experimental adicional.

Dado que en esta tesis proponemos que NUAK1 ejerce funciones metabólicas críticas desde el núcleo, evaluamos si el aumento inducido por oxaliplatino se concentraba en este compartimiento subcelular. En efecto, el incremento de NUAK1 se detectó predominantemente en la fracción nuclear. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que el estrés oxidativo ha sido asociado previamente a una relocalización citoplasmática de NUAK1 (Palma et al., 2019), y el modelo

propuesto para su interacción con Nrf2 depende de un mecanismo citoplasmático (Port et al., 2018). En conjunto, estos datos sugieren que, bajo tratamiento con oxaliplatino, NUA1 podría mediar mecanismos adaptativos a través de sus funciones nucleares, incluyendo la regulación de la expresión de G6PD, cuyo aumento inducido por oxaliplatino fue atenuado al inhibir a NUA1.

Desde un punto de vista funcional, validamos que la inhibición de NUA1 potencia el efecto citotóxico de oxaliplatino. En líneas celulares de cáncer colorrectal, la combinación de oxaliplatino con el inhibidor HTH-01-015 produjo un efecto sinérgico sobre la muerte celular. En contraste, HTH-01-015 por sí solo generó un efecto limitado sobre la viabilidad, consistente con un rol principalmente citostático, previamente descrito en otros modelos tumorales (Port et al., 2018) (Liu et al., 2012) (Palma et al., 2023). Dado que oxaliplatino ejerce su efecto citotóxico principalmente a través de la inducción de daño genotóxico, evaluamos directamente este parámetro y observamos que la inhibición de NUA1 incrementa de manera significativa la fragmentación del ADN inducida por el fármaco, lo que sugiere una menor capacidad celular para tolerar o reparar el daño genético bajo estas condiciones.

Finalmente, evidenciamos que, al igual que en líneas celulares, en organoides derivados de pacientes con cáncer colorrectal, la combinación de oxaliplatino con la inhibición de NUA1 aumentó la muerte celular de forma más pronunciada que cualquiera de los tratamientos por separado. Resulta particularmente interesante que este efecto fuera dependiente del estadio tumoral: los organoides derivados de tumores avanzados mostraron una marcada sensibilidad a la combinación, mientras que aquellos provenientes de estadios tempranos presentaron una respuesta limitada. Esto sugiere que la dependencia de NUA1 podría incrementarse durante la progresión tumoral, reforzando su valor como blanco terapéutico en enfermedad avanzada.

En conjunto, estos resultados indican que NUA1 contribuye a la tolerancia al oxaliplatino en cáncer colorrectal, probablemente a través de mecanismos metabólicos nucleares que incluyen la regulación de G6PD y la adaptación al estrés genotóxico. Esta dependencia metabólica podría ser explotada terapéuticamente para potenciar la eficacia de oxaliplatino o reducir las dosis requeridas, con el potencial beneficio de disminuir sus efectos adversos, particularmente la neurotoxicidad. Además, la asociación entre altos niveles de NUA1 y resistencia a oxaliplatino observada en análisis bioinformáticos refuerza la relevancia clínica de este eje, posicionando a NUA1 como un blanco prometedor para estrategias combinadas en cáncer colorrectal.

Conclusiones generales

En conjunto, este trabajo identifica a NUA1 como una quinasa nuclear clave en la reprogramación metabólica del cáncer colorrectal, integrando señales metabólicas con el control del procesamiento del RNA y la respuesta al estrés genotóxico. Nuestros resultados demuestran que NUA1 regula la expresión de G6PD a nivel postranscripcional, promoviendo la activación de la vía de las pentosas fosfato y sosteniendo procesos esenciales para la proliferación, la homeostasis redox y la supervivencia tumoral. Además, evidenciamos que esta dependencia metabólica contribuye a la tolerancia al oxaliplatino y que su inhibición potencia el daño al ADN y la muerte celular, particularmente en modelos de enfermedad avanzada. En conjunto, estos hallazgos posicionan a NUA1 como un nodo central entre metabolismo y quimiorresistencia, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas combinadas en cáncer colorrectal. A continuación, se enumeran las principales conclusiones para cada objetivo:

Objetivo 1.

1. NUA1 presenta una localización nuclear en cáncer colorrectal.
2. NUA1 interacciona con hnRNPK en el núcleo de células de cáncer colorrectal.
3. NUA1 promueve el estado de fosforilación de hnRNPK.

Objetivo 2.

1. NUA1 promueve la expresión de G6PD a través de la regulación de su empalme.
2. NUA1 promueve la actividad de la vía Pentosas fosfato.
3. NUA1 promueve la generación de NADPH y la disminución del estrés oxidativo.
4. NUA1 promueve la síntesis lipídica.
5. NUA1 se asocia a la homeostasis de purinas.
6. La pérdida de NUA1 disminuye la generación de energía y la B-oxidación.
7. NUA1 incrementa su expresión y localización nuclear frente a oxaliplatino.
8. NUA1 es necesario para el aumento en los niveles de G6PD dependientes de oxaliplatino.
9. La inhibición de NUA1, sensibiliza a células de CCR contra oxaliplatino al incrementar el estrés genotóxico.
10. La inhibición de NUA1 sensibiliza organoides derivados de pacientes de CCR contra oxaliplatino.

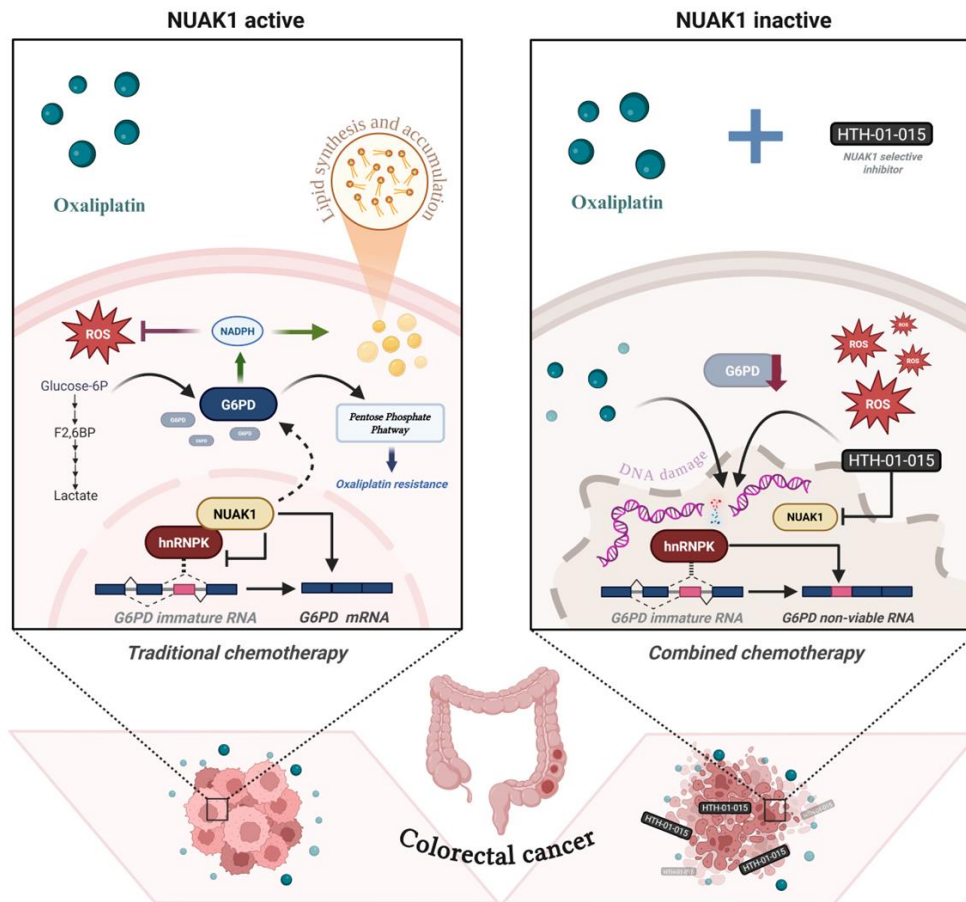


Figura 49. Modelo final propuesto para esta tesis. NUA1 interacciona en el núcleo de células de cáncer colorrectal con hnRNPk, modulando negativamente su función y promoviendo la expresión de G6PD. Este eje favorece la activación de la vía de las pentosas fosfato, contribuyendo a la detoxificación de ROS, la biosíntesis lipídica y la resistencia a oxaliplatino. En contraste, la inhibición de NUA1 sensibiliza a las células de cáncer colorrectal a oxaliplatino, incrementando el estrés genotóxico y la muerte celular.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a los distintos fondos que hicieron posible la realización de esta tesis. Entre ellos se encuentran los proyectos FONDECYT Regular N° 1201215 y N° 1241771, adjudicados al Dr. Ariel Castro y a la Dra. Roxana Pincheira, respectivamente. Asimismo, agradezco a ANID por los fondos que permitieron mi manutención y la compra de reactivos, a través de los gastos operacionales N° 21220471. A la Dirección de Postgrado, por su apoyo en la asistencia a congresos y en la realización de mi pasantía en Escocia.

En lo personal, me gustaría agradecer al Dr. Ariel Castro por su guía durante el desarrollo de esta tesis. Sin duda alguna, ingresar al Laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer fue la mejor decisión que pude haber tomado. Agradezco también a mis queridos compañeros de laboratorio, quienes, entre risas y chistes, hicieron que el trabajo diario fuera mucho más llevadero.

To my Scottish friends, Jennifer, Sarah, Danielle, Dominika, Mahnoor, Pooyeh and Daniel: it was my first time outside my country, and I missed my food and my language a lot. But sharing with you a “wee” part of my life was priceless. Hopefully, life will bring me back to the cold lands of Scotland, to share more beers and whisky at the pub.

A mi familia, en especial a mi madre, por creer siempre en mí y apoyarme incondicionalmente, aunque probablemente no entendiera del todo el mundo en el que estaba intentando entrar. Gracias, a todas esas maravillosas mujeres que me criaron, cuidaron y educaron.

Agradezco a Viviana, quien fue mi pilar durante todos estos años, mi confidente, mi compañera de aventuras y mi compañera de vida. Sin tu apoyo, esta tesis no habría sido posible; por lo tanto, este logro, también es tuyo.

Finalmente, a mis preciosas gatas, Chungunga y Gati, quienes fueron mis fieles compañeras durante toda la escritura de esta tesis.

Bibliografia

A.B. Aurora, V. Khivansara, A. Leach, J.G. Gill, M. Martin-Sandoval, C. Yang, S.Y. Kasitinon, D. Bezwada, A. Tasdogan, W. Gu, T.P. Mathews, Z. Zhao, R.J. DeBerardinis, & S.J. Morrison, Loss of glucose 6-phosphate dehydrogenase function increases oxidative stress and glutaminolysis in metastasizing melanoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119 (6) e2120617119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2120617119> (2022).

Adams, K. J., Pratt, B., Bose, N., Dubois, L. G., St John-Williams, L., Perrott, K. M., Ky, K., Kapahi, P., Sharma, V., MacCoss, M. J., Moseley, M. A., Colton, C. A., MacLean, B. X., Schilling, B., Thompson, J. W., & Alzheimer's Disease Metabolomics Consortium (2020). Skyline for Small Molecules: A Unifying Software Package for Quantitative Metabolomics. *Journal of proteome research*, 19(4), 1447–1458. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00640>

Allan Pamba, Naomi D. Richardson, Nick Carter, Stephan Duparc, Zul Premji, Alfred B. Tiono, Lucio Luzzatto; Clinical spectrum and severity of hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient children receiving dapsone. *Blood* 2012; 120 (20): 4123–4133. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416032>

Antoniewicz M. R. (2018). A guide to ¹³C metabolic flux analysis for the cancer biologist. *Experimental & molecular medicine*, 50(4), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0060-y>

Arango, D., Wilson, A. J., Shi, Q., Corner, G. A., Arañes, M. J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J. M., & Augenlicht, L. H. (2004). Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *British journal of cancer*, 91(11), 1931–1946. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602215>

Azevedo, E. P., Rochael, N. C., Guimarães-Costa, A. B., de Souza-Vieira, T. S., Ganilho, J., Saraiva, E. M., Palhano, F. L., & Foguel, D. (2015). A Metabolic Shift toward Pentose Phosphate Pathway Is Necessary for Amyloid Fibril- and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *The Journal of biological chemistry*, 290(36), 22174–22183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640094>

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 β MYPT1 phosphatase complex and the

SCF β TrCP E3 ubiquitin ligase. The Biochemical journal, 461(2), 233–245.
<https://doi.org/10.1042/BJ20140408>

Bei, Y., Wang, S., Wang, R., Ahmad, O., Jia, M., Yao, P., Ji, J., & Shen, P. (2025). CDK5-triggered G6PD phosphorylation at threonine 91 facilitating redox homeostasis reveals a vulnerability in breast cancer. Acta pharmaceutica Sinica. B, 15(3), 1608–1625.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.12.019>

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. The Journal of biological chemistry, 298(9), 102364.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102364>

Britt, E.C., Lika, J., Giese, M.A. et al. Switching to the cyclic pentose phosphate pathway powers the oxidative burst in activated neutrophils. Nat Metab 4, 389–403 (2022).
<https://doi.org/10.1038/s42255-022-00550-8>

Burgueño, J. F., Fritsch, J., Santander, A. M., Brito, N., Fernández, I., Pignac-Kobinger, J., Conner, G. E., & Abreu, M. T. (2019). Intestinal Epithelial Cells Respond to Chronic Inflammation and Dysbiosis by Synthesizing H₂O₂. Frontiers in physiology, 10, 1484. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01484>

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/s00432011-1102-1>.

Chen, X., Chen, S., & Yu, D. (2020). Metabolic Reprogramming of Chemoresistant Cancer Cells and the Potential Significance of Metabolic Regulation in the Reversal of Cancer Chemoresistance. Metabolites, 10(7), 289. <https://doi.org/10.3390/metabo10070289>

Chen, Y., Wu, J., Zhang, S. et al. Hnrnpk maintains chondrocytes survival and function during growth plate development via regulating Hif1 α -glycolysis axis. Cell Death Dis 13, 803 (2022).
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-05239-0>

Choy, M. S., Hieke, M., Kumar, G. S., Lewis, G. R., Gonzalez-DeWhitt, K. R., Kessler, R. P., Stein, B. J., Hossenberger, M., Nairn, A. C., Peti, W., & Page, R. (2014). Understanding the antagonism of retinoblastoma protein dephosphorylation by PNUTS provides insights into the PP1 regulatory code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4097–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317395111>

Cossa, G., Roeschert, I., Prinz, F., Baluapuri, A., Silveira Vidal, R., Schülein-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>

Cotran., Robbins., Kumar, V. (2010). *Patología Estructural y Funcional* (El sevier (ed.); 8va ed.).

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*, 1829(9), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.bbtagrm.2013.04.009>

Damiano, F., Alemanno, S., Gnoni, G. V., & Siculella, L. (2010). Translational control of the sterol-regulatory transcription factor SREBP-1 mRNA in response to serum starvation or ER stress is mediated by an internal ribosome entry site. *The Biochemical journal*, 429(3), 603–612. <https://doi.org/10.1042/BJ20091827>

Dorfman, J., & Macara, I. G. (2008). STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7. *Molecular biology of the cell*, 19(4), 1614–1626. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0454>

Ducommun, S., Ford, R. J., Bultot, L., Deak, M., Bertrand, L., Kemp, B. E., Steinberg, G. R., & Sakamoto, K. (2014). Enhanced activation of cellular AMPK by dual-small molecule treatment: AICAR and A769662. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 306(6), E688–E696. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00672.2013>

- Escalona, E., Muñoz, M., Pincheira, R., Elorza, Á. A., & Castro, A. F. (2020). Cytosolic NUA1 Enhances ATP Production by Maintaining Proper Glycolysis and Mitochondrial Function in Cancer Cells. *Frontiers in oncology*, 10, 1123. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01123>
- Ferrando, I. M., Chaerkady, R., Zhong, J., Molina, H., Jacob, H. K., Herbst-Robinson, K., Dancy, B. M., Katju, V., Bose, R., Zhang, J., Pandey, A., & Cole, P. A. (2012). Identification of targets of c-Src tyrosine kinase by chemical complementation and phosphoproteomics. *Molecular & cellular proteomics* : MCP, 11(8), 355–369. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015750>
- Fu, M., Zhang, M., Zhang, L., Feng, Y., Gao, C., Xu, H., Zhang, J., Zhang, H., Peng, T., Chu, Y., Wu, Y., Wang, P., Ye, D., Mao, Y., & Hua, W. (2025). Transketolase attenuates the chemotherapy sensitivity of glioma cells by modulating R-loop formation. *Cell reports*, 44(1), 115142. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.115142>
- Gallardo, M., Hornbaker, M. J., Zhang, X., Hu, P., Bueso-Ramos, C., & Post, S. M. (2016). Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(12), 1552–1557. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1164372>
- 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*, 1759(11-12), 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2006.10.001>
- Gui, L., Chen, K., Yan, J., Chen, P., Gao, W. Q., & Ma, B. (2025). Targeting the mevalonate pathway potentiates NUA1 inhibition-induced immunogenic cell death and antitumor immunity. *Cell reports. Medicine*, 6(2), 101913. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101913>
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., Hentze, M. W., & Ronai, Z. (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nature cell biology*, 3(3), 325–330. <https://doi.org/10.1038/35060131>
- Hanada, N., Takahata, T., Zhou, Q., Ye, X., Sun, R., Itoh, J., Ishiguro, A., Kijima, H., Mimura, J., Itoh, K., Fukuda, S., & Saijo, Y. (2012). Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC cancer*, 12, 66. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-66>

Hao, Y., Ren, T., Huang, X., Li, M., Lee, J. H., Chen, Q., Liu, R., & Tang, Q. (2023). Rapid phosphorylation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by casein kinase 2 sustains redox homeostasis under ionizing radiation. *Redox biology*, 65, 102810. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102810>

Hsueh, K. W., Fu, S. L., Huang, C. Y., & Lin, C. H. (2011). Aurora-A phosphorylates hnRNPK and disrupts its interaction with p53. *FEBS letters*, 585(17), 2671–2675. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.031>

Hutchins, E. J., & Szaro, B. G. (2013). c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K regulates vertebrate axon outgrowth via a posttranscriptional mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(37), 14666–14680. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4821-12.2013>

Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A. R., Van Aalten, D. M., & Alessi, D. R. (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *The Biochemical journal*, 394(Pt 3), 545–555. <https://doi.org/10.1042/BJ20051844>.

Jang, C., Chen, L., & Rabinowitz, J. D. (2018). Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*, 173(4), 822–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.055>

Jin, L., & Zhou, Y. (2019). Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncology letters*, 17(5), 4213–4221. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10112>

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>

Kim, L. A., Han, J., Kim, T. I., Park, J. J., Lee, J. M., Kim, J. K., Park, S., & Lee, H. (2025). Circulating RNA Markers Associated with Adenoma–Carcinoma Sequence in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(4), 1518. <https://doi.org/10.3390/ijms26041518>

Kim, M.K., Kwon, JO., Song, MK. et al. Salt-inducible kinase 1 regulates bone anabolism via the CRTCl–CREB–Id1 axis. *Cell Death Dis* 10, 826 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1915-4>

Kwiek, N. C., Thacker, D. F., Datto, M. B., Megosh, H. B., & Haystead, T. A. (2006). PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. *Cellular signalling*, 18(10), 1769–1778. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.01.019>

Lanfranchi, M., Yandiev, S., Meyer-Dilhet, G., Ellouze, S., Kerkhofs, M., Dos Reis, R., Garcia, A., Blondet, C., Amar, A., Kneppers, A., Polvèche, H., Plassard, D., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Mounier, R., Bourgeois, C. F., Raineteau, O., Goillot, E., & Courchet, J. (2024). The AMPK-related kinase NUA1 controls cortical axons branching by locally modulating mitochondrial metabolic functions. *Nature communications*, 15(1), 2487. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46146-6>.

Le, Q. D., Lewis, A., Dix-Matthews, A., Ringler, P., Duff, A., Whitten, A. E., Atkin, R., Brunner, M., Ho, D., Iyer, K. S., Marshall, A. C., Fox, A. H., & Bond, C. S. (2025). Structural Characteristics and Properties of the RNA-Binding Protein hnRNPK at Multiple Physical States. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1356. <https://doi.org/10.3390/ijms26031356>

Li Y, Wang H, Wan J, Ma Q, Qi Y and Gu Z (2022) The hnRNPK/A1/R/U Complex Regulates Gene Transcription and Translation and is a Favorable Prognostic Biomarker for Human Colorectal Adenocarcinoma. *Front. Oncol.* 12:845931. doi: 10.3389/fonc.2022.845931

Liang, Y., Liu, J., & Feng, Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & bioscience*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-9>

Liu, L., Luo, C., Luo, Y., Chen, L., Liu, Y., Wang, Y., Han, J., Zhang, Y., Wei, N., Xie, Z., Wu, W., Wu, G., & Feng, Y. (2018). MRPL33 and its splicing regulator hnRNPK are required for mitochondria function and implicated in tumor progression. *Oncogene*, 37(1), 86–94. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.314>

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>

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, 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., Li, A., ... Zhang, H. (2017). Polo-like kinase 1 coordinates biosynthesis during cell cycle progression by directly activating pentose phosphate pathway. *Nature communications*, 8(1), 1506. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01647-5>

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., Li, A., ... Zhang, H. (2017). Polo-like kinase 1 coordinates biosynthesis during cell cycle progression by directly activating pentose phosphate pathway. *Nature communications*, 8(1), 1506. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01647-5>

Martijn Kerkhofs, Géraldine Meyer-Dilhet, Hélène Polv  che, Sozerko Yandiev, Jacqueline Tait-Mulder, Sergio Lilla, David Sumpton, Daniel J. Murphy, Eun-Young Erin Ahn, Cyril F. Bourgeois, Evelyne Goillot, Julien Courchet. bioRxiv 2025.10.10.681550; doi: <https://doi.org/10.1101/2025.10.10.681550>

Messias, A. C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M., & Ostareck, D. H. (2006). The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *Journal of molecular biology*, 361(3), 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.025>

Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., & Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer cell*, 22(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.016>

Moumen, A., Magill, C., Dry, K. L., & Jackson, S. P. (2013). ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(4), 698–704. <https://doi.org/10.4161/cc.23592>

Mucha, B., Qie, S., Bajpai, S., Tarallo, V., Diehl, J. N., Tedeschi, F., Zhou, G., Gao, Z., Flashner, S., Klein-Szanto, A. J., Hibshoosh, H., Masataka, S., Chajewski, O. S., Majsterek, I., Pytel, D., Hatzoglou, M., Der, C. J., Nakagawa, H., Bass, A. J., Wong, K. K., ... Diehl, J. A. (2022). Tumor suppressor mediated ubiquitylation of hnRNPK is a barrier to oncogenic translation. *Nature communications*, 13(1), 6614. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34402-6>

Nong, S., Han, X., Xiang, Y., Qian, Y., Wei, Y., Zhang, T., Tian, K., Shen, K., Yang, J., & Ma, X. (2023). Metabolic reprogramming in cancer: Mechanisms and therapeutics. *MedComm*, 4(2), e218. <https://doi.org/10.1002/mco2.218>

Olivares-Hernández, A., del Barco Morillo, E., Miramontes-González, J. P., Figuero-Pérez, L., Pérez-Belmonte, L., Martín-Vallejo, J., Martín-Gómez, T., Escala-Cornejo, R., VidalTocino, R., Hernández, L. B., Sarmiento, R. G., de la Cruz, M. D. L., Cruz-Hernández, J. J., & Pérez, C. P. (2022). Immunohistochemical Assessment of the P53 Protein as a Predictor of Non-Small Cell Lung Cancer Response to Immunotherapy. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 27(3). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703088>

Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., & Hentze, M. W. (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Molecular and cellular biology*, 22(13), 4535–4543. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4535-4543.2002>

Otto Warburg; The Metabolism of Carcinoma Cells¹. *The Journal of Cancer Research* 1 March 1925; 9 (1): 148–163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>

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>.

Palma, M., Riffo, E. N., Sukanuma, T., Washburn, M. P., Workman, J. L., Pincheira, R., & Castro, A. F. (2019). Identification of a nuclear localization signal and importin beta members mediating NUA1 nuclear import inhibited by oxidative stress. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9), 16088–16107. <https://doi.org/10.1002/jcb.28890>

Palma, M., Riffo, E., Farias, A., Coliboro-Dannich, V., Espinoza-Francine, L., Escalona, E., Amigo, R., Gutiérrez, J. L., Pincheira, R., & Castro, A. F. (2023). NUA1 coordinates growth factor-dependent activation of mTORC2 and Akt signaling. *Cell & bioscience*, 13(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-01185-2>

Pan, G. Q., Yan, Y. C., Li, R. Z., Xiong, C., Zhang, S. P., Qu, Y., Dong, R., Zhou, Y., Zhang, T. S., Chen, Z. Q., Zhang, X. L., Dong, X. F., Wang, D. X., Dong, Z. R., & Li, T. (2025). Targeting SAMD1 enhances the effect of anti-PD-1 plus lenvatinib therapy in hepatocellular carcinoma by increasing ferroptosis sensitivity and immune response. *Metabolism: clinical and experimental*, 170, 156304. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2025.156304>

Park, H. E., Yoo, S. Y., Cho, N. Y., Bae, J. M., Han, S. W., Lee, H. S., Park, K. J., Kim, T. Y., & Kang, G. H. (2021). Tumor microenvironment-adjusted prognostic implications of the KRAS mutation subtype in patients with stage III colorectal cancer treated with adjuvant FOLFOX. *Scientific reports*, 11(1), 14609. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94044-4>

Pastor, D. M., & Schlom, J. (2021). Immunology of Lynch Syndrome. *Current Oncology Reports*, 23(8), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01085-z>

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>

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., Drysdale, M., ... 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>

Prieto, J., García-Cañaveras, J. C., León, M., Sendra, R., Ponsoda, X., Izpisúa Belmonte, J. C., Lahoz, A., & Torres, J. (2021). c-MYC Triggers Lipid Remodelling During Early Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. *Stem cell reviews and reports*, 17(6), 2245–2261. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10239-2>

Ross, P. (2008). *Histología* (Editorial Panamericana (ed.); 3ra ed., pp. 13–19)

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. and Ralser, M. (2015), The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev*, 90: 927-963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>

Torang, A., Kirov, A.B., Lammers, V. et al. Enterocyte-like differentiation defines metabolic gene signatures of CMS3 colorectal cancers and provides therapeutic vulnerability. *Nat Commun* 16, 264 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55574-3>

Vande Voorde, J., Steven, R. T., Najumudeen, A. K., Ford, C. A., Dexter, A., Gonzalez-Fernandez, A., Nikula, C. J., Xiang, Y., Ford, L., Maneta Stavrakaki, S., Gilroy, K., Zeiger, L. B., Pennel, K., Hatthakarnkul, P., Elia, E. A., Nasif, A., Murta, T., Manoli, E., Mason, S., Gillespie, M., ... Sansom, O. J. (2023).

Metabolic profiling stratifies colorectal cancer and reveals adenosylhomocysteinase as a therapeutic target. *Nature metabolism*, 5(8), 1303–1318. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00857-0>

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. *The Journal of biological chemistry*, 273(24), 14968–14974. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14968>

Wang, Y. P., Zhou, L. S., Zhao, Y. Z., Wang, S. W., Chen, L. L., Liu, L. X., Ling, Z. Q., Hu, F. J., Sun, Y. P., Zhang, J. Y., Yang, C., Yang, Y., Xiong, Y., Guan, K. L., & Ye, D. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *The EMBO journal*, 33(12), 1304–1320. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387224>

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>

Worral Wilfred Raj, A. S., & Manoharan, R. (2025). NUAks promote mTOR/c-Myc-induced glucose and glutamine reprogramming for cell growth and metastasis in breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1871(1), 167508. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167508>.

Xu, Q., Wang, X., Hu, J., Wang, Y., Lu, S., Xiong, J., Li, H., Xiong, N., Huang, Y., Wang, Y., & Wang, Z. (2025). Overexpression of hnRNPK and inhibition of cytoplasmic translocation ameliorate lipid disorder in doxorubicin-induced cardiomyopathy via PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Free radical biology & medicine*, 231, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2025.02.021>

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), 180239. <https://doi.org/10.1098/rsob.180239>

Yang, C., Zhang, Y., Lin, S., Liu, Y., & Li, W. (2021). Suppressing the KIF20A/NUAK1/Nrf2/GPX4 signaling pathway induces ferroptosis and enhances the sensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin. *Aging*, 13(10), 13515–13534. <https://doi.org/10.18632/aging.202774>

Yang, H., Wei, Z., Song, Y., Du, K., Yin, N., Lu, H., Li, B., Hou, L., Xing, P., Chen, L., Wang, C., & Xie, S. (2023). NUAk1 promotes tumor metastasis through upregulating slug transcription in esophageal

squamous cell carcinoma. *Cancer cell international*, 23(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03101-7>

Yang, X., Wen, Y., Liu, S., Duan, L., Liu, T., Tong, Z., Wang, Z., Gu, Y., Xi, Y., Wang, X., Luo, D., Zhang, R., Liu, Y., Wang, Y., Cheng, T., Jiang, S., Zhu, X., Yang, X., Pan, Y., Cheng, S., ... Gao, S. (2022). LCDR regulates the integrity of lysosomal membrane by hnRNP K-stabilized LAPTM5 transcript and promotes cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(5), e2110428119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110428119>

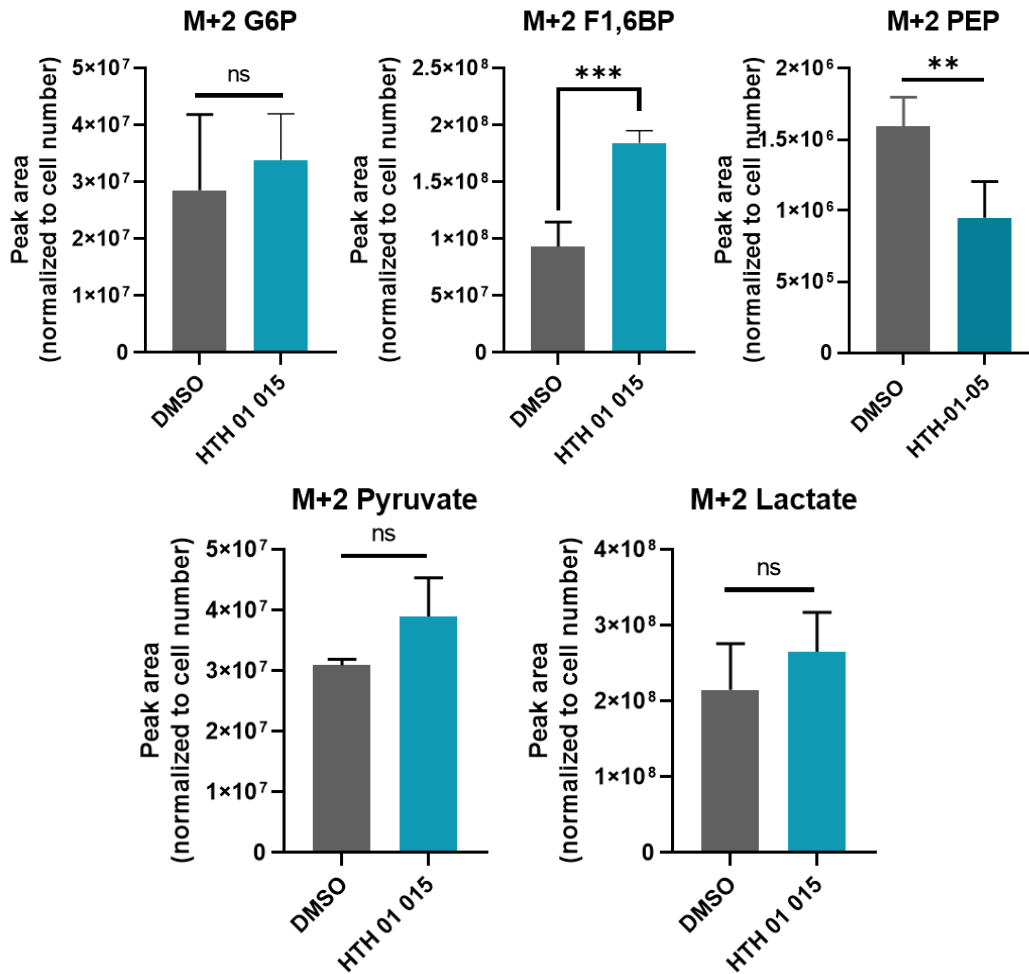
Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D. G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A. R., & Alessi, D. R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Science signaling*, 3(115), ra25. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000616>

Zhang, M., Xie, X., Chen, E., Guo, Y., Wang, H., Yang, J., Zhao, W., Li, C., Zhang, W., Guo, Z., Wang, Y., Zhu, Y., Yao, H., Fang, F., Yan, L., & Liu, X. (2025). The ribonucleoprotein hnRNP K promotes hepatic steatosis by suppressing the nuclear hormone receptor PPAR α . *The Journal of biological chemistry*, 301(9), 110500. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110500>

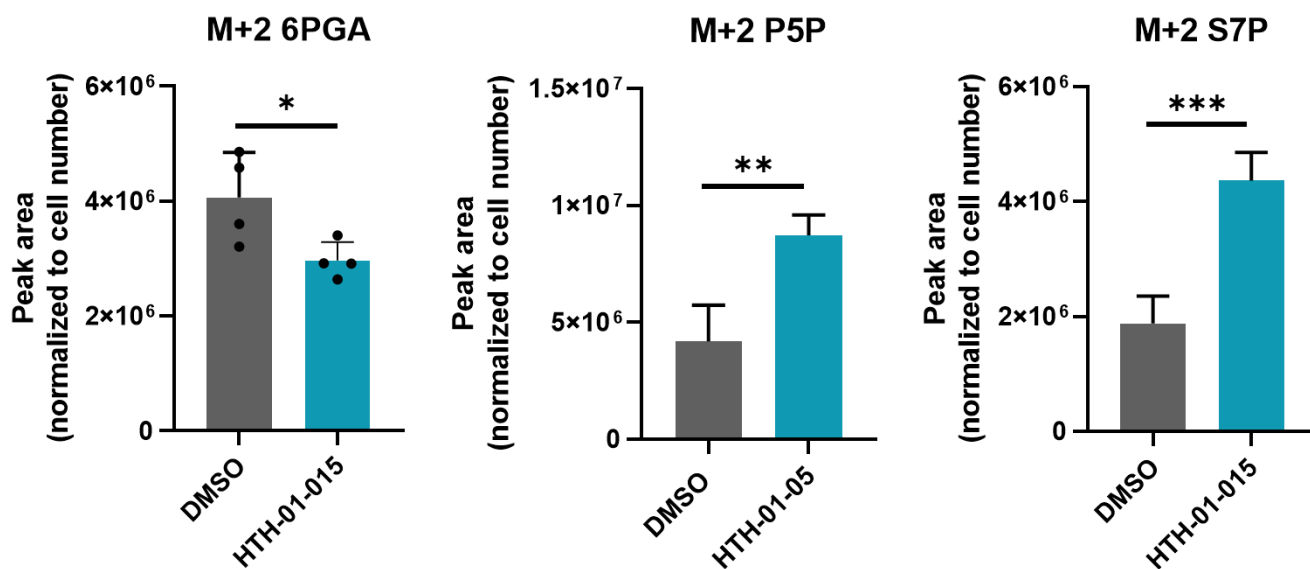
Zhang, Y., Wu, Y., Cheng, A., Cui, F., Yang, Z., & Guo, J. (2025). The lactylation of glucose-6-phosphate dehydrogenase promotes malignant phenotypes in cancer cell lines. *Molecular biology reports*, 52(1), 861. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10960-y>

Zhang, Y., Xu, Y., Lu, W., Li, J., Yu, S., Brown, E. J., Stanger, B. Z., Rabinowitz, J. D., & Yang, X. (2022). G6PD-mediated increase in de novo NADP⁺ biosynthesis promotes antioxidant defense and tumor metastasis. *Science advances*, 8(29), eabo0404. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo0404>

Anexos



Anexo 1. La inhibición de NUAK1, incrementa el flujo de glucosa a través de la glicólisis. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUAK1 durante 24h. Luego, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico t-student. NS=no significativo, **P<0.01, ***P<0.001.



Anexo 2. La inhibición de NUA1 disminuye el flujo a través de la rama oxidativa, pero incrementa la rama no oxidativa de la PPP. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico t-student. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

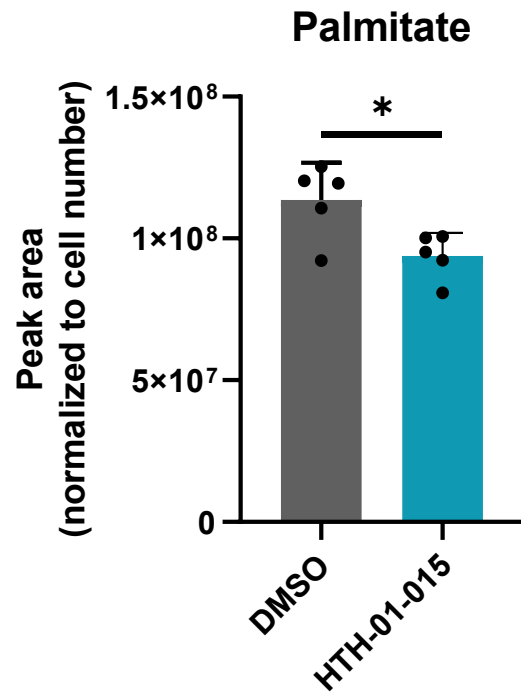
A

TKT	Transketolase	877	ILATPPQEDAPpSVDIA NIR_ (Ser295)
------------	----------------------	------------	--

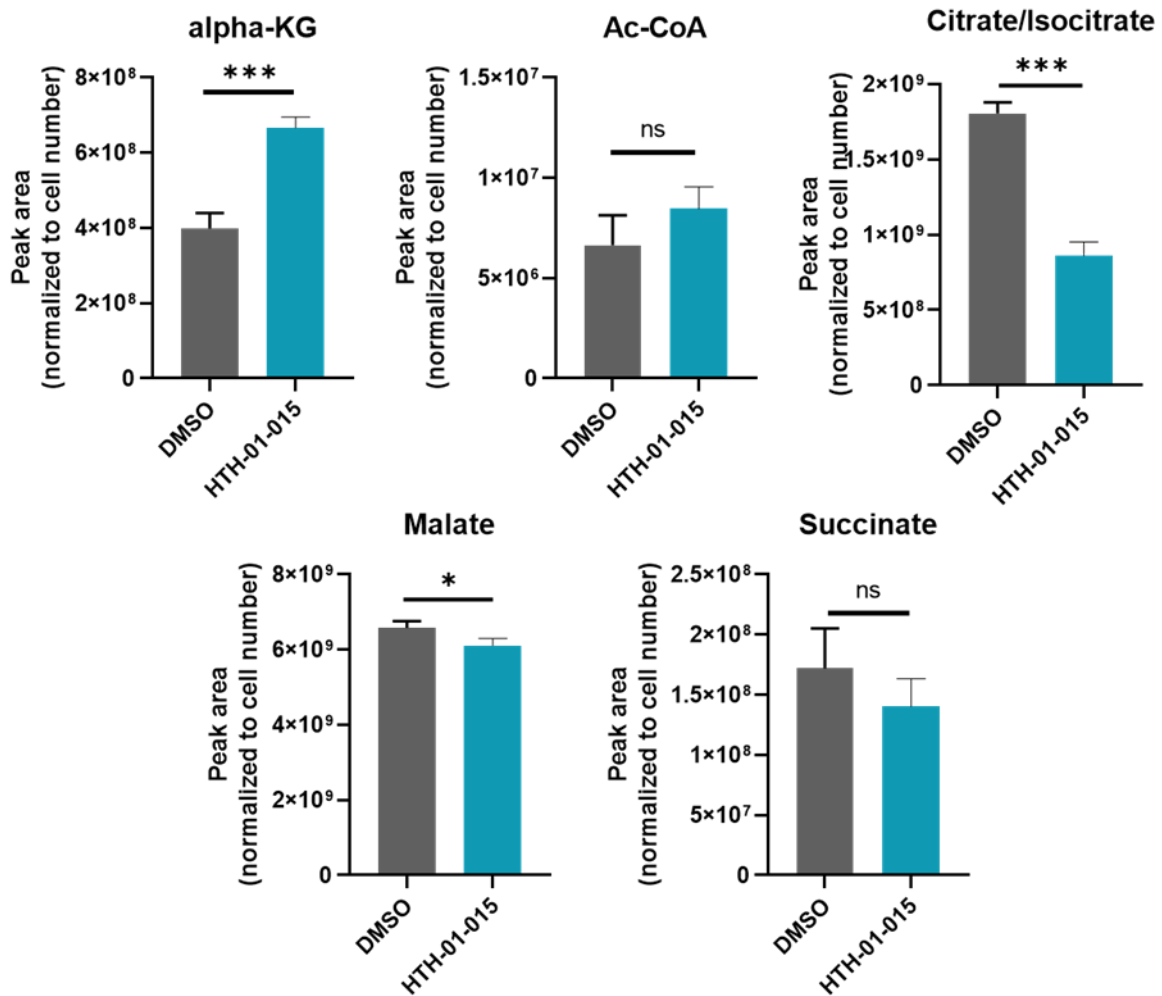
B

	Kinase	Gene Name	Kinase Family	Log ₂ (Score)	Score Rank	Site Percentile	Percentile Rank ↑
∨	CK1D	CSNK1D	CK1	6.59	1	99.96	1
∨	CK1G1	CSNK1G1	CK1	3.6471	2	99.75	2
∨	CK1A	CSNK1A1	CK1	3.0399	3	99.65	3
∨	CK1G2	CSNK1G2	CK1	2.8881	4	98.33	4
∨	YANK2	STK32B	AGC	1.2684	13	97.44	5
∨	CK1G3	CSNK1G3	CK1	1.7156	7	95.81	6
∨	CK1A2	CSNK1A1L	CK1	1.4332	10	95.13	7
∨	GRK3	GRK3	AGC	1.9892	6	94.99	8
∨	PLK2	PLK2	Other	2.0361	5	94.05	9
∨	GRK2	GRK2	AGC	1.1722	14	93.13	10

Anexo 3. NUAK1 regula la fosforilación de TKT. A) Análisis obtenido de experimentos de fosfoproteómica de células U2OS tratadas con un silenciador específico para NUAK1. **B)** Análisis de potenciales quinasas responsables de fosforilar el residuo determinado para TKT regulado por NUAK1 a través de The Kinome atlas.



Anexo 4. La inhibición de NUA1 disminuye los niveles de ácido palmítico. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar para los niveles de ácido palmítico. Se realizó un análisis estadístico t-student. *P<0.05.



Anexo 5. Efecto de NUA1 sobre los niveles de metabolitos del ciclo de Krebs. Las células SW480 fueron tratadas con el inhibidor de NUA1 durante 24h. Luego, los metabolitos fueron extraídos y analizados según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico t-student. NS=no significativo, *P<0.05, ***P<0.001.