



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

**Estudio de la función de NUA1 como regulador de la  
actividad mitocondrial en líneas celulares de cáncer.**



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

EMILIA ANDREA ESCALONA MIÑO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

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

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr.  
Ariel Castro  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra.  
Amparo Uribe  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dr.  
Francisco Nualart  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr.  
Alejandro Godoy  
Pontificia Universidad Católica de Chile

---

Dr.  
Ariel Castro  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

## Resumen

NUAK1 es una serina/treonina quinasa miembro de la familia de AMPK- $\alpha$  que posee localización nuclear y citoplasmática dependiendo de la línea celular de cáncer. NUAK1 se encuentra sobreexpresado en múltiples tipos de cáncer, donde muestra una expresión dependiente del grado de malignidad de los tejidos cancerosos, por lo que se asocia a un mal pronóstico del paciente. La expresión de NUAK1 ha sido relacionada a varios procesos involucrados en la progresión tumoral, como la supervivencia celular, la proliferación celular, la migración, la invasión y la metástasis. En células de hepatocarcinoma, NUAK1 participa en el mantenimiento de los niveles de ATP, sin embargo, los mecanismos subyacentes y su asociación con la localización subcelular de NUAK1 no han sido dilucidados. Para estudiar lo anterior, investigamos el rol de NUAK1 citosólico en la bioenergética, glicólisis y el metabolismo oxidativo de células cancerosas. Primero, evaluamos los niveles de ATP y la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial en modelos celulares con NUAK1 sobreexpresado o inhibido. Con lo anterior determinamos que la sobreexpresión de NUAK1 citosólico se asocia con la producción de ATP mitocondrial. Luego, por ensayo de co-inmunoprecipitación postulamos que lo anterior, posiblemente, ocurre a través de la interacción de la subunidad ATP5A. Además, evaluamos la función de NUAK1 sobre el potencial de membrana mitocondrial, mediante microscopía fluorescente *in vivo* con tinción de TMRE (tetrametilrodaminaetiléster). Como se esperaba, la sobreexpresión de NUAK1 citosólico disminuyó el potencial de membrana mitocondrial, mientras que la inhibición de NUAK1 lo aumentó, lo que aportó evidencia de que NUAK1, localizado en el citosol, está involucrado en la regulación de la función mitocondrial. De manera complementaria, la inhibición de NUAK1 alteró drásticamente la morfología mitocondrial, generando estructuras de "donut" mitocondrial. Respecto a lo anterior, mostramos evidencia de que estas alteraciones morfológicas estaban asociadas a un desequilibrio de estrés oxidativo. Finalmente, evaluamos la tasa glicolítica y el lactato extracelular en modelos celulares con NUAK1 sobreexpresado o inhibido. En nuestros resultados, encontramos que la inhibición de NUAK1 citosólico disminuyó tanto la capacidad de respiración mitocondrial como la capacidad glicolítica. Es interesante destacar que NUAK1 en su localización nuclear fue asociado a la promoción de la glicólisis y del switch glicolítico. Este trabajo entrega información sobre el rol transversal de NUAK1 en el mantenimiento de la bioenergética de células de cáncer, dependiendo de su localización subcelular. Además, por primera vez mostramos evidencia de que NUAK1 tiene una función central en la glicólisis y en las capacidades metabólicas. Las funciones metabólicas de NUAK1 identificadas en este trabajo podrían ser relevantes para la comprensión de la progresión tumoral y el mal pronóstico de varios tipos de cáncer. Futuros estudios permitirán comprender los mecanismos moleculares asociados a las funciones metabólicas de NUAK1.

## Summary

NUAK1 is a serine/threonine kinase member of AMPK catalytic subunit family and, localizes in cytosolic and nuclear subcellular compartments, according to the cancer cell line. NUAK1 is overexpressed in multiple cancers and It shows stage-dependent expression in cancer tissues associated with the most malignant tumor and poor patient prognosis. NUAK1 expression is associated to several tumor progression processes, such as supporting cell survival, promoting cell proliferation, cell migration, invasion, and metastasis. In addition, NUAK1 has been involved in the maintenance of ATP levels in hepatocarcinoma cancer cells, but the underlying mechanism and its association with NUAK1 subcellular localization are unclear. To find out this, we studied the role of the cytosolic NUAK1 in the regulation of cancer cell bioenergetics, glycolysis and oxidative metabolism. We initially measured ATP levels and mitochondrial oxygen consumption rate in overexpressed-NUAK1 cell models or under NUAK1 inhibition. We determined that cytosolic NUAK1 increases ATP levels and this was associated to the increase of mitochondrial ATP production, possibly through the ATP5A subunit regulation. Also, we evaluated the NUAK1 role in the mitochondrial membrane potential, analyzing by *in vivo* TMRE (tetramethyl rhodamine ethyl ester)-based fluorescent microscopy. As expected, cytosolic NUAK1 overexpression decreased the mitochondrial membrane potential and NUAK1 inhibition increased the mitochondrial membrane potential, supporting that cytosolic located NUAK1 is involved in mitochondrial function regulation. Complementary, NUAK1 inhibition dramatically altered the mitochondrial morphology, leading to the formation of “donut” structures. Besides, we showed evidence that depending-NUAK1 mitochondrial morphology alterations were associated to an oxidative stress unbalance. Finally, we evaluated glycolysis rate and extracellular lactate in overexpressed-NUAK1 or depleted-NUAK1 cell models. We found that cytosolic NUAK1 inhibition decreased both mitochondrial respiration and glycolysis capacities. Interestingly, we also associated nuclear located NUAK1 to the promotion of glycolysis and glycolysis switch. Our current studies support a transversal role of NUAK1 in the bioenergetic maintenance of cancer cells, suggesting different metabolic outcomes depending on its subcellular localization. Additionally, we show for the first time that NUAK1 has a central role in glycolysis and metabolic capacities. The identified roles of NUAK1 in cancer metabolism provide a potential mechanism relevant for tumor progression, and for its association with poor patient prognosis in several cancers. Further studies could shed light on the molecular mechanisms associated to the identified metabolic NUAK1 functions.

## Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1. Marco Teórico.....	1
1.1.1. Cáncer .....	1
1.1.2. Origen del cáncer.....	2
1.1.3. Características de las células del cáncer.....	3
1.1.3.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento.....	4
1.1.3.2. Evasión a estímulos que inhiben el crecimiento celular. ....	4
1.1.3.3. Resistencia a muerte celular.....	5
1.1.3.4. Capacidad replicativa ilimitada.....	5
1.1.3.5. Invasión y metástasis .....	6
1.1.3.6. Angiogénesis .....	7
1.1.4. Generalidades del metabolismo del cáncer .....	8
1.1.5. La glicólisis y el cáncer.....	12
1.1.6. Generalidades de la mitocondria.....	16
1.1.7. La mitocondria y el cáncer .....	21
1.2. Estado del arte y antecedentes de este trabajo.....	24
1.2.1. NUA1 y su asociación con cáncer .....	24
1.2.2. Estructura y localización de NUA1.....	25
1.2.3. Regulación de NUA1. ....	26
1.2.4. Funciones celulares y moleculares de NUA1 .....	27
1.2.4.1. Migración e invasión celular.....	27
1.2.4.2. Participación en la supervivencia celular. ....	28
1.2.4.3. Funciones metabólicas.....	29
1.2.4.4. Capacidad Tumorigénica.....	30
1.3. Problemática actual y formulación del proyecto.....	31
2. Hipótesis y objetivos del trabajo .....	33
2.1. Hipótesis.....	34
2.2. Objetivo General.....	34
2.3. Objetivos específicos.....	34
3. Materiales y métodos .....	35
3.1. Reactivos y anticuerpos.....	35
3.2. Anticuerpos.....	35

3.3. Plásmidos .....	36
3.4. Purificación de Plásmidos.....	37
3.5. Cultivo Celular .....	37
3.6. Transfección transitoria de líneas celulares .....	38
3.7. Generación de partículas virales y de los modelos estables de NUA1 ..... 39	39
3.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y <i>Western blot</i> .....	39
3.9. Co-Inmunoprecipitación .....	40
3.10. Medición de ATP .....	41
3.11. Cuantificación de lactato extracelular .....	41
3.12. Evaluación de la respiración celular .....	42
3.13. Inmunofluorescencia .....	44
3.14. Microscopía <i>in vivo</i> .....	44
3.15. Procesamiento de imágenes .....	45
3.16. Ensayos Estadísticos .....	45
4. Resultados .....	46
4.1. Objetivo 1: Determinar el efecto de la expresión de NUA1, asociada a una localización celular específica, sobre el estado bioenergético celular .....	46
4.1.1. La sobreexpresión de NUA1 citosólico aumenta el ATP intracelular total en células de cáncer .....	46
4.1.2. La sobreexpresión prolongada de NUA1 no incrementa el ATP celular .....	49
4.1.3. La inhibición de NUA1 disminuye el ATP celular bajo condiciones de inhibición mitocondrial.....	51
4.1.4. Resumen de la ejecución del objetivo 1 de este trabajo: NUA1 citosólico aumenta el ATP celular.....	53
4.2. Objetivo 2: Determinar si NUA1 citosólico afecta a la función y a la morfología mitocondrial. ....	54
4.2.1. NUA1 en su localización citosólica aumenta y mantiene la función máxima mitocondrial. ....	55
4.2.2. NUA1 interacciona con la subunidad ATP5A de la ATP sintasa. ....	59
4.2.3. NUA1 en su localización citosólica afecta al potencial de membrana y morfología mitocondrial. ....	62
4.2.4. Los cambios en la morfología mitocondrial NUA1 inducidos por NUA1 involucran estrés oxidativo.....	69

4.2.5. Resumen de la ejecución del objetivo 2 de este trabajo: NUAK1 participa de la regulación de la función mitocondrial. ....	72
4.3. Objetivo 3: Determinar la relación de NUAK1 y su localización celular con la glicólisis. ....	72
4.3.1. NUAK1 citosólico promueve la capacidad glicolítica celular .....	73
4.3.2. NUAK1, en su localización nuclear, promueve y es necesario para la glicólisis, bajo la condición de inhibición mitocondrial .....	75
4.3.3. NUAK1 en su localización nuclear afecta a la expresión de proteínas de la glicólisis .....	77
4.3.4. Resumen de la ejecución del objetivo 3 de este trabajo: NUAK1 participa de la regulación de la glicólisis .....	79
5. Discusión .....	80
5.1. NUAK1 y la bioenergética celular .....	80
5.2. NUAK1 y la glicólisis .....	83
5.3. NUAK1 y las capacidades metabólicas de la célula .....	84
5.4. NUAK1 y el ROS .....	86
5.5. La relación de NUAK1 con el oncogén c-Myc .....	88
5.6. Modelo de las funciones metabólicas de NUAK1 abordadas en este trabajo .....	89
6. Conclusiones .....	92
7. Bibliografía .....	93
8. ANEXOS .....	99

## Índice de figuras

Figura 1: Representación de la fosforilación oxidativa, la glicólisis anaeróbica, y la glicólisis aeróbica.....	12
Figura 2: Esquema de la ruta de la glicólisis .....	15
Figura 3: Tomografía por emisión de positrones utilizada para la detección de cáncer de pulmón.....	16
Figura 4: Esquema del ciclo de KREBS.....	20
Figura 5: Esquema de la cadena transportadora de electrones .....	20
Figura 6. Relación entre la expresión de NUAK1 y el ATP celular. ....	47
Figura 7. NUAK1 citosólico incrementa el ATP celular en células de cáncer. ....	49
Figura 8. La expresión estable de NUAK1 no afecta los niveles de ATP celular. ....	51
Figura 9. La inhibición de la función de NUAK1 afecta el ATP celular de origen glicolítico. ....	53
Figura 10. La expresión de NUAK1 citosólico aumenta la respiración máxima mitocondrial y la respiración asociada a la producción de ATP.....	57
Figura 11. La inhibición de NUAK1 disminuye la respiración máxima mitocondrial y la capacidad de reserva mitocondrial.....	59
Figura 12. Predicción de fosforilación de NUAK1 en las secuencias de las subunidades de la ATP sintasa.....	61
Figura 13. NUAK1 citosólico interacciona con la subunidad ATP5A. ....	62
Figura 14. NUAK1 citosólico disminuye el potencial de membrana mitocondrial.....	66
Figura 15. La pérdida de función de NUAK1 aumenta el potencial de membrana mitocondrial y afecta a la morfología y biomasa mitocondrial.....	68
Figura 16. Efecto de la alteración de la función de NUAK1 en la expresión de proteínas asociadas a la función mitocondrial. ....	69
Figura 17. La formación de la estructura de <i>donuts</i> mitocondrial dependiente de NUAK1 involucra estrés oxidativo.....	71
Figura 18. NUAK1 es necesario para mantener la capacidad glicolítica celular. ....	74
Figura 19. La expresión de NUAK1 citosólico no afecta a la capacidad glicolítica celular	75
Figura 20. NUAK1 nuclear incrementa la glicólisis y afecta a la expresión de los transportadores de monocarboxilato, bajo condiciones de inhibición mitocondrial. ....	78
Figura 21. Esquema resumen de las funciones metabólicas de NUAK1.....	91
Figura 21. Esquema resumen de las funciones metabólicas de NUAK1.....	91

Figura A1. Localización subcelular de NUAk1. Figura A2. Curva estándar utilizada para la medición de ATP..	919
Figura A2. Curva estándar utilizada para la medición de ATP	919
Figura A3. Curva estándar de densidad óptica versus lactato.....	100
Figura A4. Esquema utilizado para el cálculo de parámetros de respiración mitocondrial	10091
Figura A5. Esquema utilizado para el cálculo de parámetros glicolíticos.....	101
Figura A6. Evaluación de la interacción entre ATP5A y NUAk1 en MCF-7.....	101
Figura A7. Predicción de localización mitocondrial de NUAk1.....	10291

## Índice de tablas

Tabla 1: Plásmidos utilizados para estudiar los efectos de NUAk1.....	36
Tabla 2. Tabla de los potenciales interactores de NUAk1. ....	60



## Abreviaturas

1,3-BPGA: 1,3-bisfosfoglicerato  
3-PGA: 3-fosfoglicerato  
AMPK: AMPK activated kinases.  
ATP: adenosina trifosfato  
DHAP: dihidroxiacetona fosfato  
ENO1: enolasa 1  
F1,6BP: fructosa-1,6-bifosfato  
F2,6BP: fructosa-2,6-bifosfato  
F6P: fructosa-6-fosfato  
FADH2: flavín adenín dinucleótido  
G3P: glicelardehído-3-fosfato  
G6P: glucosa-6-fosfato  
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GLUT: transportador de glucosa  
HIF1 $\alpha$ : Hipoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha  
HK: Hexoquinasa  
iMEFs: immortalized Mouse embryonic fibroblasts  
IMM: inner mitochondrial membrane  
LDHA: Lactato deshidrogenasa A  
LKB1: Liver kinase B1  
MCT: transportador de monocarboxilato  
MYPT1: Myosin Phosphatase Target Subunit 1  
MYPT1: myosin phosphatase targeting-1  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NRF2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2  
NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas  
OMM: outer mitochondrial membrane  
OXPHOS: fosforilación oxidativa  
PBS: phosphate buffered saline  
PDH: piruvato deshidrogenasa  
PEP: fosfoenolpiruvato



PFK1: fosfofructoquinasa1

PFK2: fosfofructoquinasa 2

PGAM: fosfoglicerato mutasa

PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PGC-1 $\beta$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta

PGI: fosfoglucosaisomerasa

PGK1: fosfoglicerato quinasa

PK: piruvato quinasa

PP1- $\beta$ : protein phosphatase 1 beta

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SLN: secuencia de localización nuclear

TCA: ácidos tricarbónicos

TPI: triosa isomerasa fosfato

VEGF: vascular endothelial growth factor



## **1. Introducción**

### **1.1. Marco Teórico**

#### **1.1.1. Cáncer**

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008 se diagnosticaron 12,7 millones de nuevos casos y 7,6 millones de personas fallecieron de esta patología [1]. En nuestro país, el cáncer representa la segunda causa de muerte, según datos del Ministerio de Salud [2]. El cáncer es considerado un desorden celular, debido a que las células sufren cambios funcionales, transformándose y adquiriendo la capacidad de proliferar anormalmente, lo cual generalmente lleva a la formación de masas celulares conocidas como neoplasias o tumores. En este punto, es importante diferenciar entre la existencia de tumores benignos y malignos, donde los primeros corresponden a un aumento en el número de células, las cuales mantienen su localización tisular, no invaden, ni se esparcen a otros tejidos, por otro lado, las células del tumor maligno son altamente invasivas y consiguen desplazarse a otros tejidos a través del sistema linfático o circulatorio, mediante el proceso conocido como metástasis. Cuando nos referimos a cáncer, sólo nos referimos a la presencia de células con características malignas. La clasificación más común del cáncer es según el origen histológico y la ubicación primaria de las células transformadas. Entonces, el cáncer se clasifica en carcinomas (origen epitelial), sarcomas (origen tejido conectivo), leucemias (origen hematopoyético y en la médula ósea), linfomas (origen en ganglios linfáticos) y mielomas (origen células plasmáticas). De los anteriores, los más comunes son los carcinomas, los cuales incluyen aproximadamente el 90% de los cánceres humanos [3].

### **1.1.2. Origen del cáncer.**

Durante las últimas décadas muchos estudios se han enfocado en determinar la identidad de los agentes y/o factores causantes del cáncer, con la intención de generar mecanismos preventivos de la enfermedad. Dentro de los principales factores de riesgo causantes del cáncer, se encuentra la exposición a radiación ionizante, la exposición a agentes químicos carcinogénicos, infección viral o con algunos microorganismos, y predisposición genética [3]. Tanto la radiación, como muchos agentes químicos, actúan generando daños en el material genético, lo que conduce a la aparición de mutaciones genéticas, las cuales promoverán el desarrollo de las características malignas de la célula del cáncer. Ejemplos de estos agentes, son la radiación ultravioleta, la cual genera cáncer de piel, o las toxinas del humo del cigarro, que generan cáncer de pulmón. Otra forma de actuar de los agentes químicos es induciendo la excesiva proliferación, llevando a la célula a acumular errores genéticos y por consecuencia a generar su transformación celular. Ejemplo de esto es el químico éster de forbol, presente en algunas plantas [4]. En base a lo anterior, queda a la vista que las alteraciones genéticas son fundamentales en el proceso de transformación celular y tumorigénesis, es decir, el cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones en genes que gobiernan el fenotipo del tumor. Las mutaciones genéticas pueden afectar tantos a genes que promueven o bien que inhiben el cáncer. En base a lo anterior, se conocen como protooncogenes a aquellos genes que se relacionan con el crecimiento y proliferación normal de las células, por lo que su mutación es de tipo dominante, proporcionan una alta capacidad proliferativa a la célula, y cuando se encuentran mutados se denominan oncogenes. Por otro lado, los genes supresores de tumores son genes que codifican proteínas que participan en mecanismos de control frente a disfunciones celulares, como por ejemplo detención del ciclo celular o promoción de la apoptosis, en este caso la mutación es de tipo recesiva y se traduce en una pérdida de función celular. Algunos de los principales genes asociados a la generación y malignidad

del cáncer son el protooncogen Myc y el supresor de tumores p53 [5-7]. El protooncogen Myc (c-Myc) controla la expresión de hasta el 15% de los genes humanos implicados en procesos de proliferación, diferenciación celular, metabolismo y apoptosis. c-Myc se expresa de manera desregulada en múltiples tumores, tal como el cervicouterino, de mama, de colon, de pulmón, de páncreas, de estómago y cerebrales, favoreciendo la supervivencia del tumor [5]. El gen p53 está mutado en la mitad de los tumores humanos, cuya pérdida impide a la célula controlar varios mecanismos anti-cáncer como la apoptosis, la reparación genómica y el control del ciclo celular [6, 7]. Cabe destacar que, a pesar de la existencia de algunos marcadores genéticos predominantes en el cáncer, el desarrollo del tumor favorece la aparición secuencial de múltiple daño genético en distintas zonas cromosómicas (modelo tumorigénico “*multistep*” de Fearon y Vogelstein, 1990), dependiente de la genética inherente a cada individuo. Algunas de estas mutaciones confieren mayor ventaja selectiva a algunas de las nuevas células (Ej, mayor tasa proliferativa), transformándolas rápidamente en la parte predominante del creciente tumor, permitiendo así la aparición de nuevas subpoblaciones tumorales y promoviendo la generación de un tumor de características policlonales [8]. Por las razones anteriores, la complejidad genética asociada al inicio y al desarrollo de esta patología aún no puede ser completamente dilucidada.

### **1.1.3. Características de las células del cáncer.**

Los tumores son un complejo tejido de células proliferativas, compuestas por distintos tipos celulares que interaccionan unos con otros y que participan de forma activa de la tumorigénesis del tejido. Hanahan y Weinberg el año 2000 buscaron racionalizar las capacidades funcionales comunes a la mayoría de las células tumorales (*hallmark* del cáncer), con la finalidad de aportar principios organizadores que permitieran guiar el estudio de la diversidad de enfermedades neoplásicas existentes [9], aunque más adelante se

incorporaron 2 *hallmark* adicionales (adaptación metabólica y la modulación del sistema inmune). Las 6 principales y primeras características propuestas fueron:

#### **1.1.3.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento.**

Tejidos normales mantienen controlado su crecimiento y ciclo celular, asegurando el mantenimiento del correcto número de células y, por ende, la apropiada estructura tisular. Células de cáncer poseen desregulación de las rutas asociadas a este control. Por dar algunos ejemplos, las células cancerosas pueden producir ellas mismas o inducir al tejido normal circundante (estroma asociado al tumor) a la producción de factores de crecimiento, independizándose de las señales paracrinas propias de un correcto crecimiento celular. Otra manera de como las células del cáncer sustentan su elevada proliferación, es sobreexpresando los receptores de membrana que reconocen los factores de crecimiento, proporcionando a la célula una hipersensibilidad a la presencia de estos. Por otro lado, la célula se puede independizar de la estimulación de factores de crecimiento, expresando proteínas de señalización constitutivamente activadas y/o inhibiendo los mecanismos de retroalimentación negativo, proporcionando a la célula continuas y desreguladas señales proliferativas. Ejemplo usual de esto en cáncer, es la sobreexpresión de la proteína anclada a la membrana interna, RAS, en la cual convergen múltiples señales proliferativas y se encuentra hiperactivada en alrededor del 20% de todos los cánceres [10].

#### **1.1.3.2. Evasión a estímulos que inhiben el crecimiento celular.**

Un ciclo celular controlado, posee puntos de chequeo, que le permiten a la célula dividirse en condiciones celulares óptimas o en caso contrario, derivar a senescencia o muerte celular programada (apoptosis). Dentro de las principales proteínas involucradas se encuentran la proteína del retinoblastoma (RB), la cual transduce señales inhibitorias de crecimiento provenientes del extracelular (interacción célula-entorno celular) [11] e

intracelular (control del ciclo celular), y la proteína p53, la cual transduce señales inhibitorias intracelulares (daño genómico, niveles bajos de glucosa, oxígeno o nucleótidos) [12]. Estas proteínas se encuentran funcionalmente inhibidas en múltiples cánceres, favoreciendo la proliferación independiente de las condiciones ambientales y genómicas de la célula. Otra forma curiosa de como el cáncer evade estímulos inhibitorios de crecimiento celular es utilizando como factor estimulador el conocido factor anti-proliferativo TGF- $\beta$  [9, 12, 13].

#### **1.1.3.3. Resistencia a muerte celular**

La homeostasis celular, depende del balance de múltiples procesos, como el apropiado suministro de nutrientes, la mantención del estado redox, el correcto funcionamiento genómico, entre otros, cuya alteración irreparable en alguno de ellos conlleva a iniciar el proceso apoptótico, los cuales convergen en la activación de proteasas (caspasa 9) que desencadenan una cascada proteolítica de degradación celular. También estímulos extracelulares pueden iniciar el proceso apoptótico (caspasa 8). Como ya se mencionó anteriormente, una de las formas en que la célula de cáncer se mantiene viable a pesar del daño genómico es por mutaciones en p53. Por otro lado, para sobrevivir a la escasez de nutrientes producto de la elevada proliferación, la célula tumoral aumenta los procesos autofágicos, los cuales permiten obtener nutrientes y energía a partir de la degradación de organelos propios de la célula. También, una célula de cáncer puede evadir directamente la muerte celular, disminuyendo la expresión de caspasas o aumentando la cantidad de la proteína anti-apoptótica BCL-2 [9, 12, 13].

#### **1.1.3.4. Capacidad replicativa ilimitada**

Es conocido que las células normales poseen una cantidad de divisiones celulares limitadas, que dependen principalmente de la extensión y protección de los telómeros de

cada cromosoma. Los telómeros son secuencias cortas, repetidas en tándem en los extremos cromosómicos, implicados en el mantenimiento de la integridad del ADN, protegiéndolo del ataque de exonucleasas, impidiendo que se produzcan fusiones espontáneas entre los extremos de los cromosomas y protegiéndolo del acortamiento cromosómico en cada división celular. Cuando esta protección falla la célula pasa a estado senescente. La telomerasa es la enzima encargada de generar y mantener estas repeticiones en tándem y se encuentra inactiva en las células somáticas diferenciadas, limitando así la capacidad proliferativa de estas. La célula de cáncer en cambio, evade este problema puesto que ésta enzima se encuentra funcionalmente activa en la mayoría de los casos [12].

#### **1.1.3.5. Invasión y metástasis**

Las células tumorales malignas presentan una activa invasión tisular que avanza a medida que también avanza la progresión del cáncer. Para células epiteliales, el inicio de la carcinogénesis comienza con la observación de neoplasia local, en la cual las células pierden su organización y polaridad típica epitelial, y pasan a comportarse como célula mesenquimal, es decir, pasan a poseer morfología alargada, se unen y avanzan por la matriz extracelular y las adhesiones célula-célula ya que no restringen la proliferación o movimiento celular. Este tipo de invasión lleva por nombre transición epitelio-mesenquimal y está orquestada por un aumento de múltiples factores de transcripción involucrados en procesos migratorios durante la embriogénesis. Dos tipos más de invasión han sido descritas: la invasión colectiva, en la cual un grupo de células cancerosas avanzan hacia el tejido circundante como una sola masa, y la invasión ameboide, donde una célula de cáncer se desplaza de manera amorfa, sin adherirse a la matriz extracelular, ni degradarla mayormente, más bien adapta su forma a los espacios presentes en el tejido intersticial que le permiten migrar [12]. Luego de la invasión local, la célula de cáncer puede realizar

metástasis siguiendo una serie de pasos que incluyen la intravasación en vasos sanguíneos o linfáticos, el tránsito a través de los sistema linfático o circulatorio, la extravasación hacia el parénquima de un tejido distal, la micrometastasis, que consiste en la formación de pequeños nódulos metastásicos no visibles y la colonización celular que da origen al nuevo tumor. Para que este último paso ocurra, la célula debe lograr adaptarse al nuevo microambiente, sobrepasando principalmente el estrés metabólico presente en este tejido distal [9, 12, 13].

#### **1.1.3.6. Angiogénesis**

Como todo tejido, un tejido tumoral necesita nutrientes y oxígeno, así como la manera de eliminar sus desechos metabólicos y el CO<sub>2</sub>. Para solucionar las necesidades anteriores el tumor realiza angiogénesis, proceso por el cual se generan nuevas ramificaciones de vasos sanguíneos derivados de la vascularización circundante, que permitirán el suministro sanguíneo a las células del tumor. La vascularización tumoral comienza en las tempranas etapas invasivas de la neoplasia. Una de las más conocidas formas de comenzar es con el *switch* angiogénico a través de la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por *Vascular Endothelial Growth Factor*), el cual induce la formación de nuevas ramificaciones capilares en la célula endotelial y es expresado bajo el estímulo de hipoxia o por señalización oncogénica, comandada por ejemplo por los oncogenes *c-myc* y RAS. Otra forma de inducir la angiogénesis es a través de las señales indirectas de la inflamación producida por las células del sistema inmune asociadas al tumor [9, 12, 13].

Aunque las características propuestas por Hanahan y Weinberg, fueron de gran utilidad para organizar y ayudar a la investigación sobre el cáncer por más de una década,

en base a los nuevos estudios hasta la fecha, el año 2017 Fouad y Aanei, repostularon los *hallmark* del cáncer basándose en las características propias de la célula para transformarse y progresar como célula tumoral maligna. Dentro de estas características se mantienen la invasión-metástasis y la modulación del sistema inmune, pero la angiogénesis se reformula como vascularización debido a que se incorporan nuevos procesos no-angiogénicos, y la evasión a la muerte cambia a una alterada respuesta a estrés, puesto que incorpora los mecanismos celulares con los cuales el tumor resiste las terapias anti-cáncer. La autosuficiencia en señales de crecimiento, la capacidad replicativa ilimitada y la evasión a estímulos que inhiben el crecimiento celular, se unifican como selectivas ventajas proliferativas. Finalmente postulan las características del microambiente tumoral favorable y reprogramación metabólica [13].

#### **1.1.4. Generalidades del metabolismo del cáncer**

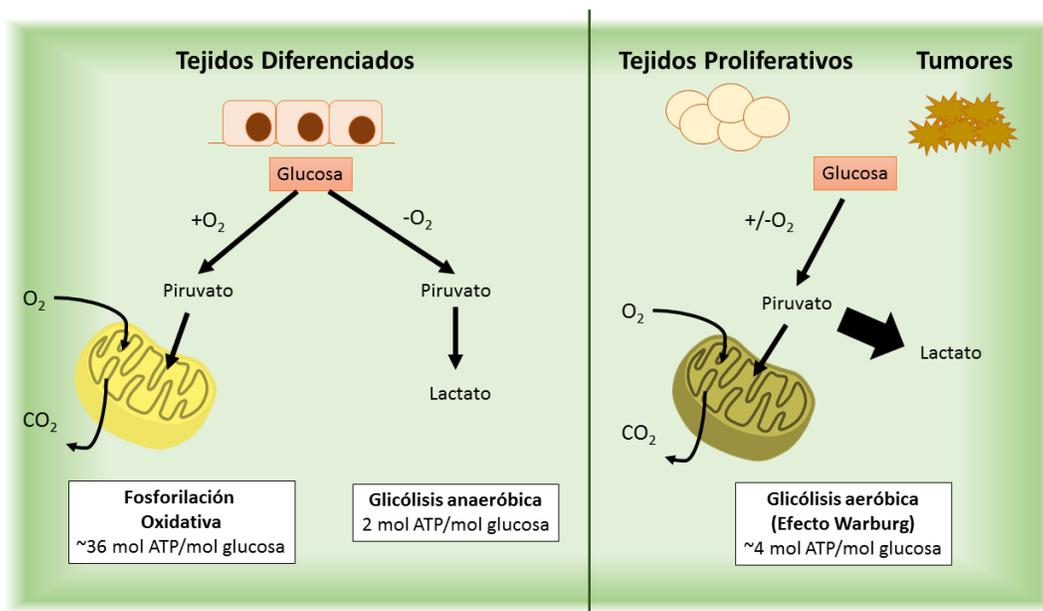
El metabolismo del cáncer es un enorme tópico de interés científico, puesto que, para la mantención de la viabilidad de una célula cancerosa, ésta debe reajustar la utilización de energía, optimizar la biosíntesis de componentes celulares y controlar el balance redox, redirigiendo sus rutas metabólicas para alterar la producción y consumo de metabolitos, con la finalidad de impulsar los procesos tumorales como proliferación, crecimiento, supervivencia, invasión y metástasis. A modo general, para obtener energía (ATP: adenosina trifosfato) una célula no transformada, principalmente utiliza como sustrato la glucosa, la cual bajo condiciones aeróbicas es metabolizada primero en el citosol hasta piruvato, a través de la glicólisis y posteriormente a dióxido de carbono en la mitocondria, a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), procesos que acoplados a la fosforilación oxidativa (OXPHOS) realizada por la mitocondria, generan aproximadamente 32 moles ATP/mol glucosa (figura 1). En condiciones anaeróbicas, la célula realiza glicolisis anaeróbica en la cual la glucosa es reducida en el citosol hasta lactato, generando 2 moles

ATP/mol glucosa (figura 1). Otto Warburg, estudiando el metabolismo energético del cáncer, observó por primera vez características anómalas en estos procesos [14], determinando que incluso en presencia de oxígeno, las células cancerosas obtenían energía llevando la glucosa hasta lactato, limitando la obtención de ATP principalmente a la glicólisis. Este proceso fue denominado "glicólisis aeróbica" (**Figura 1**). Esta glicólisis aeróbica incrementada en la célula cancerosa posteriormente tomó el nombre de efecto *Warburg* [12, 15]. Los tumores que presentan este efecto poseen una reducción en la OXPHOS y en el número de mitocondrias, por lo que también se les suele llamar **tumores glicolíticos**. Se ha visto que estos tumores son de crecimiento más rápido y son predominantes en cáncer de colon, de mama, de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), gástrico, de riñón y de hígado [16, 17]. Sin embargo, el efecto *Warburg* no se convirtió en una característica universal al cáncer, puesto que se observó que algunos tipos de cáncer como el de próstata, leucemias y carcinoma cervicouterino exhiben altos índices de OXPHOS [17]. A los anteriores se les conoce como **tumores oxidativos** [17]. Entonces, de acuerdo a lo anterior, aparecen los primeros postulados en el metabolismo del cáncer: la glicólisis elevada es de hecho una característica de varios tumores y se asocia con un crecimiento tumoral más rápido, mientras que una OXPHOS activa también es una característica importante para otros tumores [17]. Más aun, posteriormente se demostró que las células cancerosas exhiben diferentes fenotipos metabólicos de acuerdo con el microambiente en el que se encuentren. Esto quedó en evidencia cuando en el experimento de Griguer y col. (2005), mostraron que las mismas células de glioma, típicamente clasificadas como células glicolíticas y que presentaban el efecto *Warburg*, cambiaban su forma de obtener energía hacia OXPHOS, cuando se les retiraba la glucosa del medio [18]. Posteriormente, este mismo suceso fue observado en células de cáncer de mama (Hs578t) y hepáticas (HEP-G2) [17]. Por otro lado, las células del tumor pueden presentar diferentes fenotipos metabólicos, según el estado de la progresión tumoral en la que se encuentre el

cáncer. Esto es, en entorno tumoral hipóxico y acidificado (etapa previa a la angiogénesis), el tumor presenta un metabolismo mayoritariamente glicolítico, luego en un microambiente tumoral con nutrientes y oxígeno (posterior a la angiogénesis), el tumor se convierte en oxidativo [17]. Incluso para enfrentar la fase de invasión y metástasis, algunos tipos celulares requieren aumentar su número de mitocondrias activas para llevar a cabo este proceso [19], mientras que otros requieren aumentar la tasa de glicólisis aeróbica [17, 20]. Algunos autores describen que esta “plasticidad metabólica” según los requerimientos celulares, ocurre gracias a una **reprogramación metabólica celular**, la cual puede ocurrir por eventos oncogénicos no-metabólicos o por alteraciones en proteínas relacionadas al metabolismo celular [12, 15].

La reprogramación metabólica de una célula de cáncer incluye múltiples alteraciones que le confieren ventajas frente a la progresión tumoral. Incluyen desregulaciones en el metabolismo de la glucosa, desde la glicólisis hasta la utilización de la mitocondria, pero también alteraciones en el uso de otros sustratos metabólicos. A modo general existe una captación aumentada de nutrientes. En los últimos estudios ha tomado fuerza la importancia de la glutamina, esto evidenciado en la sobreexpresión de transportadores de glutamina a través del oncogén *c-myc* [21]. Sumado a lo anterior, otras evidencias muestran el uso amplificado de otros aminoácidos para el desarrollo del tumor, por ejemplo, el uso de la L-serina, un aminoácido no esencial, que le permite a la célula tumoral aumentar la producción de intermediarios glicolíticos o a través del ciclo de un carbono, producir nucleótidos y reducir el estrés oxidativo [22]. Para mayor complejidad en el tema, múltiples estudios describen subpoblaciones de células tumorales con distintas preferencias metabólicas coexistiendo en el mismo microambiente tumoral. Esto sustenta la hipótesis generalizada de la simbiosis intratumoral metabólica, donde una célula tumoral glicolítica, ubicada en la zona intratumoral hipóxica lejana a la vascularización, produce lactato extracelular, el cual

es captado y utilizado por la célula tumoral oxidativa, ubicada en la zona intratumoral normóxica cercana a la vascularización, como materia de energía para sustentar el crecimiento tumoral [23]. Un reciente estudio de análisis metabólico masivo revela que existe diversidad metabólica y genética en las células del tumor, según su cercanía a los vasos sanguíneos. Ellos muestran que las células más lejanas a los vasos sanguíneos expresan mayor cantidad de genes hipóxicos, sumado a que presentan menor actividad y biomasa mitocondrial. Por otro lado, las células perivasculares poseen un elevado metabolismo anabólico, principalmente dado por una elevada biosíntesis de proteínas y de nucleótidos, una elevada OXPHOS y biomasa mitocondrial, contradiciendo el paradigma de que las células en presencia de oxígeno realizan principalmente el efecto Warburg. Además, las células perivasculares resultaron ser las más proliferativas, las más invasivas, de mayor agresividad y más resistentes a quimioterapia y radioterapia [24]. En resumen, el escenario metabólico del tumor es complejo, diverso, heterogéneo y maleable en el transcurso del cáncer, aportando características de alta malignidad y ventajas únicas para el desarrollo tumoral.



**Figura 1: Representación de la fosforilación oxidativa, la glicólisis anaeróbica, y la glicólisis aeróbica.** En presencia de oxígeno, tejidos diferenciados metabolizan la glucosa en piruvato a través de la glicólisis, luego la oxidan completamente en la mitocondria y obtienen energía por el proceso de OXPHOS. Cuando el oxígeno es limitante, las células pueden redirigir la piruvato generado por glicolisis hacia la generación de lactato (glicólisis anaeróbica). En la glicólisis aeróbica, las células cancerosas tienden a convertir la mayoría de la glucosa a lactato independientemente de si el oxígeno está presente. Esta propiedad es compartida por los tejidos proliferativos, aunque las mitocondrias pueden seguir funcionales. Fuente: Elaboración propia modificado de Vander Heiden, Cantley [25].

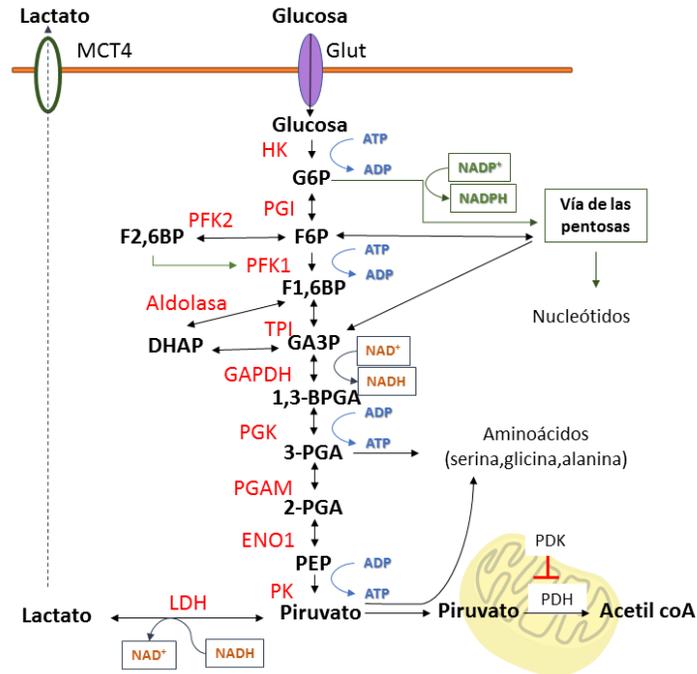
#### **1.1.5. La glicólisis y el cáncer.**

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo de la glucosa inicia con la glicólisis. Ésta consiste en 10 reacciones enzimáticas, llevadas a cabo por 10 enzimas específicas, por medio de las cuales 1 mol de glucosa es catabolizado a 2 moles de piruvato, 2 moles de NADH y genera una ganancia neta de energía de 2 moles de ATP. Las reacciones intermedias de la glicólisis generan productos metabólicos intermediarios que alimentan la vía de las pentosas, la cual a su vez produce NADPH, el cual participa de la síntesis de ácidos grasos y la prevención del estrés oxidativo, como también azúcares de 5 carbonos involucrados en la biosíntesis de nucleótidos. Adicionalmente, los intermediarios metabólicos de la glucosa pueden llevar a la biosíntesis de aminoácidos. Al término de esta ruta, el piruvato es importado a la mitocondria para abastecer el TCA, aunque en algunas células, como las células de cáncer, cada piruvato puede ser convertido en lactato y ser exportado fuera de la célula a través del transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) (**Figura 2**). El tumor posee una elevada captura y metabolismo de la glucosa en comparación con las células sanas. Lo anterior es tan relevante, que es utilizado como herramienta de utilidad clínica diagnóstica en cáncer, gracias a la técnica tomografía de emisión de positrones asociada al uso de  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa (PET-FDG), un análogo

radioactivo no hidrolizable de la glucosa. La FDG se administra al paciente para su distribución por el cuerpo, luego de lo cual el análogo es acumulado en zonas de elevado consumo de glucosa y esto se ve reflejado en la tomografía de emisión de positrones. Gracias a lo anterior, zonas anormales con elevado metabolismo de la glucosa pueden ser identificadas y propuestas como lugares de posibles brotes cancerosos (**Figura 3**). Múltiples adaptaciones moleculares promueven esta elevada captura de glucosa, como la expresión del transportador de glucosa GLUT1, que en tejidos normales se expresa en eritrocitos y células endoteliales de la barrera hematoencefálica, pero que se encuentra significativamente elevado en muchos cánceres [26, 27], asociada a un incremento del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) o una aberrante ruta PI3K/AKT[28], y correlacionada a un mal pronóstico de los pacientes [29]. Adicionalmente, para mantener este elevado uso de la glucosa, las células del tumor, específicamente las células hipóxicas del tumor, más lejanas a la vascularización tumoral, pueden presentar alteraciones a nivel de toda la ruta glicolítica [26]. En efecto, se ha descrito una sobreexpresión de las enzimas glicolíticas hexoquinasa (HK) [28], gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), enolasa 1 (ENO1), piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDHA) [30], inducidas por el oncogén c-MYC o por el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  [31]. De estas conviene destacar la última enzima de la glicólisis, la PK, la cual es fundamental en la regulación de la ruta. Esta enzima se expresa en 4 isoformas (L, R, M1 y M2), siendo la isoforma PKM2 la más abundante en células de cáncer y se diferencia de las otras isoformas en que puede cambiar de un estado de alta a baja actividad, dependiendo de las necesidades celulares. La baja actividad de PKM2 es de utilidad para el cáncer porque promueve la acumulación de intermediarios glicolíticos para biosíntesis y para la ruta de las pentosas [32]. A pesar de la sobreexpresión de múltiples proteínas de la ruta glicolítica, Tanner y colaboradores, mostraron que son 4 los puntos críticos que regulan la glicólisis. Los 3 principales que elevan el flujo glicolítico son: el importe de la glucosa (GLUT1,3 y 5), la producción de

fructosa 1,6-BP por la enzima fosfofructoquinasa (isoformas PFKP y PFK2) y el transporte de lactato (MCT4). El cuarto punto de control es la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa (HK2), el cual tiene un efecto dual. Su inicial expresión (menor a 5 veces), acelera el flujo glicolítico, pero luego su aumento de expresión (mayor a 5 veces), suprime la glicólisis, debido a que el exceso de actividad de la HK2 consume el ATP y no permite la progresión de la ruta [33]. Particularmente, la enzima GAPDH, posee cisteínas sensibles a oxidación en su sitio catalítico, por lo que, en un contexto de estrés oxidativo, también disminuye su actividad dirigiendo el flujo de carbohidratos hacia la ruta de las pentosas [34, 35]. De manera adicional, la condición de hipoxia o la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ , activan a enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1) y también permiten el cambio en la localización de la enzima fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1) hacia la mitocondria. Ambas quinastas fosforilan inhibitoriamente al complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), regulando así el *switch* glicolítico, al impedir el ingreso de piruvato al ciclo de Krebs y favoreciendo la producción de lactato [36]. La aumentada producción de lactato favorece la tumorigénesis promoviendo procesos no metabólicos. El lactato en células tumorales oxidativas aumenta la angiogénesis y el crecimiento tumoral [37], además la excesiva producción de ácido láctico extracelular provoca la acidificación del microambiente tumoral, lo que promueve la invasión celular [38], inhibe las respuestas inmunológicas anti-cáncer [39] y favorece la vascularización tumoral [37].

En resumen, mediante el uso y regulación de la glicólisis, la célula de cáncer puede aumentar su capacidad de captar y metabolizar la glucosa, sustentar la producción de energía y de intermediarios metabólicos de utilidad para biosíntesis de macromoléculas, mantener balanceado el estrés oxidativo y promover el desarrollo de procesos tumorigénicos no asociados al metabolismo.



**Figura 2: Esquema de la ruta de la glicólisis.** La glucosa es captada por el transportador de glucosa (GLUT) e inmediatamente fosforilada por la hexoquinasa (HK) y convertida a glucosa-6-fosfato (G6P). Luego la fosfoglucosaisomerasa (PGI) convierte la G6P en fructosa-6-fosfato (F6P), sustrato que fosforilado por la fosfofructoquinasa 2 (PFK2) a fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP) y redirigido a la glicólisis por la fosfofructoquinasa 1 (PFK1), a través de la conversión a fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP). La PFK1 también puede convertir directamente la F6P a F1,6BP. Posteriormente, la aldolasa cataliza la conversión de F1,6BP a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P). El DHAP es isomerizado a G3P por la triosa isomerasa fosfato (TPI). Cada G3P generado es transformado a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPGA) por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual a su vez es catabolizado a 3-fosfoglicerato (3-PGA) por la fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1). El 3-PGA es convertido en 2 fosfoglicerato (2-PGA) por la enzima fosfoglicerato mutasa (PGAM), el cual es convertido a fosfoenolpiruvato (PEP) por la enolasa 1 (ENO1). En la última reacción de la glicólisis la piruvato quinasa (PK) convierte el PEP en piruvato. El piruvato generado puede ser catabolizado por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) a acetilcoA, el cual entra al ciclo de Krebs. Cuando el complejo PDH es inhibido por la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) se favorece la reacción de piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), el cual es transportado fuera de la célula por el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4). Fuente: Elaboración propia modificada de Munoz-Pinedo, El Mjiyad [32].



**Figura 3: Tomografía por emisión de positrones utilizada para la detección de cáncer de pulmón.** La masa tumoral asociada al cáncer de pulmón es indicada por la flecha. Fuente: Imagen tomada de Lee, Park [40].

#### 1.1.6. Generalidades de la mitocondria.

La mitocondria es un organelo formado por dos membranas, una membrana externa (OMM, del inglés *outer mitochondrial membrane*) y una membrana interna (IMM, del inglés *inner mitochondrial membrane*) que se pliega hacia el interior de la matriz mitocondrial dando origen a las crestas mitocondriales. El espacio entre ambas membranas es conocido como espacio intermembrana. La morfología y número de las crestas mitocondriales reflejan la respuesta mitocondrial al estado energético celular. Mayor número de plegamientos están presentes en mitocondrias más activas, como las de las células musculares y neuronas [41]. Este organelo posee su propio material genético (mtADN), de estructura circular y de aproximadamente 16.000 nucleótidos en mamíferos, donde codifica para 37 genes. Trece de estos genes codifican para proteínas que forman parte de los complejos de la cadena transportadora de electrones, 2 genes codifican para los ARN ribosomales de la mitocondria (rARN-12S y rARN-16S) y el resto para ARNs de transferencia mitocondriales (tARN) [42]. Estos genes actúan en asociación a

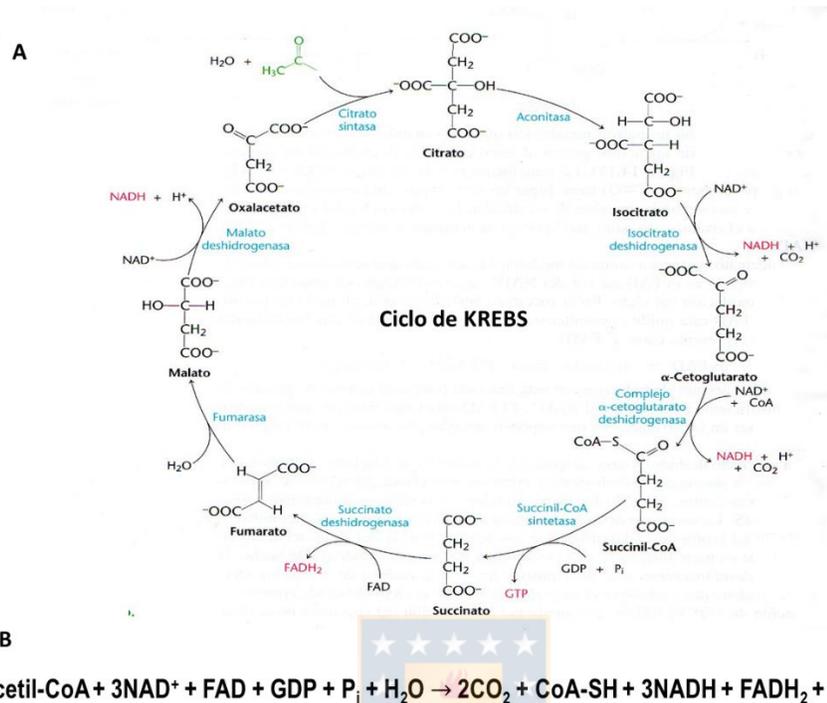
aproximadamente mil genes relacionados con la mitocondria codificados a nivel nuclear, necesarios para permitir el completo funcionamiento de este organelo. Generalmente, las proteínas de codificación nuclear pueden ser importadas en la mitocondria gracias a la presencia de secuencias de importe mitocondrial en su extremo N-terminal, aunque también se pueden presentar en la sección interna de la proteína. Cuando la mitocondria presenta defectos en su mtADN o está expuesta a un excesivo estrés oxidativo es degradada a través del proceso llamado mitofagia. Por otro lado, el proceso de biogénesis mitocondrial, en el cual participa la expresión de genes tanto mitocondriales como nucleares, permite el crecimiento y división de mitocondrias preexistentes. Además, las mitocondrias son dinámicas, no solo pueden cambiar su distribución en la célula, sino que también su morfología. Individualmente pueden alterar su forma y tamaño, por procesos conocidos como fusión y fisión mitocondrial. La fisión mitocondrial permite la división de mitocondrias, se observa debido al aumento de mitocondrias de morfología pequeña, fragmentada y circular. Este proceso está involucrado tanto en la proliferación mitocondrial como en la eliminación de mitocondrias defectuosas, y depende de la función de la GTPasa DRP1 (del inglés, *dynamin-1-like-protein*), la cual es translocada del citosol a la OMM, y permite la fisión gracias a la interacción con las proteínas Fis1 (del inglés, *Mitochondrial fission 1 protein*) y Mff (del inglés, *Mitochondrial fission factor*). Por otro lado, la **fusión mitocondrial** corresponde a la unión de dos unidades estructurales en una sola y se observa debido a la disminución del número de mitocondrias acompañado de un aumento de estructuras mitocondriales elongadas. En este proceso participan en coordinación las GTPasas OPA1 (del inglés, *optic atrophy type 1*) y mitofusinas (Mfn1 y Mfn2).

La principal función de la mitocondria es suministrar la mayor parte del ATP a la célula, a través del metabolismo oxidativo de sustratos derivados de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. Uno de los intermediarios claves en el metabolismo mitocondrial es la acetil

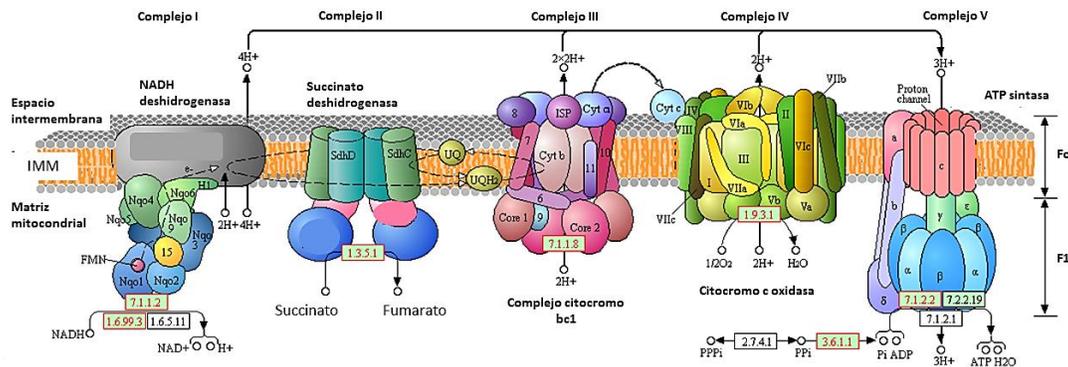
coenzima A (Acetil-CoA), la cual se forma cuando una molécula de coenzima A (CoA-SH) acepta un grupo acetilo. Cuando los niveles de glucosa son altos, esta es generada debido a la incorporación del piruvato en la mitocondria, a través del transportador de piruvato MPC, y luego convertido a acetil-CoA, gracias al complejo PDH. La reacción de la PDH termina con una descarboxilación del piruvato y la generación de 1 mol de NADH por cada mol de piruvato. El acetil-coA, también puede ser generado desde la beta oxidación de ácidos grasos o por la metabolización de algunos aminoácidos. La generación de acetil-coA es una reacción imprescindible para que la vía aerobia continúe hacia el ciclo de Krebs, en el cual, como primera reacción, el acetil-coA es condensado junto con una molécula de oxalacetato a una molécula de citrato por la enzima citrato sintasa. Los átomos de dicha molécula continúan su oxidación hasta  $\text{CO}_2$ , de acuerdo con la serie de reacciones mostradas en la **figura 4**. Por cada molécula de acetil-CoA, se obtiene la energía de 1 GTP, más 3 moléculas de NADH, 1 molécula de  $\text{FADH}_2$  y otras mostradas en la reacción resumen de la **figura 4**. Luego, cada NADH y  $\text{FADH}_2$  es utilizados por la cadena transportadora de electrones para generar la fuerza protón motriz del espacio intermembrana. La cadena transportadora de electrones está formada por una serie de complejos enzimáticos que permiten aumentar el potencial de membrana mitocondrial gracias a una serie de ciclos de reacciones de oxidación y reducción. El complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH-ubiquinona oxidoreductasa) está formada por 45 subunidades, este capta dos electrones desde 1 NADH y los transfiere a la proteína ubiquinona (Q), reduciéndola y transformándola en ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ), mientras simultáneamente transloca 4 protones a través de la IMM (**Figura 5**). El complejo II (succinate:ubiquinone oxidoreductase), consiste solo de 4 péptidos y no es una bomba de protones. La porción periférica del complejo, también conocida como complejo succinato deshidrogenasa (SDH) está formado por una flavoproteína (SdhA), que tiene unida covalentemente el cofactor FAD y posee el sitio de unión al sustrato succinato, y una proteína asociada a hierro (SdhB), las cuales en conjunto

funcionan como la enzima succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, realizando la formación de fumarato y 1 FADH<sub>2</sub>, a partir de 1 succinato. Los electrones de la oxidación del fumarato se canalizan a través de la reducción del FAD a FADH<sub>2</sub>, seguido de su inmediata oxidación *in situ* a través del paso de los 2 hidrógenos de FADH<sub>2</sub> a la ubiquinona. Lo anterior es posible, gracias a la parte hidrofóbica del complejo II (**Figura 5**). Luego el ubiquinol difunde a través de la membrana mitocondrial hasta el siguiente complejo. El complejo III (complejo citocromo bc<sub>1</sub>), consta de 11 subunidades, dentro de los cuales destacan dos subunidades llamadas citocromos (proteína con un grupo prostético hemo) y la proteína hierro-azufre de Rieske. El complejo III oxida el QH<sub>2</sub> movilizándolo 4 protones hacia el espacio intermembrana y transfiere los electrones al citocromo c, el cual difunde por la membrana mitocondrial hasta el complejo IV (**Figura 5**). El complejo IV (citocromo c oxidasa), formada por 13 subunidades, reoxida el citocromo c, transfiere 2 protones al espacio intermembrana y los electrones hacia el oxígeno (**Figura 5**). La reducción parcial de oxígeno puede producir el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), del cual a su vez pueden derivar el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>), dando origen a la aparición del ROS. El flujo de protones, derivados del funcionamiento de los complejos I al IV, crea un potencial de membrana, dado por un gradiente electroquímico y de pH, que permiten el funcionamiento del complejo V (ATP sintasa). La ATP sintasa utiliza la energía proton-motriz generada por el paso de iones hidrógenos hacia la matriz mitocondrial para realizar la reacción de síntesis de ATP, a partir de ADP y pirofosfato inorgánico, proceso conocido como fosforilación oxidativa (**Figura 5**) [41]. De manera complementaria, en la mitocondria también se realizan procesos de biosíntesis de macromoléculas, modulación del estado celular de oxidación-reducción (redox), generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), control de los niveles de calcio citosólico (Ca<sup>2+</sup>) y el inicio de la apoptosis, es decir,

la mitocondria no solo participa de la generación de energía celular, sino también de muchos otros procesos celulares [41].



**Figura 4: Esquema del ciclo de KREBS. (A).** Esquema de las reacciones químicas del ciclo de Krebs, en azul se muestran las enzimas [43]. **(B).** Reacción resumen del ciclo de Krebs. Fuente: Elaboración propia modificado de Stryer, Berg [43]



**Figura 5: Esquema de la cadena transportadora de electrones.** Fuente: Modificado de “KEGG Pathway Maps”.

### 1.1.7. La mitocondria y el cáncer.

Anteriormente mencionamos que hay células de cáncer que disminuyen su actividad mitocondrial, para promover su fenotipo glicolítico y de esta manera promover la progresión tumoral, sin embargo, también establecimos la existencia de células tumorales de fenotipo oxidativo que aportan ventajas fundamentales para el desarrollo del tumor [24]. Complementando lo anterior, el rol de la función mitocondrial en cáncer ha sido expuesta en múltiples estudios. Algunas evidencias indican que mutaciones en genes mitocondriales son comunes en cáncer y que los genes para OXPHOS codificados en el mtADN son esenciales para la supervivencia de las células cancerosas. Adicionalmente, experimentos donde se ha realizado la eliminación de las mitocondrias a células de cáncer, muestran que estas células disminuyen su capacidad proliferativa y reducen la formación de tumores, sugiriendo que la mitocondria juega un rol en la tumorigénesis [44, 45]. Por otro lado, existen antecedentes de que el switch oxidativo es necesario para la invasión celular, para el aumento de número de células de cáncer en circulación en el torrente sanguíneo [19] y a su vez para la metástasis [19, 46]. Para promover el fenotipo oxidativo, la célula puede aumentar su número de mitocondrias a través del proceso de biogénesis mitocondrial. Múltiples estudios han demostrado que el aumento de la biogénesis mitocondrial promueve la tumorigénesis, comandado por la sobreexpresión de MYC o la pérdida de p53 [47]. Algunos ejemplos de proteínas involucradas en la regulación de la biogénesis mitocondrial y con función relacionada a cáncer son el factor de transcripción mitocondrial (mtTFA), la proteína p32 altamente conservada que se localiza principalmente en la matriz mitocondrial y los coactivadores transcripcionales PGC-1 $\alpha$  y PGC-1 $\beta$ . El aumento de mtTFA se asocia con la progresión del cáncer [48] mientras que p32, sobreexpresada en tumores de mama y ovario, se asocia con una alta malignidad, promueve la fosforilación oxidativa y permite el switch desde glicólisis hacia OXPHOS [49]. La relevancia de p32 para la tumorigénesis, incluso lo propone como un blanco terapéutico validado en glioma [50]. Por otro lado, la

sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  junto con PGC-1 $\beta$ , en cáncer de colon y algunos subtipos de melanoma, permiten a la célula cancerosa balancear la actividad mitocondrial y la capacidad de detoxificar ante el aumento de estrés oxidativo, favoreciendo la supervivencia del tumor [51, 52], por lo que además, su expresión puede definir la capacidad de respuesta a tratamientos quimioterapéuticos dependientes de ROS [52]. La mitofagia también se encuentra desregulada en múltiples cáncer [53]. Para mantener una elevada OXPHOS, la célula de cáncer también mantiene una elevada mitofagia, la cual permite el correcto *clearance* de las mitocondrias más dañadas y de esta manera no generar una excesiva acumulación de ROS [54]. Aunque el rol de esta desregulación dependerá del contexto de la célula de cáncer, por ejemplo, el receptor pro-mitofágico BNIP3 tiene funciones supresoras de tumores en el cáncer de mama, mientras que, en melanoma, en carcinoma de células renales y en cáncer pancreático tiene un papel promotor tumoral [53]. La coordinación entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, permiten generar más mitocondrias funcionales y favorables para el desarrollo del cáncer.

La revisión de Porporato y colaboradores el año 2018, sugiere que las mitocondrias pueden contribuir a la transformación maligna por la generación de especies mitocondriales reactivas de oxígeno (ROS), las cuales favorecen la acumulación de defectos en el ADN y la activación de vías de señalización potencialmente oncogénicas, no obstante estas especies deben mantenerse balanceadas debido a que su exceso puede llevar a la célula tumoral a la apoptosis [55, 56]. La importancia de lo anterior destaca en el contexto del oncogén K-RAS. El metabolismo mitocondrial y la generación de ROS mitocondrial son necesarios para que el oncogén K-RAS se pueda anclar a la membrana citoplasmática y cumpla sus funciones tumorigénicas, tanto así que la disfunción de las mitocondrias en células de cáncer de pulmón dependientes de K-RAS disminuye el crecimiento y proliferación tumoral *in vivo* [57]. Otro factor que puede contribuir a la transformación

maligna es la acumulación anormal de metabolitos mitocondriales específicos producto de mutaciones en las enzimas metabólicas [58]. Un ejemplo de esto es la inhibición de la SDH. Las subunidades de este complejo se encuentran mutadas en algunos cánceres [59], aunque la mayor relevancia clínica la tiene en paragangliomas y carcinoma renal, en los cuales existe una pérdida de función de este complejo [59, 60]. La carencia funcional del complejo SDH, lleva a una acumulación de succinato y bajos niveles de fumarato, lo cual se ha asociado a un incremento del nivel de ROS mitocondrial [61] y la promoción de la angiogénesis [62]. De manera contradictoria a lo anterior, el aumento de fumarato también es algo que se observa en otros tejidos cancerosos, debido a que la enzima fumarasa se encuentra inactiva o suprimida. El fumarato acumulado puede modificar covalentemente las cisteínas de las proteínas, por un proceso no catalizado denominado succinación, causando alteraciones en múltiples rutas de señalización celular [63]. La clásica succinación ha sido observada en el regulador negativo (KEAP1; del inglés *Kelch-like ECH-associated protein 1*) del factor de transcripción NRF2 (del inglés, *factor erythroid-derived 2-like 2*), dando como resultado final la activación de NRF2, la expresión de proteínas con función antioxidante y un aumento de la proliferación celular [64]. Asimismo, la función mitocondrial permite el aumento dramático en la producción de lípidos saturados, ventajoso para la proliferación de células tumorales, permitiendo el desarrollo de la elevada proliferación del cáncer y de la generación de membranas más resistentes al daño oxidativo [65]. Además, el metabolismo de la glucosa puede ser alternado por el metabolismo de la glutamina u otros aminoácidos, la cual puede ser incorporada al ciclo de Krebs para producción de energía o para síntesis de biomoléculas. En resumen, la función y el metabolismo mitocondrial en cáncer tiene muchas aristas y para lograr su comprensión los contextos genético y del microambiente tumoral deben ser tomados en cuenta.

## **1.2. Estado del arte y antecedentes de este trabajo.**

### **1.2.1. NUAK1 y su asociación con cáncer**

Estudios de correlación entre la expresión de genes y la prognosis del cáncer, muestran que existe una quinasa llamada NUAK1, que se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer y cuya expresión se relaciona con un mal pronóstico clínico del paciente. Entre los cánceres donde se ha encontrado elevada expresión de NUAK1 se encuentra el de hepatocarcinoma [66], cáncer de colon [67], cáncer de pulmón NSCLC (del inglés, *Non-small-cell lung carcinoma*) [68], melanoma [69], cáncer pancreático [70], gliomas, cáncer gástrico y cáncer de ovario [71-73]. En particular, aunque a nivel fisiológico NUAK1 se encuentra expresado en corazón y cerebro, y en menor medida en músculo esquelético, riñón, ovario, placenta, pulmón e hígado [39, 74], la expresión de NUAK1 no se observa en el tejido de un colon sano, pero sí se encuentra presente en lesiones de cáncer colorrectal [67], donde la elevada cantidad de NUAK1 se correlaciona con los peores escenarios clínicos [56]. Sumado a lo anterior, observaciones histológicas, muestran que la expresión de NUAK1 es mayor en los estadios clínicos más avanzados (muestras de clasificación invasiva y de origen metastásicos), existiendo una correlación altamente positiva entre la expresión de NUAK1 y la progresión clínica del cáncer [56, 73]. Debido a lo anterior, se ha propuesto que NUAK1 está involucrado en carcinogénesis y progresión tumoral.

### **1.2.2. Estructura y localización de NUAK1.**

NUAK1 es una proteína con actividad quinasa de 661 aminoácidos en humanos (~74 kDa), 658 aminoácidos en ratón y 660 aminoácidos en rata, perteneciente a la familia de quinasas relacionadas a AMPK (AMPK-R, del inglés: *AMPK-related kinases*). Posee un dominio catalítico ubicado en el extremo N-terminal desde el residuo 55 al 306, donde al

igual que todas las proteínas de la familia de AMPK-R, NUA1 posee un sitio T-loop importante para su regulación catalítica [75]. NUA1, para poder realizar su actividad quinasa, utiliza su lisina-84 para la unión de ATP [75]. Además, posee tres motivos glicina-isoleucina-leucina-lisina (GILK): G399-K402, G466-K469 y G523-K526, que facilitan el reclutamiento e interacción con su proteína blanco PP1- $\beta$  (del inglés, *protein fosfatasa 1 beta*) [76]. A nivel subcelular, NUA1 posee localización nuclear y citosólica [77], aunque su distribución en estos compartimentos varía dependiendo de las distintas líneas celulares y, además, su localización citosólica puede ser inducida por estrés oxidativo [78]. Adicionalmente, en muestras histológicas de cáncer gástrico y glioma, se observa que en tejidos de grado más avanzado NUA1 se acumula principalmente en el citoplasma celular [71, 73]. En contraste a lo anterior, observación de NUA1 en NSCLC lo sitúan principalmente en localización nuclear [68]. Por otro lado, en cuanto a su distribución en desarrollo, en estadios embrionarios tempranos, se expresa en la parte apical del neuroectodermo del extremo cefálico y en estadios embrionarios más tardíos, su expresión se localiza en algunas vesículas cefálicas (diencefalo y mesencefalo), faringe y dermis ventral [79]. En el modelo de ratón Knock-out para NUA1 no se aprecian alteraciones morfológicas en el sistema nervioso, sin embargo los embriones no son viables, puesto que sufren de onfalocele, un defecto en el cierre de la pared abdominal [79].

### **1.2.3. Regulación de NUA1.**

En cuanto a la regulación de su expresión génica, se conoce la participación de dos miembros de la familia de proteínas *Large-MAF*, *c-MAF/MAFB*, los cuales se unen en el promotor de NUA1 en 2 sitios de reconocimiento del elemento MAF (MARE) y aumentan la transcripción de NUA1 [80]. NUA1 también es regulado por el factor transcripción NRF2, putativamente en un sitio de respuesta a estrés oxidativo (ARE) [56]. La localización intracelular de NUA1 es regulada por un transporte nuclear activo dependiente de la

importina-7 y la importina-9, las cuales reconocen la secuencia de localización nuclear bipartita (NLS) ubicada en la región N-terminal de NUAK1 (NLS: K43-R44-X25-K70-R71) [78]. NUAK1 también puede ser regulada por modificaciones post-traduccionales. NUAK1 posee una baja actividad basal, pero distintos estímulos pueden aumentar su actividad a través de fosforilaciones por diferentes quinasas. LKB1 fosforila el residuo Treonina-211 del T-loop y este eje LKB1/NUAK1 es fundamental para la regulación del ciclo celular [81], la adhesión celular [76] y el *branching* neuronal en el desarrollo de axones corticales [82]. Por otro lado, se ha descrito que en presencia del factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1, frente a la activación del receptor TGF-R1 o en inanición de glucosa, NUAK1 requiere de la fosforilación por la quinasa AKT en la Serina-600 [83, 84]. Cabe destacar que NUAK1 es el único miembro de la familia AMPK-R, que puede ser fosforilada por AKT [83, 84]. Además, se ha encontrado que frente al factor de crecimiento IGF-1, es activado conjuntamente por NRD2 en la Thr211 y por AKT en la Ser600 [85]. La contracción muscular y AICAR (en inglés, *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*), un análogo de AMP capaz de estimular la actividad de AMPK, también provocan un aumento de fosforilación en el t-loop de NUAK1 probablemente a través de AKT, sin embargo, estos no afectan su actividad [39]. La insulina también es capaz de inducir la fosforilación en NUAK1 por AKT [39]. Estudios más recientes muestran que NUAK1 responde a estrés oxidativo, donde la actividad quinasa de NUAK1 aumenta, debido al aumento de ROS, producto de la oxidación de sus cisteínas y fosforilación en su residuo Thr211 [56]. NUAK1 es poli-ubiquitinado en los residuos Lisina-29 y Lisina-33, lo que curiosamente no cambian la estabilidad de la NUAK1, sino más bien impiden su activación mediada por LKB1. Estas cadenas de poli-ubiquitina son retiradas por la enzima de desubiquitinización USP9X, la cual se puede unir para cumplir su función gracias al residuo Triptofano-305 de NUAK1 [5].

#### **1.2.4. Funciones celulares y moleculares de NUA1.**

Existe evidencia de la participación de NUA1 en múltiples procesos celulares tumorigénicos. A continuación, se dará una descripción detallada de como NUA1 realiza cada una de estas funciones.

##### **1.2.4.1. Migración e invasión celular.**

La migración y la invasión son procesos fundamentales para que la célula de cáncer pueda distribuirse al tejido adyacente y realizar los procesos metastásicos. Estudios en células de cáncer mostraron que la disminución funcional de NUA1 disminuye la capacidad migratoria de las células, sugiriendo que NUA1 participa de este proceso [68, 86, 87]. NUA1, activado por LKB1, promueve el desprendimiento de las células (*cell detachment*), a través de la unión a la fosfatasa PP1- $\beta$  y la posterior fosforilación de MYPT1, produciendo una cascada de señalización que lleva a la activación de la contracción de las cadenas de miosina II, permitiendo que la célula puede despegarse de la superficie o matriz extracelular a la cual se encuentra adherida, proceso clave en el inicio, sostenimiento y dinámica de la migración celular [76]. Por otra parte, Suzuki y col. encontraron en células de cáncer de colon y páncreas que NUA1 es necesario para la invasión tumoral, dependiente de la fosforilación en su Ser600 por AKT [83]. Lo mismo fue observado en gliomas [71], cáncer gástrico y cáncer de mama [73, 88]. El mecanismo por el cual NUA1 promueve la invasión no está del todo claro, pero se sabe que involucra el aumento de actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, las cuales son claves para la degradación de la matriz extracelular en el proceso de invasión [83].

##### **1.2.4.2. Participación en la supervivencia celular.**

NUA1 permite la supervivencia celular participando de la regulación de los procesos de arresto celular, senescencia e inhibición de la apoptosis celular. NUA1 regula

el arresto del ciclo celular en G1/S fosforilando de manera dependiente de la señalización de AKT, a la proteína blanco ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*: una serina/treonina quinasa que activa p53), o bien, de manera dependiente de LKB1, al factor de transcripción p53 (Ser15 y Ser392) en el núcleo, sobre todo bajo condiciones de inanición de glucosa [77, 89]. Es decir, especialmente en respuesta a estrés metabólico, NUAK1 activado, puede inhibir la proliferación celular, actuando como supresor de tumor a través de la activación y/o interacción con p53. Curiosamente, en células normales la vía LKB1/NUAK1 puede inducir senescencia, llevando a un arresto del ciclo celular en la fase tardía S/G2-M, por un mecanismo independiente de p53, producto de la desestabilización de la proteína LATS1, quinasa reguladora de la localización del aparato mitótico, generada por la fosforilación directa sobre su Ser464A. Como resultado de lo anterior, las células con sobreexpresión de NUAK1 desarrollan inestabilidad genómica, observada por el desarrollo de aneuploidía y polinucleación, procesos clásicamente pro-cancerígenos [81]. Las diferencias experimentales entre cada trabajo dificultan la comparación de resultados, sin embargo, proponen a NUAK1 como un mediador específico del arresto del ciclo celular para contextos celulares particulares.

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte de la célula y tiene lugar cuando ésta acumula disfunciones internas o por efecto de inductores exógenos. La inhibición de cualquiera de estas rutas tiene como consecuencia un aumento en la viabilidad celular. NUAK1 puede inhibir la apoptosis regulando directamente por fosforilación la caspasa 6 en la Ser257 impidiendo su activación, aumentando la resistencia a la muerte por el sistema Fas/FasL [90]. Múltiples estudios sugieren que NUAK1 está involucrado en la supervivencia celular al estrés metabólico, esto ha sido demostrado en varias líneas celulares de cáncer [84, 89], cultivadas en inanición de glucosa, donde las células que poseen mayor expresión

de NUAK1 resisten por más tiempo el estrés. Suzuki y col. demostraron que cuando distintas líneas celulares de cáncer son cultivadas bajo inanición de glucosa, disminuyen su viabilidad y que cuando NUAK1 induce la resistencia a este estrés, lo hace impidiendo la activación de la caspasa 8 [91]. Por otro lado, la disminución de NUAK1 puede disminuir drásticamente la tolerancia a la inanición de glucosa inducida por hipoxia, este efecto es reversible, independiente y complementario al rol de AMPK [84]. Por lo que se refiere a estrés oxidativo, NUAK1 juega un rol protector de células tumorales, donde es fundamental para la resistencia a la muerte por este estrés. Este efecto es mucho mayor en células con el oncogen Myc sobreexpresado, en las cuales existe una mayor sensibilidad a la muerte por ROS, cuando existe una disminución de los niveles de NUAK1. El mecanismo del proceso anterior no se encuentra del todo dilucidado, pero sí se sabe que NUAK1 promovería la supervivencia celular, producto del consecuente aumento de la translocación nuclear del factor de transcripción antioxidante NFR2, a través de la inhibición de GSK3 $\beta$  [56].

#### **1.2.4.3. Funciones metabólicas.**

La participación de NUAK1 en la adaptación metabólica tumoral necesaria para la tumorigénesis, invasión y metástasis, no ha sido mayormente estudiada. Los primeros antecedentes provienen del hecho que NUAK1 es preferentemente expresado en tejidos altamente oxidativos, tal como el corazón, cerebro y en el músculo soleo, en este último predominan las fibras de tipo I y IIA, las cuales resultan ser las fibras con mayor densidad de mitocondrias y capacidad oxidativa [74]. NUAK1, juega un rol crítico en el almacenamiento de glucosa en el músculo oxidativo, puesto que suprime la incorporación de glucosa, lo cual se sugiere podría ser a través de la regulación negativa de la vía de la insulina y del almacenamiento de glicógeno [74]. Recientemente se ha encontrado a NUAK1 altamente relacionado con promover la transformación celular mediada por el

oncogén Myc. Como se menciona anteriormente, Myc contribuye al efecto *Warburg*, aumentando la glicólisis y la producción de lactato, pero también aumenta el flujo oxidativo puesto que su sobreexpresión, incrementa el número de mitocondrias y la respiración celular. Otra de sus principales funciones es que en condiciones de baja glucosa y oxígeno induce el metabolismo de glutamina (glutaminólisis) [92-94]. Liu y col. proponen que NUA1, en un contexto independiente de p53, es necesario para que el oncogen *myc* pueda mantener una correcta homeostasis metabólica, ya que células con menores niveles proteicos de NUA1 presentaron menores niveles de ATP celular, una disminución de la OXPHOS dada por una disminución en los niveles de proteínas mitocondriales (sin afectar el número total de mitocondrias) y una leve disminución en los intermediarios glicolíticos [95].

#### **1.2.4.4. Capacidad Tumorigénica.**

Ensayos de tumorigenicidad realizados en ratones *nude* revelaron que células con sobreexpresión de NUA1 producen en el ratón tumores de mayor tamaño, con una gran diferencia alrededor de 7 veces mayor, con respecto a los tumores generados con células con un nivel normal de NUA1. Además, estos tumores poseen alta invasividad en los tejidos adyacentes y alta capacidad metastásica a otros órganos.[83, 96], poseen un centro mucho menos necrótico, pero no presentan cambios en la densidad de vasos sanguíneos [83]. De forma semejante, en cáncer gástrico y de mama, la expresión de NUA1 está asociada a un rápido crecimiento tumoral [73, 88]. Complementario a lo anterior, NUA1 promueve la transición epitelio mesenquimal [97]. Por último, gracias a la actividad de NUA1, el tumor puede disminuir el estrés oxidativo citosólico, promoviendo la supervivencia y crecimiento tumoral [56]. Por todos estos procesos mencionados anteriormente, es que se considera a NUA1 una proteína altamente pro-cancerosa [83].

### 1.3. Problemática actual y formulación del proyecto.

El cáncer es una de las principales patologías que afecta a la población mundial, es una enfermedad compleja y diversa, que aún no posee cura ni tratamiento efectivo para toda la población que la padece. El estudio de las células cancerosas tanto a nivel molecular, celular o fisiológico, ya sea de manera directa o indirecta, siempre busca mejorar el manejo de los distintos aspectos clínicos de esta enfermedad, entregando antecedentes que permitan predecir la prognosis de pacientes o la sensibilidad a distintos tipos de terapia, y de esta manera mejorar las estrategias diagnósticas y terapéuticas de la enfermedad. Por lo anterior, comprender los procesos celulares y/o moleculares relativos a NUAK1 es de gran interés científico, puesto que como ya se mencionó, esta es una proteína que se encuentra correlacionada a tumores de alta malignidad y es una proteína que participa no de uno, sino de varios procesos tumorigénicos. Considerando que una célula cancerosa, modifica su metabolismo tanto para mantener la viabilidad celular ante las condiciones adversas de falta de nutrientes, producto de la elevada capacidad proliferativa y de la baja vascularización de la zona, como para fomentar el máximo consumo de sustratos disponibles para la realización de procesos energéticamente costosos como la migración e invasión. Por lo anterior, la correcta y fina regulación de los procesos metabólicos es fundamental para la progresión tumoral. Como especificamos anteriormente, existe relación entre NUAK1 y el metabolismo celular. En primer lugar, de manera fisiológica normal NUAK1 se encuentra **preferentemente en tejidos altamente oxidativos**, por otro lado, en cáncer, NUAK1 **promueve la viabilidad celular ante la inanición de nutrientes** y, en tercer lugar, en un contexto de *c-myc* elevado, **participa de la mantención de la bioenergética celular**, manteniendo los niveles de ATP celular y el metabolismo oxidativo. Además, como ya hemos mencionado, **NUAK1 se puede localizar en el citosol o en el núcleo de una célula**, dependiendo del tipo cáncer o del estadio de la progresión del cáncer, sugiriendo que NUAK1 podría tener funciones específicas asociadas a su

localización celular. En concordancia con lo anterior, los antecedentes muestran que NUA1 fosforila a sus proteínas blanco en una localización celular asociada a la función que está regulando, es decir, para regular el arresto del ciclo celular, NUA1 fosforila y activa a p53 en el núcleo, mientras que, para promover la migración celular, permitiendo la fosforilación de las fibras de actina, NUA1 regula su blanco MYPT1 en su localización citoplasmática. Sin embargo, **no existen estudios que asocien la distribución celular de NUA1 a su participación en el metabolismo celular**. De acuerdo con esto, nos planteamos la siguiente pregunta: *“¿NUA1 afecta el nivel de ATP y a rutas metabólicas en células de cáncer y esto, es dependiente de su localización subcelular?”*

Para dar respuesta a esta pregunta, guiamos nuestra investigación por 3 objetivos específicos. Brevemente, realizamos mediciones de ATP, microscopía de la morfología mitocondrial, evaluación de la respiración mitocondrial, evaluación del potencial de membrana mitocondrial y evaluación de metabolitos de la glicólisis. El desarrollo del **primer objetivo específico** nos permitió determinar el efecto de NUA1, asociado a una localización celular particular, sobre el estado bioenergético celular. Complementario a lo anterior, el **segundo objetivo específico** nos permitió determinar si NUA1, asociado a una localización celular particular, afectaba a la función y a la morfología mitocondrial. Finalmente, gracias al **tercero objetivo específico** determinamos si NUA1 asociada a una localización celular particular, afectaba a la glicólisis. Con el desarrollo de todo lo anterior, este trabajo entrega nueva información sobre las funciones metabólicas de NUA1 asociadas a su localización celular, por primera vez se relaciona a NUA1 con la glicólisis y se profundiza en su rol en el metabolismo mitocondrial, proponiendo a NUA1 como una proteína relevante desde el punto de vista metabólico, lo que con mayores estudios podría ayudar a entender rutas adicionales y fundamentales para la adaptación metabólica necesaria en la progresión del cáncer. A continuación, se enunciarán la

hipótesis y los objetivos de investigación de este trabajo. Luego, se detallarán los materiales, instrumentos y métodos utilizados para la experimentación y posterior a esto, se describirá cada uno de los resultados obtenidos y para finalizar, se expondrá el análisis, discusión y conclusiones obtenidas de nuestros hallazgos.

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

Los antecedentes presentados anteriormente, se pueden resumir en los siguientes 7 enunciados:

- Células cancerosas realizan adaptación metabólica para sobrevivir a condiciones de estrés, generalmente aumentando la actividad mitocondrial o aumentando la actividad glicolítica.
- NUA1 se encuentra sobreexpresado en cáncer de alta malignidad y asociado a mal pronóstico de pacientes.
- NUA1 favorece la supervivencia celular en presencia de estrés metabólico.
- NUA1 se encuentra preferentemente en tejidos altamente oxidativos.
- NUA1 favorece el flujo metabólico celular oxidativo, glicólisis y participa de la bioenergética en células de cáncer.
- NUA1 posee localización celular nuclear y citosólica.
- NUA1 fosforila proteínas blancos en una localización celular relacionada a la función que está regulando.

### **2.1. Hipótesis.**

Considerando estos antecedentes, proponemos la siguiente hipótesis: **NUA1 localizado en el citosol aumenta la función mitocondrial y la glicólisis en modelos celulares de cáncer.**

## 2.2. Objetivo General.

Para responder a la hipótesis anterior, este trabajo propone el siguiente objetivo general: **Analizar la participación de NUA1 en el metabolismo celular dependiendo de su localización subcelular.**

## 2.3. Objetivos específicos.

Para desarrollar el objetivo general anterior, hemos planteado 3 objetivos específicos:

- **Objetivo específico 1:** Determinar el efecto de la expresión de NUA1, asociada a una localización celular particular, sobre el estado bioenergético celular.

- **Objetivo específico 2:** Determinar si NUA1 citosólico afecta a la función y a la morfología mitocondrial.

- **Objetivo específico 3:** Determinar la relación de NUA1 y su localización celular con la glicólisis.



### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Reactivos y anticuerpos.

El cocktail de inhibidor de proteasas (P8340), el cocktail de inhibidor de fosfatasas (P5726), 2-Deoxi-D-glucosa (D6134), Oligomicina A (75351), Carbonilcianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, C2920), Antimicina A (A8674), Rotenona (R8875) y Dimetilsulfóxido (DMSO, D8418) fueron obtenidos desde fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich*. El inhibidor de NUA1 HTH-01-015 fue obtenido desde Tocris, mientras que los fluoróforos Etil Ester de Tetrametilrodamina (TMRE, T669), *MitoTracker™ Green FM* (M7514) y Hoechst 33342 (H3570) provienen de *Thermo Fisher*. El marcador de tamaño molecular *AccuRuler* RGB plus (26616) fue adquirido desde *MaestroGen* Inc. La solución de Bradford proviene de Bio-Rad. ECL plus se adquirió de *Amersham Biosciences*, mientras que la adenosina tri-fosfato (ATP) se obtuvo de *Roche*.

#### 3.2. Anticuerpos.

El anticuerpo primario anti-NUAK1 (#4458) fue obtenido desde *Cell Signaling* y el anticuerpo anti-FLAG (M2, F3165) fue obtenido desde *Sigma-Aldrich*. Los anticuerpos contra  $\beta$ -Actina (AC-15, SC-69879), ATP5B (E-1, SC-5597), TOM20 (F-10, SC-17764), MCT4 (D-1, sc-376140), MCT1 (H-1, sc-365501), ATP5H (E-1, sc-515915), SUCLG2 (A-2, sc-390818) y la proteína A/G agarosa (sc-2003) fueron obtenidos desde *Santa Cruz Biotechnology*. El cocktail de anticuerpos OXPHOS (ab110413) y el anticuerpo anti-GAPDH (ab8245) fueron obtenidos de *Abcam*. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con HRP (en inglés, *Horseradish Peroxidase*, #1706516) y anti-IgG de conejo conjugado con HRP (#1706515) fueron obtenidos desde Bio-Rad.

### 3.3. Plásmidos.

Para realizar la transfección transiente o generar los modelos estables se utilizaron los plásmidos resumidos en la **tabla 1**. La secuencia humana de NUAK1 fue obtenida en el plásmido pCMV FLAG-hNUAK1 WT desde *Medical Research Council protein phosphorylation and ubiquitination Unit (MRC-PPU)*, Reino Unido. Luego, la secuencia hNUAK1 fue modificada a través de mutagénesis sitio dirigida para generar la mutante de NUAK1 deficiente de localización nuclear, hNUAK1 KR43/70AA, la cual llamamos NUAK1 citosólica, como se describe en el trabajo de Palma y colaboradores [78]. Las secuencias de hNUAK1 y hNUAK1 KR43/70AA fueron subclonadas en el plásmido pBABE utilizando los sitios de corte para la enzima de restricción *EcoRI*, existentes en los extremos de las secuencias para NUAK1. Con lo anterior, se obtuvieron los plásmidos pBABE-FLAG-NUAK1-WT y pBABE-FLAG-NUAK1-KR43/70AA. Para el silenciamiento de NUAK1 se utilizó un *short harpin* RNA (shRNA) para la secuencia blanco: **TGGCCGAGTGGTTGCTATAAA.**

Plásmidos	Resistencia a antibiótico	Origen
pCMV-FLAG	Ampicilina	Subclonado en nuestro laboratorio
pCMV-FLAG-NUAK1-WT	Ampicilina	<i>MRC-PPU</i>
pCMV-FLAG-NUAK1-KR43/70AA	Ampicilina	Generado en nuestro laboratorio
pCMV-VSV-G	Ampicilina	<i>Addgene</i>
pCL-Eco	Ampicilina	<i>Addgene</i>
pLKO.1-ShRNA-NUAK1	Ampicilina	<i>Sigma-Aldrich</i>
pLKO.1-ShRNA-control	Ampicilina	<i>Sigma-Aldrich</i>

**Tabla 1: Plásmidos utilizados para estudiar los efectos de NUAK1.**

### 3.4. Purificación de Plásmidos

Para la multiplicación del número de copias de los plásmidos de la **tabla 1**, *E. coli* DH5 $\alpha$  (colección propia del Laboratorio) fueron transformadas mediante el método de transformación química con CaCl<sub>2</sub>. Las bacterias transformadas fueron sembradas en agar *Luria Bertani* (LB) en presencia de 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Luego de ser cultivadas por toda la noche en estufa a 37°C, se seleccionó una colonia de cada placa, las cuales luego fueron cultivadas en caldo (LB) con antibiótico, por 14-18 horas en agitación a 120 rpm a 37°C. Para purificar el plásmido desde las bacterias, se utilizó el kit *NucleoSpin® Plasmid Midiprep kit* (Macherey Nagel, USA). Los plásmidos purificados fueron cuantificados a través de la relación de absorbancia 260/280 nm y fueron chequeados por electroforesis en gel de agarosa. La manipulación de estas cepas en los respectivos experimentos fue realizada de acuerdo con la normativa del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción.



### 3.5. Cultivo Celular.

Los modelos celulares utilizados en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo con la localización celular de NUAK1. Se utilizaron las células de cáncer de mama MDA-MB-231, en las cuales anteriormente se describió que NUAK1 posee distribución citosólica (**Figura A1**), y las células HCT116 p53 null, donde NUAK1 se encuentra principalmente distribuido en el núcleo (**Figura A1**). Las células de cáncer de mama MCF-7, las cuales presentan NUAK1 principalmente localizado en el citosol (**Figura A1**), también fueron utilizadas debido a sus características metabólicas, estas células presentan un mayor metabolismo mitocondrial, responden a inhibidores metabólicos y permiten observar cambios morfológicos mitocondriales [98]. También se utilizaron células HeLa, por su facilidad de transfección y las células HEK293 para la generación de modelos estables. Las líneas celulares HeLa, HEK293 y HCT116 p53 null fueron cultivadas en medio DMEM base

(del inglés: *Dulbecco's modified Eagles's medium*) con glucosa 4.5g/L, glutamina 2mM y piruvato de sodio 1mM (*Corning*). Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas con DMEM con glucosa 1g/L, 2mM de glutamina y piruvato de sodio 1mM (*HyClone*). Las células MCF-7 fueron mantenidas en medio MEM (del inglés: *Minimal Essential Medium*), el cual contiene 1g/L de glucosa, 2mM de glutamina y 1 mM de piruvato de sodio (*HyClone*). Todos los medios de cultivos fueron suplementados con 100ug/ml de estreptomicina (*HyClone*), 100U/ml de penicilina (*HyClone*), 2.5ug/ml de Plasmocin (*InvivoGen*, San Diego, CA, USA) y con 10 % de suero bovino (SBF) (*Biological Industries*). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en estufa húmeda de 37°C con atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, con excepción del tratamiento de hipoxia que fue realizado en cámara de hipoxia, la cual fue completada con la mezcla la mezcla 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 94% N<sub>2</sub>. Todas las líneas celulares fueron constantemente chequeadas en sus morfologías y para *micoplasma* con el kit EZ-PCR Mycoplasma (*Biological Industries*). Los cultivos celulares fueron criopreservados con la mezcla 10% DMSO y 90% de FBS en nitrógeno líquido. La manipulación de estas líneas celulares en todos los respectivos experimentos fue realizada de acuerdo con la normativa del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción.

### **3.6. Transfección transitoria de líneas celulares**

Las células HeLa, MCF-7 o HCT116 p53 null fueron cultivadas hasta a un 50% de confluencia. La transfección con los plásmidos de interés se realizó con Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*), en el caso de las células HeLa, o con Lipofectamina 3000 (*Invitrogen*), en el caso de las células MCF-7 y HCT116 p53 null, en presencia de medio sin SBF, sin glutamina y sin antibiótico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posterior a 6 horas de incubación a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, el medio de transfección fue removido y reemplazado por medio completo. Los experimentos fueron realizados entre las 24 a 48 horas post-transfección. La eficiencia de transfección fue evaluada a través de la

observación de la expresión de GFP, y todos los experimentos fueron realizados con una eficiencia de transfección superior al 90%.

### **3.7. Generación de partículas virales y de los modelos estables de NUAK1.**

Para generar las partículas virales, células HEK293 fueron cultivadas a 50% de confluencia en distintas placas de 100 mm y fueron co-transfectadas con las siguientes mezclas de DNA: 2µg pCMV-VSV-G; 5µg pCL-Eco y 10µg de pBABE-FLAG/pBABE-FLAG-NUAK1 WT/pBABE-FLAG-NUAK1-KR43/70AA. Luego de 48 horas de cultivo a 37°C en estufa de atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo fue retirado para obtener las partículas virales, y reemplazado con medio de cultivo fresco. El medio de cultivo retirado fue filtrado con filtro de pirinola de 0,45 µm de diámetro de poro. Un volumen de 2 ml de medio filtrado con partículas virales, más 2 ml de medio fresco y más 8 µg/ml polibreno (*Invitrogen*), se utilizó para infectar una placa de 60 mm de células blanco HCT116 p53 null a 80% de confluencia. Se realizaron 3 infecciones consecutivas cada 24 horas, y luego fueron cultivadas en presencia de 2 µg/ml de puromicina (*Sigma*) durante 5-7 días. Al término de la selección, se procedió a realizar la validación de los modelos generados por *Western blot*. La manipulación correspondiente a las partículas virales de tercera generación fue de acuerdo con el manual de Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción y de CONICYT.

### **3.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y *Western blot*.**

Para obtener las proteínas totales, los cultivos celulares fueron lisados con buffer de lisis NP-40 (NP-40 1%, Tris/HCl pH 7.4 25mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM, Glicerol 5%, más inhibidor de proteasa y fosfatasa). El lisado fue centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos y se conservó el sobrenadante. Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford. Luego, 30-50 µg de proteínas totales, fueron separadas en un SDS-

*PAGE* (6-15%) y transferidas a una membrana de PVDF (*Millipore*). Las membranas de PVDF fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en tampón TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7.4, Tween-20 0.05 % v/v) por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se continuó con la incubación de anticuerpo primario, en la dilución recomendada por el fabricante, en TBS-T a 4°C por toda la noche en agitación, seguido de la incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Entre cada paso, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con TBS-T y finalmente incubadas con el reactivo quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*). Las proteínas fueron visualizadas en *Syngene PXi6 Documentation System* (*Frederick, MD, USA*).

### **3.9. Co-Inmunoprecipitación**

Las células HeLa o MCF-7 fueron sembradas en placas de 100 mm e incubadas por 24 horas a 37°C en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron transfectadas transitoriamente con el vector pCMV-FLAG-NUAK1-WT, pCMV-FLAG-KR43/70AA o pCMV-FLAG (vector vacío), tal como se describe anteriormente. Posterior a 24-48 horas desde la transfección las células fueron colectadas, lisadas y las proteínas obtenidas fueron cuantificadas. Para los ensayos de co-inmunoprecipitación se utilizaron entre 1-2 mg de proteína. Para clarificar los lisados celulares, estos se incubaron con 30 µl de proteína A/G agarosa a 4°C por 1 hora en agitación. Luego, los lisados fueron centrifugados y los sobrenadantes incubados con 2 ug de anticuerpo anti-FLAG, anti-ATP5A o anti-IgG no relacionada (IgG control de ratón) durante 4 horas a 4°C en agitación. Posteriormente, cada muestra fue incubada con 40 µL de proteína A/G agarosa e incubadas a 4°C en agitación por 8 horas. Finalmente, las muestras fueron lavadas 6 veces con buffer de lisis frío (HEPES 10 mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, NaCl 300mM, KCl 10mM, Tritón 0,5%, sin inhibidores de proteasa o fosfatasa), resuspendidas en 50 µL de buffer de carga 2X y denaturadas a 100°C

por 10 minutos. Los co-inmunoprecipitados fueron resueltos por SDS-PAGE y analizados por *Western blot*.

### **3.10. Medición de ATP**

Para medir el ATP celular se utilizó el kit ATP *Determination* (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron sembradas en placa de 96 pocillos y luego fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes. 24 horas post-transfección las células fueron lavadas con PBS y fueron mantenidas en 50  $\mu$ L de PBS frío. A continuación, las células fueron lisadas mediante la adición de 50  $\mu$ L de tampón *Somatic cell ATP releasing reagent* (Sigma-Aldrich) y repetido pipeteo. Posterior a esto, 10  $\mu$ L de cada muestra fueron mezclados con 90  $\mu$ L de la solución de reacción de ATP y se procedió a medir la quimioluminiscencia inmediatamente en el lector de luminiscencia VICTOR (PerkinElmer). En paralelo, se cuantificaron las proteínas con el método de Bradford utilizando, otros 10  $\mu$ L de muestra. Los niveles de ATP de cada muestra fueron calculados utilizando la curva estándar de ATP que se observa en la **figura A2**. Los niveles de ATP fueron normalizados con respecto a las proteínas y los resultados fueron expresados en porcentaje de ATP con respecto al grupo control.

### **3.11. Cuantificación de lactato extracelular**

350.000 células HCT116 p53 null fueron sembradas en placa de 24 pocillos e incubadas a 37 °C en atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue reemplazado por medio libre de rojo fenol y luego, las células fueron sometidas a los respectivos tratamientos. Para recuperar el lactato extracelular, el sobrenadante fue mezclado con ácido tricloroacético 0,6 N en proporción 1:2 en hielo, mezclado 30 segundos en vortex e incubado por 5 minutos a 4°C. Luego las proteínas fueron precipitadas y descartadas mediante centrifugación a 1500 xg. El lactato fue determinado mediante método enzimático, utilizando la reacción de la

lactato deshidrogenasa (LDH, L3916, Sigma) que se muestra en la **figura A3**. El producto NADH fue detectado a través de la medición de absorbancia a 340 nm, y la cuantificación de lactato se realizó utilizando la curva estándar de lactato que se observa en la **figura A3**. Simultáneamente, las células fueron lisadas a 4°C con tampón de lisis SDS (HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, tritón X-100 0,5%, SDS 0,1% y PMSF 1 mM) y las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford. El lactato fue normalizado con respecto a las proteínas y los resultados fueron expresado en  $\mu\text{M}$  de lactato/ $\mu\text{g}$  de proteína.

### 3.12. Evaluación de la respiración celular.

Para estudiar la respiración mitocondrial y la tasa glicolítica de las células de cáncer, se realizó la detección de la tasa de consumo de oxígeno celular (OCR) y de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en células vivas, utilizando el sistema *Seahorse* XF24 (*Agilent*). Brevemente, un día antes, 30.000 células MCF-7 o MDA-MB-231 fueron sembradas en placa de cultivo XF24 e incubadas a 37°C en 5% de atmósfera de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con medio DMEM base (D5030, *Sigma-Aldrich*) y luego la placa de cultivo XF24 y el cartucho *Seahorse* fueron montadas en el sistema analizador *Seahorse*. El OCR fue registrado como  $\text{pmolO}_2/\text{min}$  y el ECAR como  $\text{mpH}/\text{min}$ . En el transcurso del ensayo, se realizaron 4 inyecciones secuenciales de drogas moduladoras del metabolismo, tal como se muestra en la figura. Para las células MCF-7 inyectamos secuencialmente glucosa 5,5 mM, oligomicina A 1,2  $\mu\text{M}$ , FCCP 0,5  $\mu\text{M}$  y Rotenona 2  $\mu\text{M}$  junto con antimicina A 2  $\mu\text{M}$ . Para las células MDA-MB- 231 se utilizó 5,5 mM de glucosa, 1  $\mu\text{M}$  de oligomicina A, 1  $\mu\text{M}$  de FCCP, 1  $\mu\text{M}$  de rotenona y 1  $\mu\text{M}$  de antimicina A. Las concentraciones de drogas utilizadas fueron obtenidas de acuerdo con la previa estandarización. Al terminar el ensayo, las células fueron lisadas con el tampón de lisis SDS a 4°C y las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford. Cada OCR y ECAR se normalizó con respecto a sus proteínas y luego se procedió a calcular los

parámetros metabólicos. Para calcular los parámetros de respiración mitocondrial, se calculó el consumo de oxígeno no asociado a la mitocondria (Non-MOC) utilizando la mínima tasa de OCR registrada luego de la cuarta inyección. Luego se procedió a calcular los otros parámetros metabólicos de la siguiente manera:

- **Respiración basal:** Última tasa OCR luego de la inyección de glucosa - Non-MOC.
- **Respiración máxima:** Máxima tasa OCR después de la inyección de FCCP – Non-MOC.
- **Respiración asociada a la fuga de protones:** Mínima tasa OCR luego de la inyección de oligomicina A - Non-MOC.
- **Respiración asociada a la producción de ATP:** Última tasa OCR antes de la inyección de oligomicina A - Mínima tasa OCR luego de la inyección de Oligomicina A.
- **Capacidad de Reserva respiratoria:** Respiración máxima – Respiración basal.

Todos los parámetros de respiración mitocondrial se encuentran representados en la **figura A4**. Luego, para calcular los parámetros glicolíticos (**figura A5**), se utilizaron las siguientes fórmulas:

- **Glicólisis:** Máxima tasa ECAR antes de la inyección de oligomicina A – Última tasa ECAR antes de la inyección de glucosa.
- **Capacidad Glicolítica:** Máxima tasa ECAR después de la inyección de oligomicina A – Última tasa ECAR antes de la inyección de glucosa.
- **Capacidad de Reserva glicolítica:** Capacidad glicolítica – Glicólisis.

### **3.13. Inmunofluorescencia**

Las células HeLa fueron sembradas sobre cubreobjetos de 12mm en placas de 12 pocillos, luego transfectadas de manera transitoria e incubadas a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Posterior a 48 horas, las células fueron fijadas con 4% p/v de paraformaldehído en PBS, lavadas 3 veces con PBS y permeabilizadas con una solución de 0,1% de Tritón X-100 en PBS. Una vez permeabilizadas, se procedió a realizar el bloqueo incubando cada vidrio con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a T° ambiente. A continuación, cada cubreobjeto fue incubado con el anticuerpo primario diluido 1:200 en una solución de PBS con 1% BSA, durante 16 horas a 4°C en cámara oscura y húmeda. Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y luego incubadas 2 horas a T° ambiente en cámara de oscuridad y humedad con anticuerpo secundario en una dilución de 1:500 en BSA al 1% en PBS. Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 diluido 1:250. Finalmente, las muestras fueron montadas sobre un portaobjetos con solución de montaje y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal, utilizando el Microscopio Confocal Espectral LSM780 NLO (Carl Zeiss) del Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción, Chile.

### **3.14. Microscopía *in vivo***

40.000 MCF-7 células fueron sembradas en una placa para microscopia de 35 mm e incubadas toda la noche por 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron incubadas con 200nM *MitotrackerGreen* y 5µg/ml Hoechst 33342 por 30 minutos en PBS a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y luego se adicionó 10 mM TMRE en medio de cultivo fresco y se procedió a realizar la microscopia. Para la microscopia *in vivo* las células fueron mantenidas en cámara *Chamlide* (*Lice cell*

*instrument*) y las imágenes fueron capturadas con el microscopio Olympus FV1000 de la Universidad Andrés Bello, Santiago.

### 3.15. Procesamiento de imágenes.

El análisis de las imágenes fue realizado utilizando el software ImageJ. Para calcular la intensidad de fluorescencia de TMRE y *mitotrackerGreen*, se midió la fluorescencia total corregida (en inglés, *The Corrected Total Cell Fluorescence*, CTCF) para cada célula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{CTCF} = (\text{Area} \times \bar{X} \text{ Fluorescencia de la Célula}) - (\text{Area} \times \bar{X} \text{ Fluorescencia de } \textit{Background})$$

### 3.16. Ensayos Estadísticos.

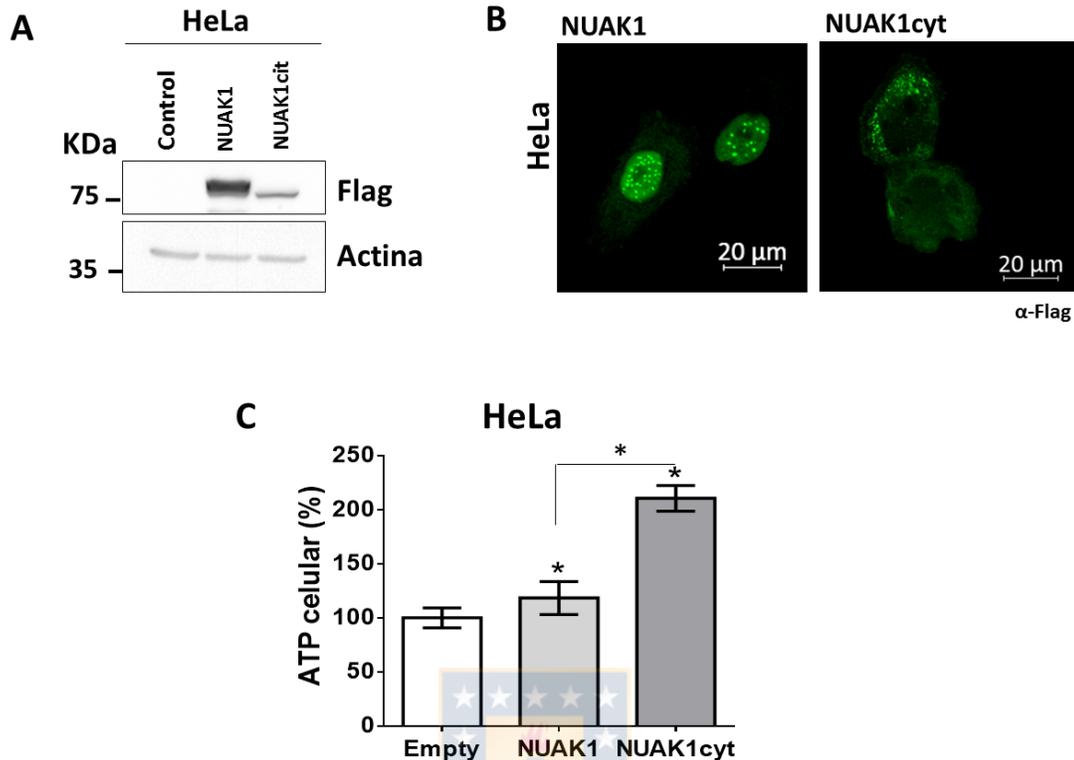
Todos los datos fueron recolectados en al menos un n=3 y se asumió distribución gaussiana para ellos. En los datos con un n igual o mayor a 10, los puntos “*outlier*” fueron removidos con el método de ROUT. Los datos de distribución normal que formaban dos grupos fueron sometidos a una prueba no-pareado *t-student* con corrección de *Welch* y los datos de tres o más grupos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) de una cola no pareado, usando la corrección *Holm-Sidak's*. Cada grupo experimental fue analizado con su respectivo grupo control. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0.05$ . Todos los gráficos y las pruebas estadísticas fueron realizados con Prisma GraphPad.

## 4. Resultados

4.1. **Objetivo 1: Determinar el efecto de la expresión de NUA1, asociada a una localización celular particular, sobre el estado bioenergético celular.**

4.1.1. **La sobreexpresión de NUA1 citosólico aumenta la concentración de ATP intracelular total en líneas celulares de cáncer.**

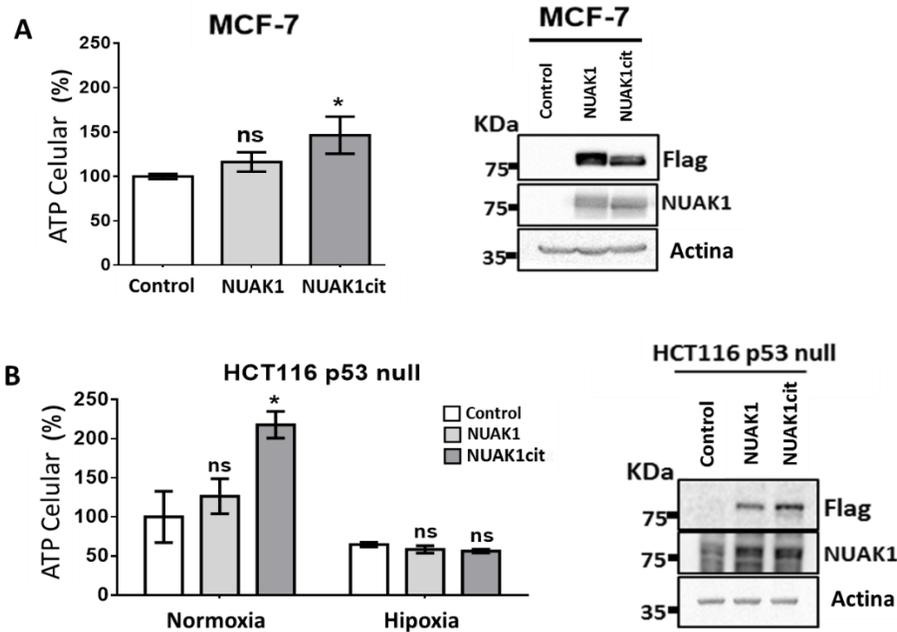
Para determinar el efecto de la sobreexpresión de NUA1 sobre la bioenergética celular, se evaluó la presencia del principal metabolito celular involucrado en la transferencia de energía, el ATP. Para lo anterior, en primer lugar, se cuantificó la concentración de ATP intracelular total de células HeLa transfectadas con los plásmidos de sobreexpresión para FLAG-NUA1 WT y para FLAG-NUA1 citosólico (**Figura 6A**), descritos en la sección de metodologías. Observamos que la sobreexpresión de NUA1 WT, la cual en células HeLa se localiza principalmente en el núcleo, aunque también posee localización citosólica (**Figura 6B**) [78], aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) la concentración de ATP celular (**Figura 6C**), sin embargo, este aumento fue significativamente mayor cuando la célula HeLa sobreexpresó la mutante de NUA1 deficiente de localización nuclear (citosólico) (**Figura 6C**), sugiriendo que la función bioenergética de NUA1 esta principalmente asociada a su distribución citoplasmática.



**Figura 6. Relación entre la expresión de NUAK1 y el ATP celular.** (A) Detección de la expresión de NUAK1 en células HeLa por medio de *Western blot*. (B) Inmunofluorescencia de células HeLa donde se muestra la distribución celular de NUAK1-FLAG. Se utilizó el anticuerpo anti-FLAG como anticuerpo primario. Aumento 400X. (C) Cuantificación de ATP en células HeLa que sobreexpresan de manera transitoria NUAK1 y NUAK1 citosólico (NUAK1cit). La cuantificación de ATP fue calculada relativa al grupo control y expresadas como porcentaje de ATP celular. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola,  $n=3$  y  $*=p<0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

Para complementar lo anterior, también se cuantificó el ATP en células MCF-7 y HCT116 p53 null transfectadas con los mismos plásmidos anteriores (FLAG-NUAK1 WT y para FLAG-NUAK1 citosólico). Se observó en las células MCF-7, donde NUAK1 es principalmente citosólico (**Figura A1**), que la sobreexpresión de FLAG-NUAK1 WT no aumentó significativamente el ATP celular con respecto al grupo control ( $p>0,05$ ) (**Figura**

**7A).** No obstante, la sobreexpresión de la mutante citosólica de NUA1 incrementó significativamente el ATP celular con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7A**). Lo mismo fue observado en las células HCT116 p53 null, donde NUA1 se encuentra principalmente localizado en el núcleo (**Figura A1**), las cuales sólo aumentaron significativamente su ATP celular con respecto al grupo control frente a la sobreexpresión de la mutante citosólica de NUA1 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7B**). Luego, para determinar el origen celular del ATP inducido por la expresión de FLAG-NUA1 citosólico, realizamos la medición de ATP bajo la condición de inhibición de la función mitocondrial, permitiendo evaluar sólo el ATP proveniente de la glicólisis. Para realizar lo anterior, células HCT116 p53 null transfectadas con los plásmidos para la expresión de FLAG-NUA1 WT y para FLAG-NUA1 citosólico fueron mantenidas por 24 horas bajo hipoxia. En estas condiciones, la sobreexpresión de NUA1, tanto en localización citosólica como nuclear, no alteraron significativamente el ATP celular con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7B**). La viabilidad celular bajo condiciones de hipoxia fue evaluada a través del recuento de células en tinción de azul de tripán, presentando todos los grupos celulares una viabilidad superior al 98%. Estos resultados sugieren que NUA1 es capaz de aumentar el estado energético celular sólo cuando se localiza en el citosol, y que este aumento de ATP está relacionado a la función mitocondrial.

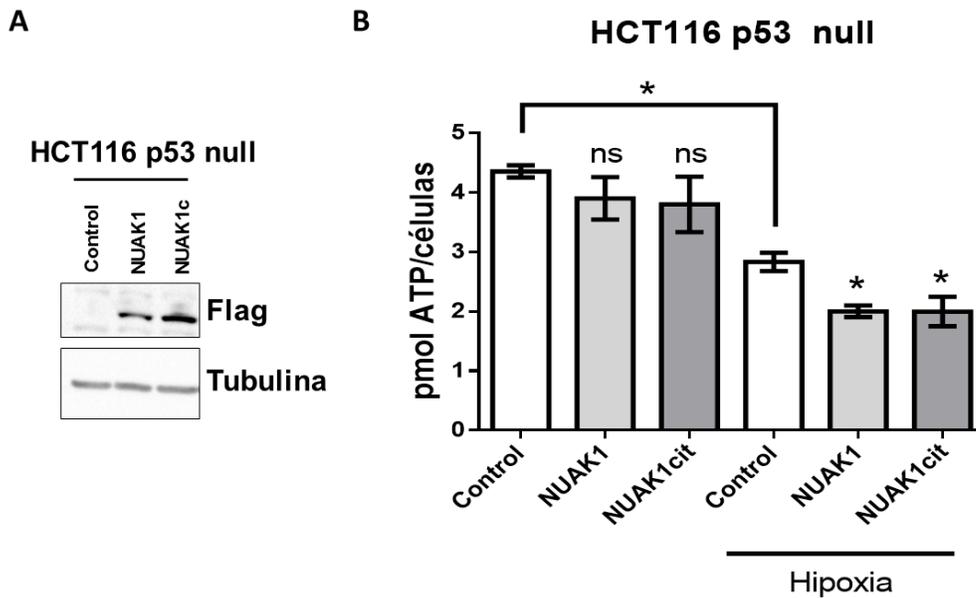


**Figura 7. NUAK1 citosólico incrementa el ATP celular en células de cáncer.** Cuantificación relativa de ATP en células MCF-7 (A) y HCT116 p53 null (B) luego de 24 horas de transfección con los plásmidos de expresión de FLAG-NUAK1 WT y para FLAG-NUAK1 citosólico (NUAK1cit). Como control se utilizó el vector vacío. Las células HCT116 p53 null transfectadas fueron incubadas en condición de normoxia o hipoxia por 24 horas. Los gráficos fueron normalizados con respecto a la concentración de proteínas y expresados en porcentaje de ATP con respecto al grupo control. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n=5$  y se realizaron en tres réplicas independientes. La expresión de NUAK1 en las células MCF-7 y HCT116 p53 null fue evaluada a través de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-FLAG y anti-NUAK1. Como control de carga se detectó actina. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.2. La sobreexpresión prolongada de NUAK1 no incrementa el ATP celular.

Los modelos de expresión estable permiten estudiar el efecto de la expresión en tiempos más prolongados, realizar mayor cantidad de experimentos desde el mismo *input* inicial de células y disminuir la variabilidad asociada a cada transfección transitoria. Debido a lo anterior, se generaron modelos estables en las células HCT116 p53 null para la

expresión de FLAG-NUAK1 WT, para FLAG-NUAK1 citosólico y un grupo control. La generación de los modelos estables fue validada por *Western blot* (**Figura 8A**). A continuación, se procedió a evaluar la concentración de ATP celular en cada uno de estos modelos celulares de expresión estable, en condición normal y en condición de hipoxia. Contrario a lo esperado, no se observó incremento significativo ( $p>0,05$ ) de la concentración de ATP celular inducido por la expresión de NUAK1 citosólico (**Figura 8B**). Tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración de ATP entre ningún otro grupo celular (**Figura 8B**). La condición de hipoxia afectó significativamente la concentración de ATP del grupo control con respecto a la condición normóxica ( $p<0,05$ ), mostrando que las células HCT116 p53 null luego de ser transformadas a modelos estables, aún conservan la capacidad de responder a estímulos metabólicos (**Figura 8B**). Sin embargo, luego de la incubación en hipoxia, los grupos estables para la expresión de FLAG-NUAK1 WT y para FLAG-NUAK1 citosólico, mostraron niveles significativamente menores de la concentración de ATP ( $p<0,05$ ) en comparación al grupo control (**Figura 8B**). Este resultado observado bajo la condición de hipoxia sugiere que la expresión estable y prolongada de NUAK1 afecta a la glicólisis, sin embargo, de acuerdo con lo observado en condiciones de cultivo normal, sugiere también que la expresión prolongada de NUAK1 podría inducir a mecanismos compensatorios, que lleven al balance de los efectos metabólicos inducidos por NUAK1, por lo tanto, apantallen las funciones de NUAK1. Debido a lo anterior, y considerando que el metabolismo celular es altamente dinámico, sólo se utilizaron modelos transitorios de NUAK1 para la realización de los posteriores experimentos.

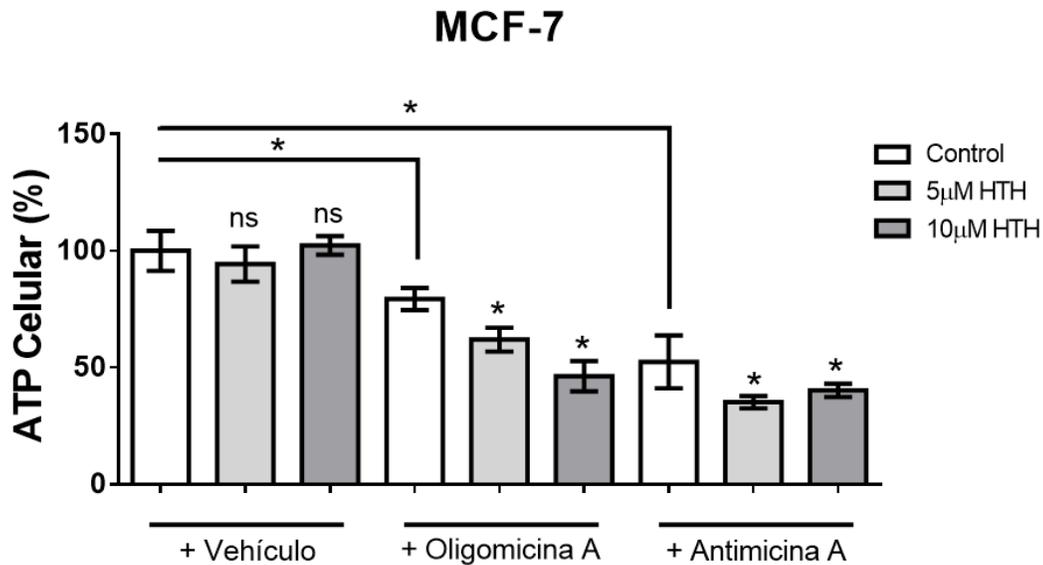


**Figura 8. La expresión estable de NUAK1 no afecta los niveles de ATP celular. (A)** Cuantificación de ATP en células HCT116 p53 null estables para FLAG-NUAK1 WT y para FLAG-NUAK1 citosólico (NUAK1cit) incubadas en condición de normoxia o hipoxia por 24 horas. Como control se utilizó el vector vacío. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n=3$  y se realizaron en dos réplicas independientes. **(B)** La expresión de NUAK1 fue evaluada a través de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-FLAG y anti-tubulina como control de carga. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.1.3 La inhibición de NUAK1 disminuye la concentración de ATP celular bajo condiciones de inhibición mitocondrial.

Para complementar nuestros hallazgos anteriores, se evaluó el efecto de la inhibición de NUAK1 sobre la concentración de ATP en células MCF-7. Para la inhibición de la actividad quinasa de NUAK1 se utilizó el inhibidor competitivo HTH-01-015, este ha sido ampliamente caracterizado y es efectivo desde 1 hora de incubación a una concentración de  $10\mu\text{M}$  [99]. Las células MCF-7 no afectaron significativamente ( $p > 0,05$ ) su concentración de ATP celular con respecto al grupo control, luego de la incubación con

5 $\mu$ M o 10 $\mu$ M de HTH-01-015 por 4 horas (**Figura 9**). Esto sugiere que la célula de cáncer puede mantener su nivel de ATP balanceado frente a la inhibición de NUA1. Anteriormente, nuestro resultado mostró que la sobreexpresión de NUA1 citosólico incrementa la concentración de ATP, principalmente, de origen mitocondrial, por lo que para complementar lo anterior, se evaluó el efecto de la inhibición de NUA1 sobre la concentración de ATP celular bajo la condición de inhibición mitocondrial. Esta vez, debido a que la evaluación de ATP fue posterior a solo 4 horas post-inhibición de NUA1 y para asegurar la inhibición de la función mitocondrial, se utilizaron los inhibidores químicos oligomicina A y antimicina A (**Figura 9**). Cabe destacar que la oligomicina A es un inhibidor del complejo ATP sintasa, el cual aún permite una mínima función de la cadena transportadora de electrones. Por otro lado, la antimicina A es inhibidor del complejo III de la cadena transportadora de electrones, por lo que produce la detención completa de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Se observó que los tratamientos de oligomicina A y antimicina A significativamente disminuyeron la concentración de ATP celular ( $p < 0,05$ ) en comparación a las células tratadas con el vehículo (**Figura 9**), lo cual indicó una efectiva inhibición de la función mitocondrial. Contrario a lo esperado, la inhibición conjunta de NUA1 y la función mitocondrial disminuyó significativamente la concentración de ATP celular ( $p < 0,05$ ) en comparación a cada grupo control (**Figura 9**). Es decir, se observó que la pérdida de función de NUA1 afectó la concentración de ATP celular procedente de la ruta glicolítica. Como las células MCF-7 poseen una fracción de NUA1 en el núcleo, no se pudo atribuir este efecto a una localización particular de NUA1.



**Figura 9. La inhibición de la función de NUA1 afecta el ATP celular de origen glicolítico.** Cuantificación relativa de ATP en células MCF-7 luego del tratamiento con 5 µM o 10 µM de HTH-01-015 por 4 horas. En paralelo, un grupo de células fue tratado en con 1 ug/ml de oligomicina A/HTH-01-015 y otro con 2 µM antimicina A/ HTH-01-015 durante 4 horas. El gráfico fue normalizado con respecto a la concentración de proteínas y expresados en porcentaje de ATP con respecto al grupo control. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n=5$  y se realizaron en tres réplicas independientes. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.1.4 Resumen de la ejecución del objetivo 1 de este trabajo: NUA1 citosólico aumenta el ATP celular

Los resultados obtenidos en este objetivo entregan evidencia de que NUA1 citosólico incrementa y mantiene la concentración de ATP celular, el cual es principalmente de origen mitocondrial. Sin embargo, también entregan evidencia de que la función de NUA1 es necesaria para la mantener la concentración de ATP derivado de la glicólisis.

#### 4.2. **Objetivo 2: Determinar si NUAK1 citosólico afecta a la función y a la morfología mitocondrial.**

De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, NUAK1 citosólico incrementa la concentración de ATP celular dependiente de la función mitocondrial. El incremento en la concentración de ATP en la célula puede deberse a dos razones: un incremento en la producción de ATP o una disminución en su consumo. Cualquiera de las dos alternativas anteriores, queda en evidencia luego de una evaluación de la función mitocondrial, debido a que el incremento de producción de ATP mitocondrial irá acompañado de un aumento de la actividad mitocondrial, mientras que una disminución en el consumo de ATP presentará una disminución de la actividad mitocondrial. Para analizar la función mitocondrial se realizaron mediciones del consumo de oxígeno *in vivo* en tiempo real. Con esta información y siguiendo las metodologías descritas anteriormente, se determinaron parámetros metabólicos asociados a la respiración mitocondrial midiendo el consumo de oxígeno en células sometidas, de manera secuencial, a drogas moduladoras de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa [100, 101]. Los parámetros metabólicos determinados fueron los siguientes: **la tasa de respiración basal**, la cual mide el funcionamiento mitocondrial en una condición de exceso de glucosa, y **la máxima capacidad respiratoria**, la cual es la mayor tasa respiratoria que la mitocondria puede alcanzar, simula una situación fisiológica donde la demanda energética es elevada y evidencia la máxima capacidad de operar de la cadena respiratoria de electrones. También se calculó la **respiración asociada a la fuga de protones**, la cual corresponde a la respiración desacoplada, es decir la independiente de la producción de ATP. Aunque aún no está claro si corresponde a un mecanismo de regulación del potencial de membrana mitocondrial, generalmente el incremento de la respiración asociada a la fuga de protones va asociada a daños de la mitocondria o a procesos desacoplantes como la termogénesis en el tejido adiposo marrón. Otro parámetro mitocondrial calculado fue la **respiración**

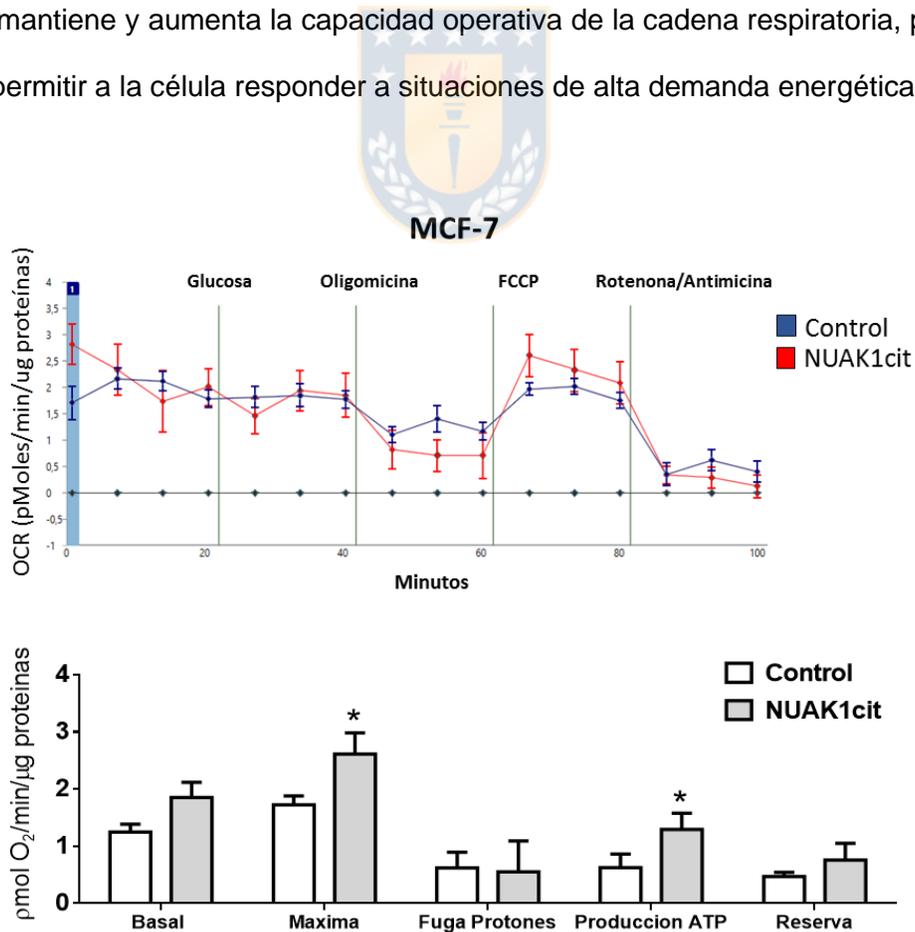
**asociada a la producción de ATP**, que tal como su nombre lo indica, representa la porción de la respiración basal destinada a generar ATP mitocondrial. Finalmente, se obtuvo la **capacidad de reserva mitocondrial**, ésta es una medida de la habilidad de la célula a responder a una condición de estrés que involucra una elevada demanda de energía [100, 101]. El detalle sobre la medición de todos estos parámetros se encuentra en la sección metodologías.

#### **4.2.1. NUAK1 en su localización citosólica aumenta y mantiene la función máxima mitocondrial.**

Para dilucidar si la expresión de NUAK1 aumenta la producción o disminuye el consumo de ATP, se determinaron los parámetros metabólicos asociados a la respiración mitocondrial en células MCF-7 que sobreexpresan FLAG-NUAK1 citosólico. NUAK1 en su localización citosólica incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) la tasa respiratoria asociada a la producción de ATP (**Figura 10**) con respecto al grupo control, por lo que determinamos que el incremento de ATP, producto del aumento de expresión de NUAK1 citosólico, se debe a un incremento en la producción de ATP mitocondrial. Adicionalmente, NUAK1 también incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) la tasa máxima de respiración con respecto a las células control (**Figura 10**), sugiriendo que NUAK1 incrementa la capacidad operativa de la cadena transportadora de electrones. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los otros parámetros metabólicos evaluados.

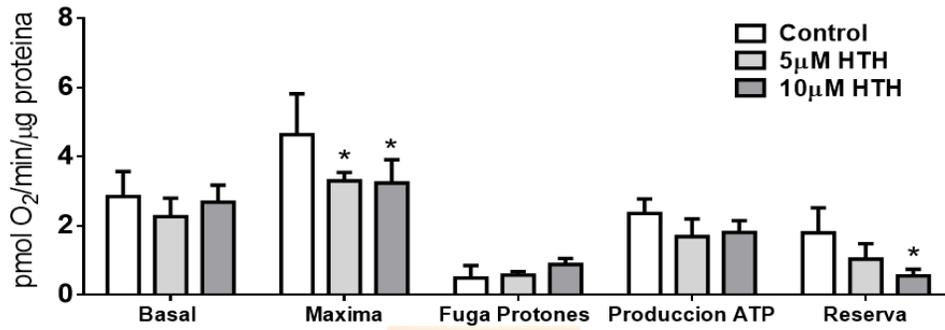
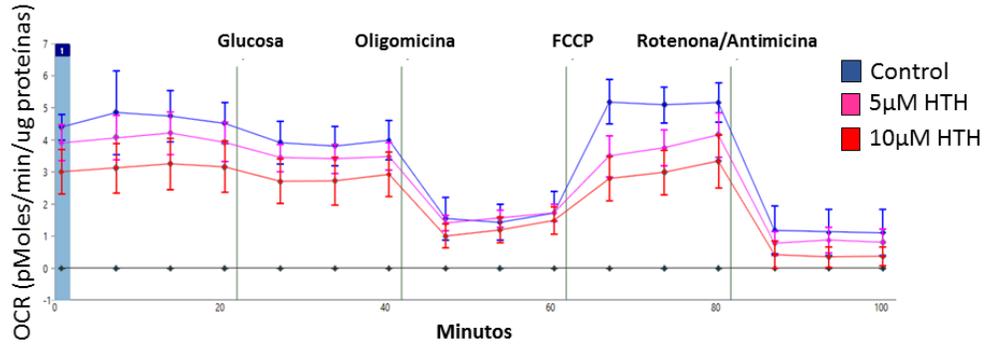
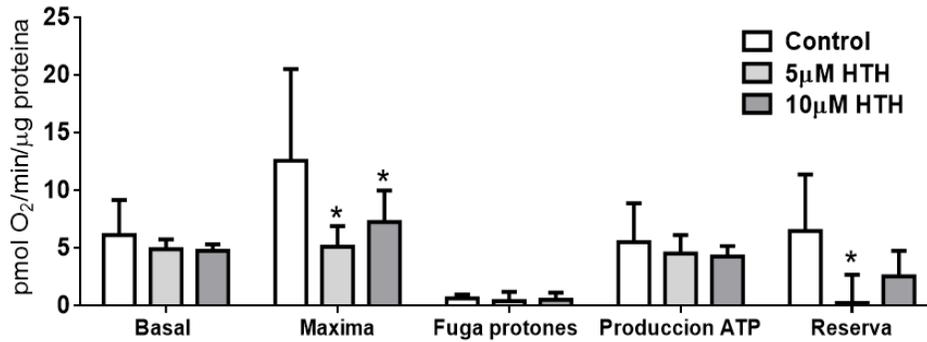
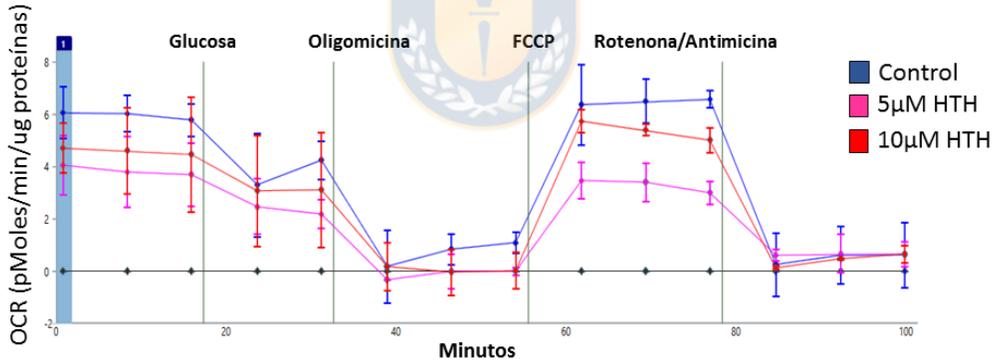
Para complementar lo anterior, se evaluaron los parámetros metabólicos asociados a la función mitocondrial en células MCF-7 tratadas por 4 horas con 5 $\mu$ M o 10 $\mu$ M del inhibidor de HTH-01-015. En ambas condiciones, las células con pérdida de función de NUAK1 disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la tasa máxima de respiración y la capacidad respiratoria de reserva con respecto a las células control (**Figura 11A**). Sin

embargo, no observamos disminución significativa ( $p > 0,05$ ) de la tasa respiratoria asociada a la producción de ATP (**Figura 11A**), aunque esto es consecuente a que la inhibición de NUAK1 por 4 horas no disminuye el ATP celular. No observamos diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la respiración basal o la asociada a fuga de protones (**Figura 11A**). Para aportar más evidencia de que los efectos observados fueron dependientes de la localización citosólica de NUAK1, incluimos las células MDA-MB-231 en este ensayo, debido a que en estas células NUAK1 se localiza casi completamente en el citosol (**Figura A1**). En las células MDA-MB-231 con pérdida de función de NUAK1 se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los mismos parámetros metabólicos que en las células MCF-7, es decir en la tasa respiratoria máxima y en la capacidad de reserva respiratoria (**Figura 11B**). Tomando en cuenta los resultados presentados anteriormente, sugerimos que NUAK1 citosólico mantiene y aumenta la capacidad operativa de la cadena respiratoria, por lo que le podría permitir a la célula responder a situaciones de alta demanda energética.



**Figura 10. La expresión de NUAK1 citosólico aumenta la respiración máxima mitocondrial y la respiración asociada a la producción de ATP.** Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en células MCF-7 luego de 24 horas de transfección con NUAK1 citosólico (NUAK1cit) y el vector vacío (Control). Las células fueron tratadas secuencialmente con glucosa 5,5 mM, oligomicina A 1,2  $\mu$ M, FCCP 0,5  $\mu$ M y Rotenona/antimicina A 2  $\mu$ M. El OCR fue normalizado con respecto a la concentración de proteínas y los parámetros mitocondriales calculados se muestran en el gráfico de barras inferior. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n=3$  y se realizaron en tres réplicas independientes. Fuente: Elaboración propia.



**A****MCF-7****B****MDA-MB-231**

**Figura 11. La inhibición de NUA1 disminuye la respiración máxima mitocondrial y la capacidad de reserva mitocondrial.** Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en células MCF-7 (**A**) y MDA-MB-231 (**B**) luego de tratamiento con 5 $\mu$ M o 10 $\mu$ M de HTH-01-015 por 4 horas. Las células MCF-7 fueron tratadas secuencialmente con glucosa 5,5 mM, oligomicina A 1,2  $\mu$ M, FCCP 0,5  $\mu$ M y rotenona/antimicina A 2  $\mu$ M y las células MDA-MB-231 con glucosa 5,5 mM, oligomicina A 1  $\mu$ M, FCCP 1  $\mu$ M y rotenona/antimicina A 1  $\mu$ M. El OCR fue normalizado con respecto a la concentración de proteínas y los parámetros mitocondriales calculados se muestran en el gráfico de barras inferior. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n=3$  y se realizaron en tres réplicas independientes. Fuente: Elaboración propia.

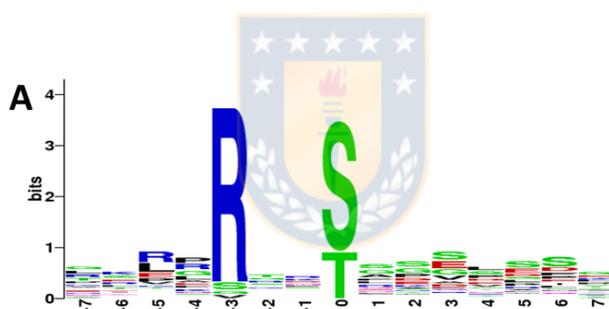
#### **4.2.2. NUA1 interacciona con la subunidad ATP5A de la ATP sintasa.**

Debido a nuestras evidencias de que NUA1 aumenta la producción de ATP mitocondrial, investigamos la asociación de NUA1 con proteínas involucradas en este proceso. En nuestro laboratorio se purificó FLAG-NUA1 WT y las proteínas asociadas a ésta se analizaron por espectrometría de masas, utilizando *multidimensional protein identification technology* (MudPIT), gracias a la cual se identificaron posibles interactores para NUA1 [78]. Entre los posibles blancos para NUA1 se encontraron algunas de las subunidades de la ATP sintasa (**Tabla 2**), complejo proteico encargado de realizar la síntesis de ATP, por lo que la fosforilación de sus subunidades podría tener directa relación con cambios en la concentración de ATP mitocondrial. Con la finalidad de buscar secuencias de reconocimiento de fosforilación de NUA1 en las subunidades de la ATP sintasa presentadas en la **tabla 2**, se realizó una predicción bioinformática utilizando el motivo de fosforilación de NUA1 (**Figura 12A**). Encontramos 3 sitios putativos de fosforilación para NUA1 en la secuencia de ATP5A, 2 sitios putativos de fosforilación en la secuencia de ATP5B, 1 sitio putativo de fosforilación en la subunidad ATP5C y ningún sitio putativo de fosforilación en la subunidad ATP5H (**Figura 12B**). Como control positivo

se realizó la predicción de fosforilación para el blanco conocido de NUAK1, p53. Dentro de los sitios putativos de fosforilación de NUAK1 para p53 se encontraron los dos sitios blancos descritos para NUAK1, la Ser15 y la Ser392 (**Figura 12B**).

Descripción	Nombre Proteína (humano)	Fracción citosólica						Fracción nuclear					
		NUAK1 cit		NUAK1 WT		Control		NUAK1 cit		NUAK1 WT		Control	
		P	dNSAF	P	dNSAF	P	dNSAF	P	dNSAF	P	dNSAF	P	dNSAF
NUAK1	NUAK1	65	0,03421	54	0,019578	0	0	53	0,039253	45	0,0317	0	0
Subunidad alfa de la ATP sintasa	ATP5A1	10,25000	0,00156	9,00000	0,00206	4,66667	0,00097	0	0	0	0	0	0
Subunidad beta de la ATP sintasa	ATP5B	8,75000	0,00133	8,33333	0,00143	4,66667	0,00089	0	0	0	0	0	0
Subunidad d de la ATP sintasa	ATP5H	1,50000	0,00054	2,00000	0,00070	0,00000	0,00000	0	0	0	0	0	0
Subunidad gama de la ATP sintasa	ATP5C1	3,00000	0,00104	3,66667	0,00153	1,00000	0,00056	0	0	0	0	0	0

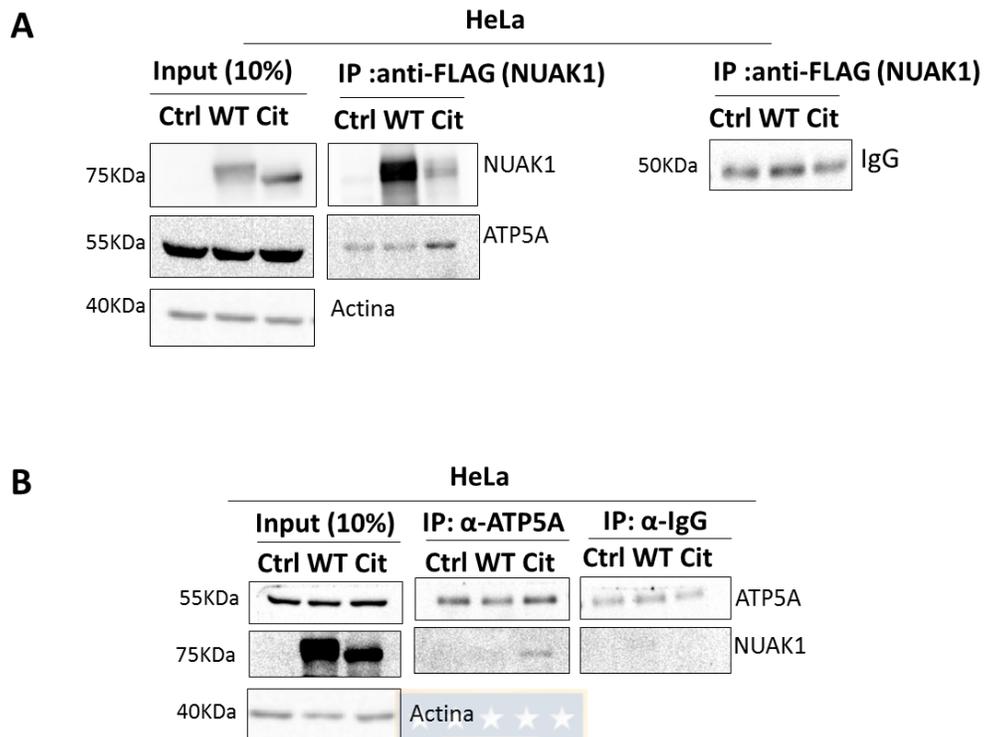
**Tabla 2. Tabla de los potenciales interactores de NUAK1. (A)** Tabla que muestra el conteo total de péptidos (P) y la distribución del factor de abundancia espectral normalizado (dNSAF) para cada proteína identificado en la purificación de FLAG-mNUAK1 WT y FLAG-mNUAK1 KR44/71AA murino (n=3).



Subunidad	Tamaño (Aa)	Posición de secuencia de importe mitocondrial	Posición putativa de fosforilación	Aa	Péptido putativa de fosforilación	Puntaje	Ref.
<b>ATP5A</b>	553	1-43	236	S	QKRFNDGSDEKKKLY	3.125	1
			419	S	LSVSRVGSAAQTRAM	4.25	2
			533	S	IRADGKISEQSDAKL	4.25	2
<b>ATP5B</b>	529	1-47	353	S	ITTTKKSITSVQAI	4.25	0
			465	S	RKIQRFLSQPFQVAE	3.625	26
<b>ATP5c1</b>	298	1-25	146	S	GILYRTHSDQFLVAF	3.5	26
<b>ATP5H</b>	161	NC	-	-	-	-	-
<b>p53</b>	393	-	6	S	**MEEPQSDPSVEPP	4.625	3
			15	S	<b>PSVEPPLSQETFSDL</b>	<b>9.375</b>	<b>8</b>
			94	S	PAPSWPLSSSVPSQK	3.625	-
			106	S	SQKTYQGSYGFRLLGF	4.75	1
			303	S	HHELPPGSTKRALPN	4.875	1
			314	S	ALPNNTSSSPQPKKK	3.5	7
			392	S	<b>FKTEGPDSD*****</b>	<b>4.875</b>	<b>14</b>

**Figura 12. Predicción de fosforilación de NUAK1 en las secuencias de las subunidades de la ATP sintasa. (A)** Motivo de fosforilación de NUAK1 generado en *PhosphoNetworks*. **(B)** La tabla muestra los sitios putativos de fosforilación por NUAK1 en las subunidades de la ATP sintasa obtenidos desde el servidor GPS 3.0. NC: no reportado. Fuente: Elaboración propia.

Las subunidades ATP5A y ATP5B corresponden a las subunidades catalíticas del complejo ATP sintasa y la fosforilación en cualquiera de ellas, llevaría como consecuencia la regulación de la función del complejo ATP sintasa. Sin embargo, debido a que la subunidad ATP5A presentó mayor probabilidad de unión con NUAK1 (**Tabla 2**) y mayor cantidad de sitios putativos de fosforilación para NUAK1 (**Figura 12B**) se procedió a validar esta interacción realizando ensayos de co-inmunoprecipitación en células HeLa transfectadas con plásmidos de expresión para FLAG-NUAK1 WT y para FLAG-NUAK1 citosólico. Al inmunoprecipitar NUAK1, encontramos que FLAG-NUAK1 citosólico interacciona con la subunidad ATP5A (**Figura 13A**) y luego, cuando se inmunoprecipitó la subunidad endógena ATP5A en células HeLa, se encontró interacción sólo con FLAG-NUAK1 citosólico (**Figura 13B**), sugiriendo que NUAK1 sólo en su localización citosólica es capaz de interactuar con la subunidad ATP5A. Finalmente, evaluamos la interacción entre NUAK1 y la ATP5A endógenos en las células MCF-7, pero esta no fue detectada (**Figura A6**). En este ensayo se utilizó como control positivo la succinil-coA-ligasa (Suc1g1) (**Figura A6**). Para dar mayor comprensión a la interacción entre ATP5A y NUAK1, evaluamos la presencia de secuencias de importe mitocondrial en NUAK1, a través de las herramientas bioinformáticas *MitoMiner* y *TargetP*. Sin embargo, no se encontró ninguna secuencia de importe mitocondrial presente en NUAK1 (**Figura A7**). En base a estos resultados, se sugiere que existe interacción entre ATP5A y NUAK1 citosólico.



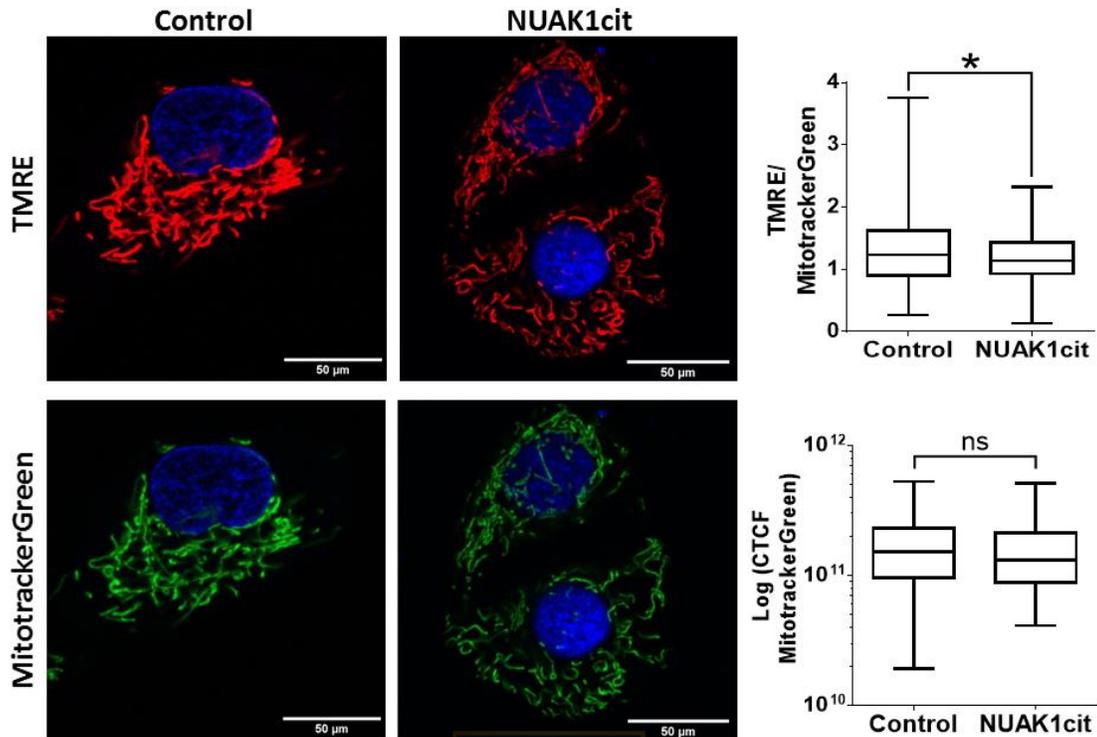
**Figura 13. NUAK1 citosólico interacciona con la subunidad ATP5A. (A)** Co-inmunoprecipitación de FLAG-NUAK1 WT (WT) y de FLAG-NUAK1 citosólico (Cit), sobreexpresado en células HeLa. La inmunoprecipitación se realizó con el epítopo Flag presente en las secuencias de NUAK1 y como control negativo se utilizó la expresión del vector pCMV-Flag (Ctrl). Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos contra NUAK1, ATP5A y actina. Como control de carga de la inmunoprecipitación se detectó la cadena pesada de la inmunoglobulina (n=2). **(B)** Co-inmunoprecipitación de la ATP5A endógena en células HeLa que sobreexpresan NUAK1 (WT), NUAK1 citosólico (Cit) y el vector vacío (Ctrl). Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos contra NUAK1, ATP5A y actina. Como control negativo se inmunoprecipitó con una IgG no relacionada a la ATP5A (n=2). Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.3. NUA1 en su localización citosólica afecta al potencial de membrana y morfología mitocondrial.

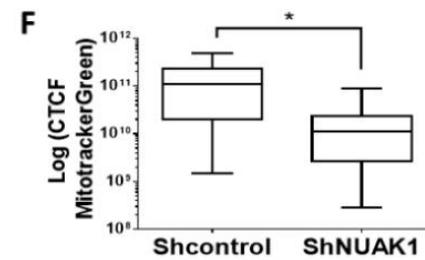
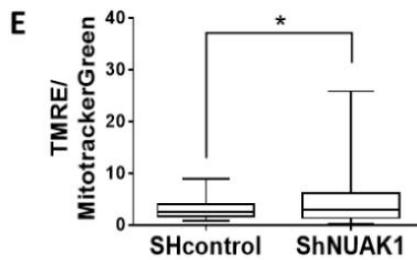
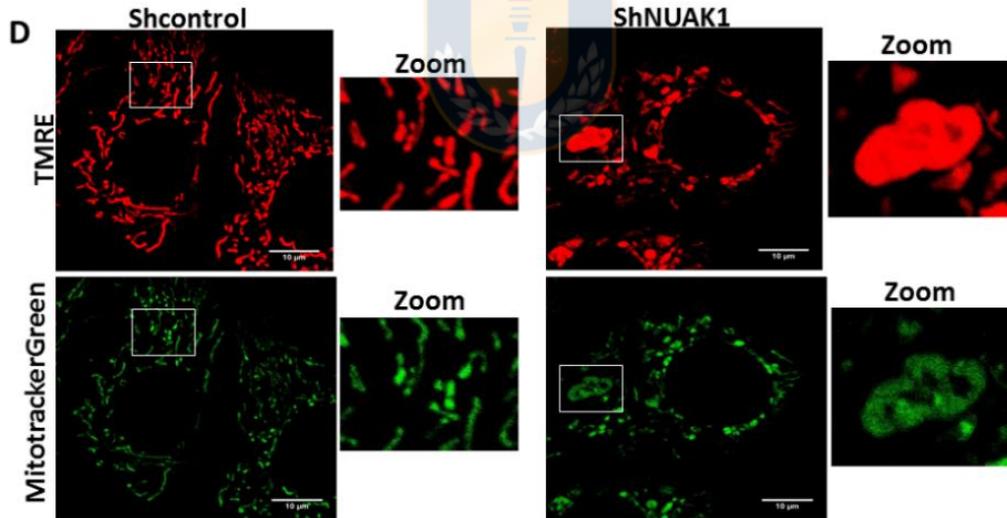
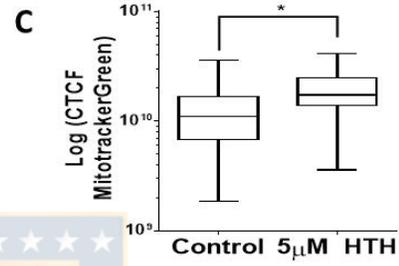
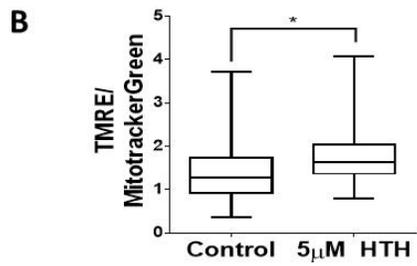
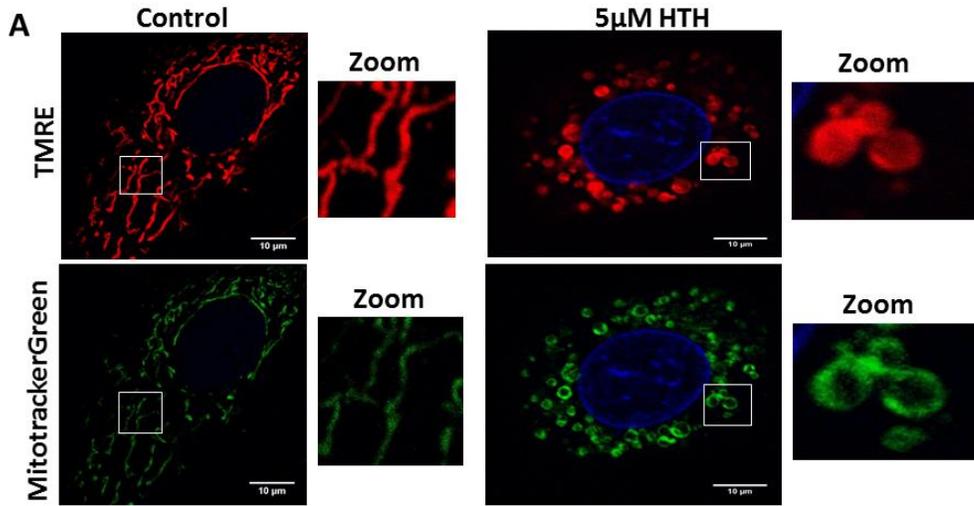
La mitocondria es un organelo que posee dos membranas, las cuales permiten la existencia de un espacio intermembrana que acumula un gradiente de protones generado gracias al constante funcionamiento de la cadena transportadora de electrones. Lo anterior permite la existencia de una diferencia de potencial entre la membrana externa y la membrana interna de la mitocondria. Los cambios en la función mitocondrial se reflejan en cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $mt\Delta\Psi$ ), los cuales son a su vez, proporcional a cambios en el gradiente de protones del espacio intermembrana. Por esta razón, para complementar nuestros hallazgos previos, evaluamos el efecto de NUA1 sobre el  $mt\Delta\Psi$ . Para lograr lo anterior, se utilizó la sonda fluorescente TMRE, la cual se acumula y fluoresce proporcional al potencial de membrana de la mitocondria, y la sonda mitotrackerGreen, que se acumula en la mitocondria de manera independiente de su potencial de membrana, por lo tanto, se utiliza como un marcador de biomasa mitocondrial. Ambos fluoróforos fueron observados a través de inmunofluorescencia *in vivo*, de acuerdo con lo descrito en la sección metodologías. La primera medición de potencial de membrana se realizó en células MCF-7 transfectadas para la expresión de FLAG-NUA1 citosólico. Como se aprecia en la **figura 14**, las células MCF-7 que sobreexpresan NUA1 citosólico mostraron menores niveles significativos ( $p < 0,05$ ) de fluorescencia asociada a TMRE, es decir presentaron menor  $mt\Delta\Psi$ . Este resultado se condice con el hecho de que bajo la expresión de NUA1 citosólico, la mitocondria es más funcional y, en consecuencia, utiliza y disminuye el gradiente de protones para la generación de ATP. No se observaron diferencias morfológicas mayores entre las mitocondrias de las células MCF-7 control y las células MCF-7 FLAG-NUA1 citosólico, ni tampoco cambios significativos en la biomasa mitocondrial ( $p < 0,05$ ) (**Figura 14**). Luego, evaluamos el efecto de la inhibición de NUA1 en el  $mt\Delta\Psi$ . Para ello, células MCF-7 fueron tratadas por 4 horas con 5 $\mu$ M de HTH-01-015

y se realizó la microscopia confocal. Se utilizó esta concentración debido que es la menor concentración a la cual se observaron los efectos funcionales de la inhibición de NUA1. Las células MCF-7 con NUA1 inhibido mostraron niveles de fluorescencia de TMRE significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que las células control (**Figura 15A-B**), lo cual fue consecuente con nuestros resultados previos que indicaban una menor actividad mitocondrial bajo la inhibición de NUA1. De manera interesante, observamos notorias diferencias morfológicas entre las mitocondrias de las células MCF-7 con pérdida de función de NUA1 y las células tratadas con el vehículo, puesto que las mitocondrias de estructura principalmente tubular, observadas en la célula control, cambiaron casi completamente a una estructura de mayor tamaño, redondeada y con un espacio en el interior, en las células con NUA1 inhibido (**Figura 15A**). Esta última estructura es llamada morfología de “donut” mitocondrial, por su semejanza con este dulce. Adicionalmente, para determinar que los cambios morfológicos observados fueran específicos de NUA1, y no un artefacto experimental producido por el uso de la droga inhibidora de NUA1, se realizó la microscopia confocal a células MCF-7 con silenciamiento de la expresión de NUA1. Las células MCF-7 con NUA1 silenciado aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles de fluorescencia de TMRE con respecto a las células control (**Figura 15D-E**). En cuanto a la morfología mitocondrial, las células MCF-7 con NUA1 silenciado presentaron principalmente estructuras de tipo redondeadas y, aunque en menor medida que en la condición de inhibición de NUA1, fue posible identificar algunas morfologías de “donut” mitocondrial (**Figura 15D**). Considerando los resultados anteriores, validamos que los cambios observados en el  $mt\Delta\Psi$  y la morfología mitocondrial corresponden a efectos dependientes de NUA1. Por último, analizamos los cambios en la biomasa mitocondrial inducidos por inhibición de función de NUA1. Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de biomasa mitocondrial entre los dos grupos de células analizados, donde las células tratadas con el inhibidor de NUA1 mostraron mayor biomasa mitocondrial (**Figura**

**15C**), contrario a que las células silenciadas para NUA1 mostraron menor biomasa mitocondrial (**Figura 15F**), con respecto a sus grupos controles. Para tratar de comprender lo anterior, evaluamos la expresión de proteínas mitocondriales dependiente de la expresión o actividad de NUA1. Observamos que la sobreexpresión de NUA1 no alteró la expresión de las proteínas mitocondriales ATP5A y ATP5B, ni de la subunidad 2 del complejo III de la cadena transportadora de electrones (UQCRC2) y tampoco de la subunidad B de la succinato deshidrogenasa (SDHB), componente del complejo II (**Figura 16A**). Por otro lado, la inhibición de NUA1 tampoco afectó a la expresión de las proteínas mitocondriales ATP5A, UQCRC2, SDHB, ni de la porina de membrana externa mitocondrial TOM20 (**Figura 16B**). Debido a que la inhibición de NUA1 mostró cambios drásticos en la morfología mitocondrial, evaluamos la expresión de proteínas asociadas a la dinámica mitocondrial. La inhibición de NUA1 no afectó a la expresión de la proteína involucrada en la fisión mitocondrial Drp1, ni de las proteínas involucradas en la fusión mitocondrial (OPA1 y Mfn2) (**Figura 16B**). Finalmente, evaluamos la expresión de proteínas mitocondriales en las células con el silenciamiento de NUA1. Contrario a lo observado bajo la inhibición de NUA1, el silenciamiento de NUA1 disminuyó la expresión de las proteínas ATP5A, ATP5B y UQCRC2, pero no afectó la expresión de la SDHB (**Figura 16C**). La diferencia de resultados en la biomasa mitocondrial y en la expresión de proteínas mitocondriales, en la condición de inhibición y silenciamiento de NUA1, fueron atribuidos a los distintos tiempos de evaluación, puesto que el efecto de la inhibición fue evaluada 4 horas posterior al tratamiento y el efecto del silenciamiento fue evaluado 24 horas después de la transfección celular.

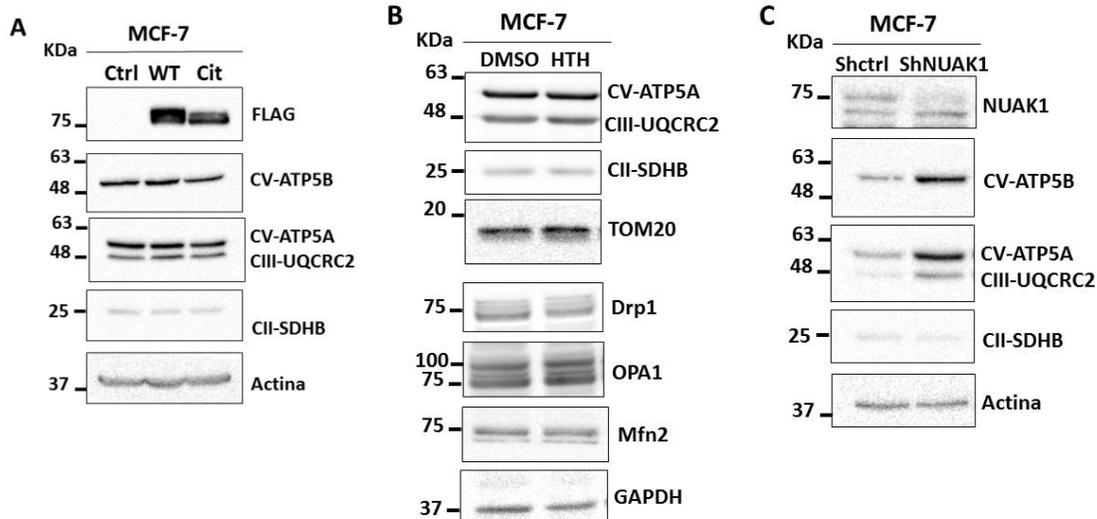


**Figura 14. NUAK1 citosólico disminuye el potencial de membrana mitocondrial.** Imágenes representativas de microscopia confocal de células MCF-7 transfectadas para la expresión de FLAG-NUAK1 citosólico (NUAK1Cit). Como control se utilizó el control vacío. La figura muestra mitocondrias marcadas con TMRE (rojo) y con MitotrackerGreen (verde). En azul se observan los núcleos celulares, marcados con Hoechst. Los gráficos de cajas muestran la fluorescencia total celular (CTCF) de la intensidad de fluorescencia de *MitotrackerGreen* y del TMRE normalizado con *MitotrackerGreen* (n=60). 630X más 4X zoom digital. Los datos fueron analizados utilizando prueba *t-student*, ns: no significativo, \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.



**Figura 15. La pérdida de función de NUAK1 aumenta el potencial de membrana mitocondrial y afecta a la morfología y biomasa mitocondrial.** Imágenes representativas de microscopia confocal de **(A)** células MCF-7 tratadas por 4 horas con 5 $\mu$ M de HTH-01-015 o con el vehículo y de **(B)** células MCF-7 transfectadas para la expresión de un ShRNA específico para NUAK1 (ShNUAK1) o con un ShRNA control (Shcontrol). La figura muestra mitocondrias marcadas con TMRE (rojo) y con MitotrackerGreen (verde). En azul se observan los núcleos celulares, marcados con Hoechst. Los gráficos de cajas muestran la fluorescencia total celular (CTCF) de la intensidad de fluorescencia de *MitotrackerGreen* y del TMRE normalizado con *MitotrackerGreen* (n=60). 630X más 4X zoom digital. Los datos fueron analizados utilizando prueba *t-student*, ns: no significativo, \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.



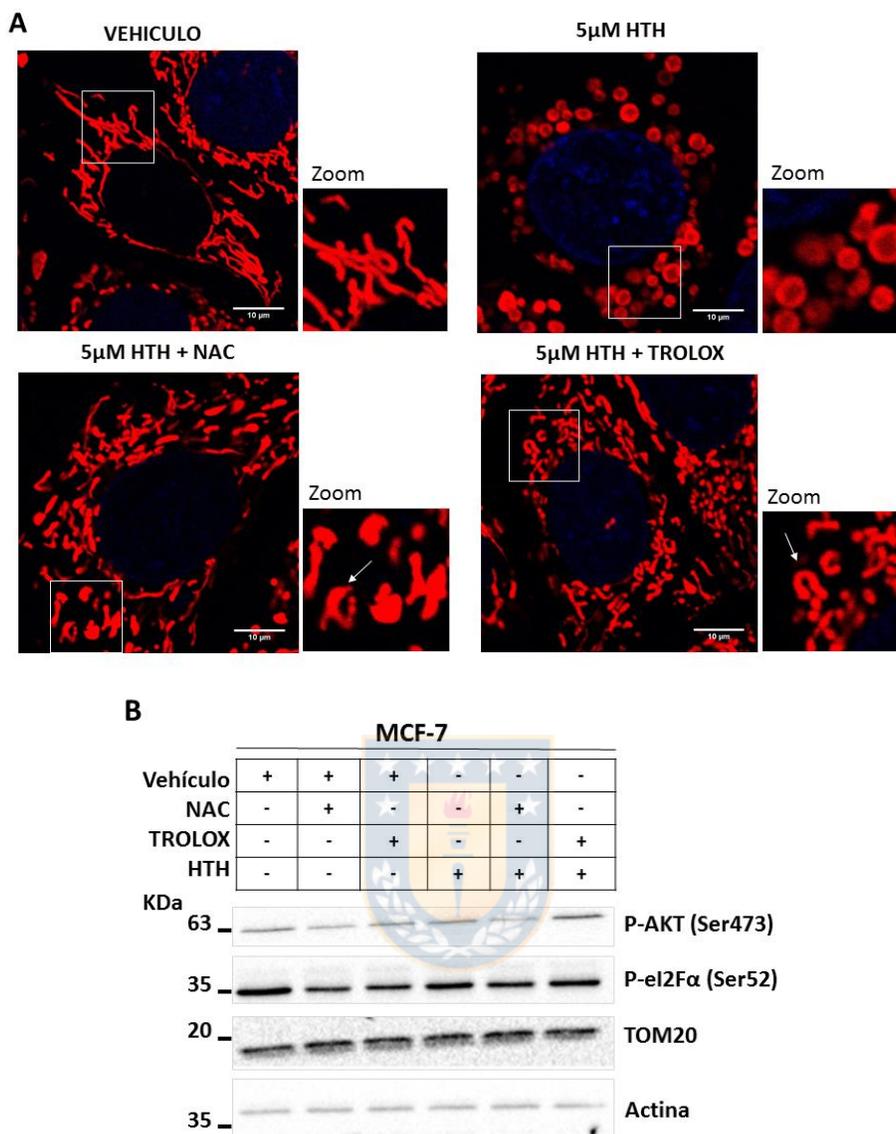


**Figura 16. Efecto de la alteración de la función de NUAK1 en la expresión de proteínas asociadas a la función mitocondrial. (A)** *Western Blot* de extractos de proteínas de células MCF-7 transfectadas con FLAG-NUAK1 WT (WT), con FLAG-NUAK1 citosólico (cit) y como control negativo se utilizó la expresión del vector pCMV-Flag (Ctrl). Se utilizó un anticuerpo específico para FLAG, ATP5B, ATP5A, UQCRC2, SDHB. Como control de carga se detectó actina. **(B)** *Western Blot* de extractos de proteínas de células MCF-7 tratadas por 4 horas con 5 $\mu$ M de HTH-01-015 o con el vehículo. Se utilizó un anticuerpo específico para ATP5A, UQCRC2, SDHB, TOM20, Drp1, OPA1, Mfn2. Como control de carga se detectó GAPDH. **(C)** *Western Blot* de extractos de proteínas de células MCF-7 transfectadas para la expresión de un ShRNA o Shcontrol. Se detectó NUAK1, ATP5B, ATP5A, UQCRC2, SDHB y como control de carga se utilizó actina. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.4. Los cambios en la morfología mitocondrial NUAK1 inducidos por NUAK1 involucran estrés oxidativo.

Se ha descrito que las estructuras de donuts mitocondrial se inducen luego de la inhibición química de la cadena transportada de electrones y que este proceso además involucra el incremento de estrés oxidativo en la célula [102]. Debido a lo anterior, evaluamos si el estrés oxidativo se encuentra involucrado en la formación de las estructuras de “donut” mitocondriales observadas luego de la inhibición de NUAK1. Para lograr lo

anterior, se evaluó el efecto del tratamiento con antioxidantes sobre la morfología mitocondrial en las células MCF-7 tratadas con el inhibidor de NUA1. Las células MCF-7 co-tratadas con el inhibidor de NUA1 y con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) o el antioxidante TROLOX, redujeron las estructuras de “donut” mitocondrial, en comparación a las células tratadas sólo con el inhibidor de NUA1 (**Figura 17A**). Aunque las células tratadas con los antioxidantes disminuyeron la cantidad de estructuras de donuts, mantuvieron mitocondrias de morfología de tipo fragmentada y punteada. De manera interesante, algunas de las estructuras observadas en las células tratadas con los antioxidantes coinciden con los estados intermedios propuestos en el proceso de formación de una estructura de donut (**Figura 17A**). Como control del tratamiento con antioxidantes detectamos p-AKT y p-eI2F $\alpha$ , marcadores comúnmente usados para evaluar el estado del estrés oxidativo celular (**Figura 17B**). Observamos que las células MCF-7 basalmente poseen alta actividad de ambas vías y que los tratamientos con antioxidantes parcialmente atenuaron este efecto (**Figura 17B**). Es decir, nuestros resultados plantean que la aparición de las estructuras de donuts mitocondrial, luego de la inhibición de NUA1, dependen parcialmente del aumento del estrés oxidativo celular, por lo que, sumado a nuestros resultados anteriores, sugerimos que NUA1 además podría estar cumpliendo un rol antioxidante en las células MCF-7.



**Figura 17. La formación de la estructura de *donuts* mitocondrial dependiente de NUA1 involucra estrés oxidativo. (A)** Imágenes representativas de microscopia confocal de células MCF-7. Las células sometidas al tratamiento con antioxidante fueron pre-incubadas 1 horas con 1mM NAC o con 500 µM TROLOX, y luego tratadas por 4 horas con 5µM de HTH-01-015 más NAC o más TROLOX, respectivamente. Las mitocondrias fueron marcadas con TMRE (rojo). Las flechas indican la morfología intermedia de las estructuras de *donuts* mitocondrial (n=30). Aumento 630X más 4X zoom digital. **(B)** *Western Blot* de células MCF-7 tratadas por 4 horas con 5µM de HTH-01-015, 1mM NAC, 500 µM TROLOX o con el vehículo como se indica en la imagen. Las células tratadas con antioxidantes fueron pre-incubadas 1 hora con estos, antes de proceder al tratamiento. Como control de carga se detectó TOM20 y Actina. Fuente: Elaboración propia.

#### **4.2.5. Resumen de la ejecución del objetivo 2 de este trabajo: NUAK1 participa de la regulación de la función mitocondrial.**

Los resultados obtenidos de la resolución de este objetivo específico muestran que NUAK1 citosólico mantiene y aumenta la capacidad máxima de la cadena respiratoria, la cual es una propiedad necesaria para permitirle a la célula abordar condiciones de elevada demanda energética. Además, la sobreexpresión de NUAK1 incrementó la respiración asociada a la producción de ATP, sugiriendo que el aumento de ATP debido al aumento de la función citosólica de NUAK1, involucra regulación de la producción de ATP mitocondrial. Nuestros experimentos también muestran interacción entre NUAK1 y la ATP5A, aunque sugerimos que esta interacción es lábil o indirecta. Por otro lado, encontramos que NUAK1 afecta de manera inversa el  $mt\Delta\Psi$ , es decir, la sobreexpresión de NUAK1 disminuye el  $mt\Delta\Psi$  y mientras que la pérdida de función de NUAK1 aumenta el  $mt\Delta\Psi$ . Destacando que lo anterior es consecuente con nuestros resultados obtenidos que muestran que la expresión de NUAK1 incrementa la función mitocondrial, y viceversa. Adicionalmente, encontramos que la actividad y expresión de NUAK1 son fundamentales para mantener el balance en la biomasa mitocondrial, como también mantener la morfología mitocondrial, evitando la formación de estructuras tipo *donuts* mitocondriales. Este último proceso involucra la disminución del estrés oxidativo celular. Finalmente, nuestros datos sugieren que NUAK1 podría estar involucrado en la regulación de la expresión de algunas proteínas mitocondriales, como la ATP5A, ATP5B y la UQCRC2.

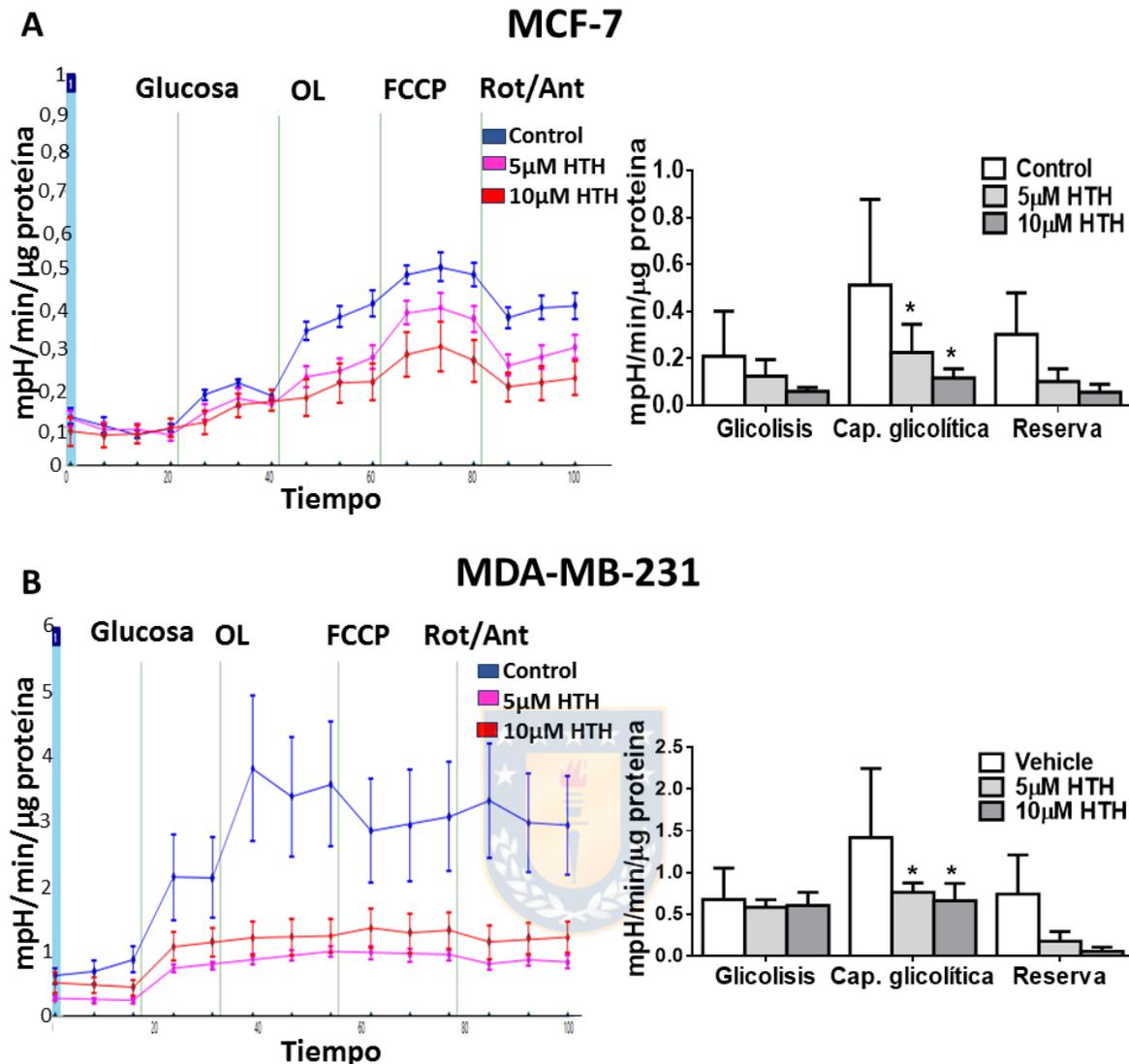
#### **4.3. Objetivo 3: Determinar la relación de NUAK1 y su localización celular con la glicólisis.**

Como se describe en la introducción de este trabajo, las células de cáncer habitualmente mantienen balanceado su metabolismo entre la glicólisis y el metabolismo mitocondrial. Debido a que NUAK1 citosólico promueve el metabolismo oxidativo,

evaluamos cuál sería su efecto sobre la glicólisis. Para la evaluación de la glicólisis, se utilizó la cuantificación en tiempo real de la acidificación del medio extracelular, proporcional a la liberación de lactato. Con estas medidas, se calcularon 3 parámetros glicolíticos: **la glicólisis basal** de la célula, la cual representa la capacidad de la célula de convertir glucosa a lactato en presencia de un exceso de glucosa, **la capacidad glicolítica**, la cual corresponde al máximo uso de la glicólisis luego de inhibir la fosforilación oxidativa y **la capacidad glicolítica de reserva**, la cual es una medida de la capacidad de la célula de responder ante una elevada demanda energética utilizando la glicólisis. También evaluamos la glicólisis a través de la cuantificación por método enzimático de lactato extracelular. La descripción detallada de estos procedimientos se encuentra en la sección metodologías.

#### 4.3.1. NUA1 citosólico promueve la capacidad glicolítica celular.

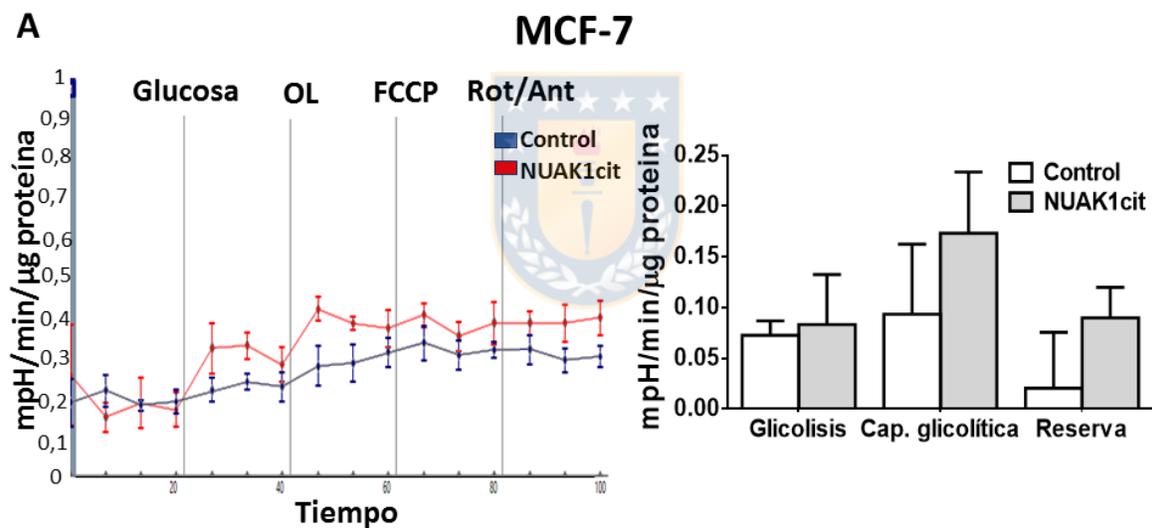
Para estudiar el rol de NUA1 citosólico sobre la glicólisis, evaluamos el efecto de la inhibición de NUA1 sobre los parámetros glicolíticos en células MCF-7 y en células MDA-MD-231. Ambas líneas celulares disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) su capacidad glicolítica luego de la inhibición por 4 horas con 5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de HTH-01-015 (**Figura 18A-B**), pero no afectaron significativamente ( $p > 0,05$ ) sus otros parámetros glicolíticos (**Figura 18A-B**). Estos resultados sugieren que la función de NUA1 citosólico es necesaria para la mantención de la capacidad glicolítica celular, es decir, para la mantención funcional de la ruta glicolítica que le podría permitir a la célula responder ante una alta demanda energética celular. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 18. NUAK1 es necesario para mantener la capacidad glicolítica celular.** Evaluación de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en células MCF-7 **(A)**, MDA-MB-231 **(B)** luego de 4 horas de tratamiento con 5 $\mu$ M o 10 $\mu$ M de HTH-01-0. Las células MCF-7 fueron tratadas secuencialmente con glucosa 5,5 mM, oligomicina A 1,2  $\mu$ M, FCCP 0,5  $\mu$ M y Rotenona/antimicina A 2  $\mu$ M y las células MDA-MB-231 con 5,5 mM de glucosa, 1  $\mu$ M de oligomicina A, 1  $\mu$ M de FCCP, 1  $\mu$ M de rotenona/antimicina A. El ECAR fue normalizado con respecto a la concentración de proteínas. El gráfico de barras muestra los parámetros glicolíticos. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n=3$  y se realizaron en tres réplicas independientes. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.3.2. NUAK1, en su localización nuclear, promueve y es necesario para la glicólisis, bajo la condición de inhibición mitocondrial.

Nuestros resultados anteriores muestran que NUAK1 citosólico es necesario para mantener la capacidad glicolítica de la célula, entonces, para complementar lo anterior evaluamos los parámetros metabólicos glicolíticos en células MCF-7 transfectadas para la expresión de NUAK1 citosólico. Aunque se observó un incremento de la capacidad glicolítica entre las células control y las células que expresaban NUAK1 citosólico, esta diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 19). Tampoco se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los otros parámetros glicolíticos (Figura 19). Fuente: Elaboración propia.



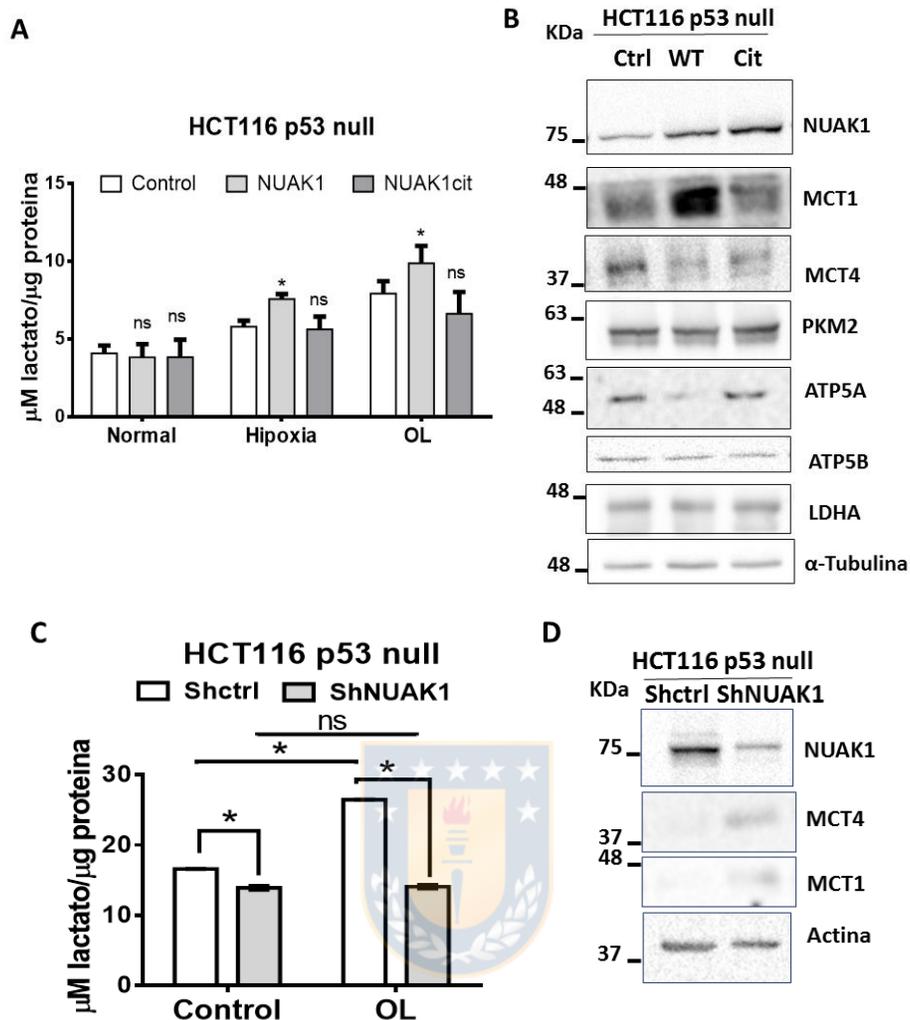
**Figura 19. La expresión de NUAK1 citosólico no afecta a la capacidad glicolítica celular.** Evaluación del ECAR en células MCF-7 luego de 24 horas de transfección con FLAG-NUAK1 citosólico (NUAK1cit) y el vector vacío (Control). Las células MCF-7 fueron tratadas secuencialmente con glucosa 5,5 mM, oligomicina A 1,2  $\mu$ M, FCCP 0,5  $\mu$ M y Rotenona/antimicina A 2  $\mu$ M. El ECAR fue normalizado con respecto a la concentración de proteínas. El gráfico de barras muestra los parámetros glicolíticos. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar (DS), ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Cada experimento fue realizado con un  $n = 3$  y se realizaron en tres réplicas independientes. Fuente: Elaboración propia.

Luego, para complementar las evaluaciones anteriores, se evaluó la glicólisis en células HCT116 p53 null, donde NUAK1 se encuentra principalmente nuclear (**Figura A1**). Las células HCT116 p53 null fueron transfectadas para la expresión FLAG-NUAK1 WT y para FLAG-NUAK1 citosólico y se procedió a evaluar la glicólisis. En condiciones basales, NUAK1 WT y NUAK1 citosólico no afectaron significativamente ( $p > 0,05$ ) los niveles de lactato extracelular (**Figura 20A**), concordante con nuestro resultado en células MCF-7 donde la sobreexpresión de NUAK1 no incrementa la glicólisis basal. A continuación, para estudiar la función de NUAK1 en la capacidad glicolítica, las células HCT116 p53 null transfectadas para la expresión de NUAK1 WT y NUAK1 citosólico fueron sometidas a inhibición mitocondrial por hipoxia o por tratamiento con oligomicina A. Observamos que, bajo ambas condiciones de inhibición de la función mitocondrial, NUAK1 citosólico no incrementa significativamente ( $p > 0,05$ ) la producción de lactato (**Figura 20A**), consecuente con nuestro previo hallazgo en células MCF-7, en las cuales NUAK1 citosólico no afectó a la capacidad glicolítica. No obstante, el lactato fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en las células HCT116 p53 null que sobreexpresaron NUAK1 WT (**Figura 20A**), proponiendo que la localización nuclear de NUAK1 participa de la regulación de la glicólisis, bajo la condición de inhibición mitocondrial. Para validar el efecto de NUAK1 nuclear en la glicólisis, lo siguiente que realizamos fue la evaluación de la producción de lactato en células HCT116

p53 null silenciadas para NUA1. Las células silenciadas para NUA1 disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) su lactato extracelular con respecto al grupo control (**Figura 20C**) y fueron incapaces de incrementar su producción de lactato, luego de la inhibición mitocondrial con oligomicina (**figura 20C**), es decir, NUA1 nuclear permite a la célula realizar el switch de fosforilación oxidativa hacia glicólisis.

#### **4.3.3. NUA1 en su localización nuclear afecta a la expresión de proteínas de la glicólisis.**

Nuestros resultados anteriores, sugieren que NUA1 nuclear tiene un rol en la regulación de la glicólisis. Para mayor comprensión de esta función de NUA1, evaluamos el efecto de NUA1 nuclear sobre la expresión de algunas proteínas de las glicólisis en células HCT116 p53 null, bajo la condición de inhibición mitocondrial. Detectamos que la sobreexpresión de NUA1 nuclear disminuye la expresión de la subunidad de la ATP sintasa, ATP5A, consecuente con una célula más glicolítica, y que también afecta a la expresión de los transportadores de monocarboxilato, MCT1 y MCT4 (**Figura 20**). Estos últimos son los responsables de transportar el lactato a través de la membrana celular, donde el transportador MCT1 se encarga de importar lactato a la célula y el transportador MCT4 de exportar el lactato de la célula. La sobreexpresión de NUA1 nuclear incrementó la expresión de MCT1 y disminuyó la expresión de MCT4. NUA1 nuclear no afectó a la expresión de la proteína piruvato quinasa (PKM2), lactato deshidrogenasa (LDHA), ni a la subunidad de la ATP sintasa ATP5B (**Figura 20B**). Por último, evaluamos el efecto del silenciamiento de NUA1 en células HCT116 p53 null sobre los transportadores MCTs. Observamos, tanto en condición basal como en condición de inhibición mitocondrial, que el silenciamiento de NUA1 nuclear aumentó la expresión de los transportadores MCT1 y MCT4 (**Figura 20D**).



**Figura 20. NUA1 nuclear incrementa la glicolisis y afecta a la expresión de los transportadores de monocarboxilato, bajo condiciones de inhibición mitocondrial.**

**(A)** Cuantificación de lactato extracelular de células HCT116 p53 null expresando NUA1 WT, NUA1 citosólico (NUAK1cit) y su respectivo control, incubadas 24 horas bajo condición normal, hipoxia o con 1ug/ml de oligomicina A. **(B)** *Western blot* de las células de la gráfica anterior incubadas con oligomicina. **(C)** Cuantificación de lactato extracelular de células HCT116 p53 null silenciadas para NUA1 y su control. Las células fueron incubadas 24 horas bajo condición normal o con 1ug/ml de oligomicina A. **(D)** *Western blot* de las células de la gráfica anterior incubadas bajo la condición normal. Los gráficos de lactato fueron normalizados con respecto a la concentración de proteínas, y corresponden a un gráfico representativo de tres réplicas independientes (n=3). Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una cola, las barras de error representan la desviación estándar, ns es no significativo y \*  $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

#### **4.3.4. Resumen de la ejecución del objetivo 3 de este trabajo: NUA1 participa de la regulación de la glicólisis.**

Este objetivo nos permitió presentar evidencia de que NUA1 está involucrado en la regulación de la glicólisis. Específicamente, nuestros hallazgos muestran que bajo la carencia de función mitocondrial, NUA1 en su localización citosólica es necesaria para conservar la capacidad máxima glicolítica, sin embargo, NUA1 en su localización nuclear es necesario para que la célula mantenga su tasa glicolítica normal, y que esta función queda evidenciada ante la carencia de actividad mitocondrial, más aun, NUA1 en el núcleo es fundamental para que la célula pueda realizar el switch glicolítico ante la ausencia de función mitocondrial. Recordando nuestra previa observación en el objetivo 1, en el cual la célula con NUA1 inhibido, ante la ausencia de función mitocondrial, no puede mantener sus niveles de ATP, sugiere que la participación de NUA1 en la glicólisis tiene efectos en la bioenergética celular. Finalmente, encontramos que NUA1 en su localización nuclear afectó a la expresión de los transportadores de lactato MCT1 y MCT4, sin embargo, los cambios en la expresión de estos transportadores no fueron concordantes con la función glicolítica de NUA1 nuclear, por lo que sugerimos que estos cambios observados corresponderían más bien a mecanismos compensatorios de la célula dispuestos para regular el desbalance glicolítico generado por las perturbaciones en la expresión de NUA1.

## 5. Discusión

La regulación del metabolismo del cáncer es fundamental para el desarrollo y avance de la enfermedad. La célula de cáncer debe mantener balanceado el uso de energía, la biosíntesis de macromoléculas y el correcto estado redox. Cada vez hay mayor evidencia de que el metabolismo del tumor es complejo, dinámico, heterogéneo, y que de esta forma, permite a la célula de cáncer mantener los procesos celulares de alta demanda energética, como por ejemplo la elevada proliferación celular, y de esta manera permitir a las células tumorales la adaptación y supervivencia a las condiciones micro ambientales adversas que surgen debido al crecimiento tumoral y la ausencia de una completa vascularización [13, 103].

### 5.1. NUAK1 y la bioenergética celular

NUAK1 es una quinasa sobreexpresada en varios tipos de cáncer [66-73], cuya expresión ha sido asociada con la promoción de varios procesos oncogénicos, como la migración [76], la invasión [83], la metástasis [83, 96], la proliferación [73, 88], la supervivencia [56] y el balance del estado oxidativo celular [56]. En este trabajo, encontramos que NUAK1 se encuentra asociado a algunos procesos metabólicos, dependiendo de su distribución celular. Se ha descrito que NUAK1 presenta localización citosólica (NUAK1<sub>cit</sub>) y nuclear en células de cáncer [78], la cual se discute, puede depender del contexto genético de la célula de cáncer, como mutaciones asociadas a la pérdida de función de las proteínas involucradas en su importe nuclear, o también del estado oxidativo celular [78]. En nuestro trabajo presentamos evidencia de que NUAK1 en su localización citosólica participa de la regulación de la producción de ATP mitocondrial, debido a que su expresión se asocia con un aumento en el nivel de ATP celular, incrementa la respiración mitocondrial asociada a la producción de ATP, simultáneamente disminuye el  $\Delta\psi_m$  y mantiene una morfología tubular mitocondrial asociada a mitocondrias de alta

actividad [104]. El ATP en la mitocondria es producido a través del proceso de fosforilación oxidativa, en el cual, el complejo ATP sintasa utiliza la fuerza protón-motriz del espacio intermembrana mitocondrial para catalizar la reacción de síntesis de ATP, a partir de ADP y pirofosfato inorgánico [41]. El complejo ATP sintasa está formado por 16 subunidades, codificadas a nivel nuclear, que estructuran dos segmentos definidos por su polaridad: un segmento hidrofóbico integrado a la membrana, llamado  $F_0$  y un segmento hidrofílico, llamado  $F_1$ . A su vez, el segmento  $F_1$  está formada por 3 copias de la subunidad alfa, 3 copias de la subunidad beta y las subunidades gamma, delta, épsilon, OSPL y la proteína inhibitoria  $IF_1$  [105]. Las subunidades catalíticas corresponden a las subunidades alfa (ATP5A) y las subunidades beta (ATP5B), las cuales se ordenan de manera intercalada mirando hacia el lumen de la matriz mitocondrial [105]. La ATP sintasa es regulada por múltiples mecanismos incluyendo modificaciones post-traduccionales [106]. La idea de que las quinasas realicen procesos regulatorios en proteínas mitocondriales no es nueva, existe evidencia de estudios de espectrometría de masa que muchas proteínas mitocondriales se encuentran fosforiladas, entre ellas, la subunidad ATP5A [107]. Nuestra predicción bioinformática mostró que algunos de estos sitios de fosforilación en la subunidad ATP5A podrían ser fosforilados por NUAK1. Aunque nuestros ensayos deben ser complementados, mostramos evidencia de que NUAK1 en el citosol podría interactúa con la subunidad ATP5A, sugiriendo que de esta manera podría regular el incremento de ATP mitocondrial. En concordancia con esta posibilidad, la inhibición parcial de la ATP5A también tiene como consecuencias el aumento del  $\Delta\psi_m$  y del ROS [108], de manera similar al fenotipo observado bajo la inhibición o silenciamiento de NUAK1 [56]. Sin embargo, el silenciamiento de la ATP5A no afecta a la composición de otras proteínas de la fosforilación oxidativa, con excepción de la ATP5B [108], en oposición a nuestro resultado, que muestra que frente al silenciamiento de NUAK1 observamos un aumento de expresión de la ATP5A y ATP5B,

aunque no podemos descartar que esto pudiese ser consecuencia de un efecto compensatorio debido a alteraciones funcionales en estas subunidades.

A diferencia de lo observado con la sobreexpresión de NUAK1, la inhibición de la actividad quinasa de NUAK1 no afectó a los niveles celulares de ATP, en concordancia con la ausencia de efecto sobre la respiración mitocondrial asociada a la producción de ATP. Además, lo anterior es consecuente con los antecedentes bibliográficos que muestran que, ante perturbaciones en la función mitocondrial, la célula de cáncer mantiene balanceado el ATP aumentando la función glicolítica [101]. No obstante, bajo la condición de inhibición farmacológica de la función mitocondrial, las células con carencia en la función de NUAK1 no fueron capaces de mantener sus niveles de ATP balanceados. Este resultado nos reveló que la función de NUAK1 también está asociada a la mantención del ATP glicolítico, y pone en discusión nuestra presunción anterior que la célula con NUAK1 inhibido (bajo condición normal) mantiene el ATP celular debido al aumento de la glicólisis, y más bien, plantea la posibilidad de que bajo la inhibición aguda de NUAK1 no se afecta a la producción de ATP mitocondrial, por ejemplo, debido a la existencia de otros mecanismos, complementarios a la función de NUAK1, que actúan sobre el balance de energía [109]. En resumen, la sobreexpresión de NUAK1 induce un aumento de la producción del ATP mitocondrial, posiblemente a través de la regulación de la ATP sintasa, y, por otro lado, en contexto de disminución de función mitocondrial, NUAK1 también está involucrado en la mantención del ATP celular proveniente de la glicólisis. En la célula de cáncer, la primera fuente de ATP es la glicólisis y la segunda la fosforilación oxidativa, aunque esta última define la susceptibilidad de la célula a la apoptosis [110]. Es conocido que NUAK1 promueve la proliferación y favorece la viabilidad celular [90, 91], por lo que el rol de NUAK1 en la bioenergética celular podría ser otra ruta por la cual NUAK1 podría favorecer la elevada tasa proliferativa y la viabilidad celular [56, 73, 88]. Además, el hecho de que NUAK1 se

relacione con la producción de ATP mitocondrial, plantea que NUAK1 podría estar involucrado en otras rutas metabólicas, además de la de carbohidratos, dependiendo de la biodisponibilidad de sustratos, como el metabolismo del lactato, de aminoácidos o la beta oxidación de ácidos grasos [111].

## **5.2. NUAK1 y la glicólisis**

En el desarrollo de este trabajo encontramos que, bajo la condición de inhibición mitocondrial, la función de NUAK1 citosólico se asocia a la mantención de la capacidad glicolítica de la célula, mientras que su función en su localización nuclear mostró ser necesaria para que la célula realice el switch glicolítico e incremente su producción de lactato extracelular. Debemos destacar que, aunque esto parece contradictorio con los antecedentes anteriormente publicados que mostraban a NUAK1 participando de la supresión de la captura de glucosa en el músculo esquelético, a través de un mecanismo de regulación negativa dependiente de insulina y del almacenamiento de glucógeno [74], nuestros hallazgos proponen que NUAK1 promueve la glicólisis y la bioenergética glicolítica en un contexto de switch glicolítico. La presencia del lactato en el tumor es un indicador de metástasis y de baja esperanza de vida para los pacientes [112], posiblemente debido a que la acidificación del microambiente tumoral puede promover procesos oncogénicos como la invasión celular [38], respuestas inmunes pro-cancerosas [39] y la vascularización del tumor [37]. Es decir, la mantención del lactato extracelular, dependiente de la función de NUAK1, podría representar una forma integral de como NUAK1 participa en la progresión tumoral. Estudios más profundos podrían ayudar a confirmar la implicancia de la función glicolítica de NUAK1 en el desarrollo y malignidad del cáncer.

### **5.3. NUAK1 y las capacidades metabólicas de la célula.**

Como ya hemos mencionado, estudios describen dos principales fenotipos metabólicos anormales en cáncer, las células glicolíticas, caracterizadas por su alta tasa glicolítica y reducción de la biomasa mitocondrial [16] [17], y las células oxidativas las cuales tienen un metabolismo anabólico alto debido a su constante biosíntesis de proteínas y nucleótidos y muestran una alta actividad mitocondrial [17]. Nuestros resultados muestran que la inhibición de NUAK1 citosólico disminuye tanto la máxima tasa respiratoria, como también, la máxima tasa glicolítica, y viceversa, es decir la sobreexpresión de NUAK1cit incrementa la máxima tasa respiratoria y, aunque no de manera estadísticamente significativa, la expresión de NUAK1cit también incrementa la máxima tasa glicolítica, sugiriendo que la función de NUAK1 está relacionada a la regulación de ambos fenotipos metabólicos y que por esta razón, podría afectar el estado o la adaptación metabólica del tumor durante la progresión del cáncer. En cuanto a las células oxidativas, estas se caracterizan por incrementar tanto la función como la biomasa mitocondrial. No obstante, en nuestro estudio evidenció que sólo la inhibición, pero no la sobreexpresión de NUAK1, generó cambios en la biomasa mitocondrial. Cabe destacar que el efecto de la sobreexpresión sostenida de NUAK1, común en muchos tipos de cáncer, sobre la biomasa mitocondrial no fue evaluada. El fenotipo tumoral oxidativo ha sido descrito como el más agresivo y resistente a terapias anti-cáncer [23, 24], mientras que los cánceres de tipo glicolítico presentan alta resistencia a múltiples drogas [113]. Es decir, la promoción de un eficiente fenotipo intratumoral oxidativo y glicolítico podría estar correlacionado a la agresividad de los canceres asociados a NUAK1 [83, 96].

Las máximas tasas metabólicas representan una elevada capacidad metabólica de la célula, lo cual significa que la célula podrá producir más ATP y responder de mejor manera ante una situación de estrés (como estrés oxidativo o hipoxia), o de una aguda

demanda energética. Previamente, en células HEPG2 se relacionó la disminución de NUAK1 con una pronunciada disminución de la tolerancia a la inanición de glucosa, bajo la condición de hipoxia [84], aunque los autores de este trabajo no establecen un mecanismo, este resultado es consecuente con los nuestros. Es decir, la sobreexpresión de NUAK1 podría mantener a las células del cáncer metabólicamente preparadas para enfrentar las condiciones energéticas adversas presentes en el microambiente tumoral. El incremento de las capacidades metabólicas celulares es una consecuencia del aumento en la expresión de enzimas metabólicas, de la expresión de isoformas con mayores eficiencias catalíticas o de la aparición de modificaciones post-traduccionales que incrementan su actividad [30, 33]. En el caso de la glicólisis, adicionalmente, encontramos que la localización nuclear de NUAK1 es necesaria para que la célula realice el switch glicolítico, lo que sugiere que NUAK1 podría participar de la modulación de la glicólisis regulando procesos transcripcionales. Además, la expresión de NUAK1 en su localización nuclear incrementa la expresión del transportador MCT1, uno de los 4 puntos clave para incrementar el flujo glicolítico [33]. Mayores estudios deberán realizarse para esclarecer los mecanismos moleculares por los cuales NUAK1 localizado en el citosol aumenta las capacidad metabólicas y NUAK1 localizado en el núcleo promueve la glicólisis. Finalmente, las funciones metabólicas de NUAK1 podrían estar asociadas a sus funciones en procesos no-metabólicos, puesto que, por ejemplo, para realizar el proceso de invasión y metástasis algunas células de cáncer incrementan el número y la actividad mitocondrial [19], mientras que otras incrementan su tasa glicolítica [20] [17]. Además, el efecto de NUAK1 sobre la morfología mitocondrial se podría correlacionar con su función anti-apoptótica, puesto que morfologías mitocondriales elongadas, como las encontradas bajo la expresión de NUAK1<sup>cit</sup> se asocia a células resistentes a apoptosis [104].

#### 5.4. NUAK1 y el ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos continuos derivados del metabolismo aeróbico, por lo que las mitocondrias son la principal fuente de ROS en la célula [114]. La reprogramación metabólica realizada por las células de cáncer no solo afecta a la bioenergética y al metabolismo anabólico de la célula, sino que también tiene consecuencias en el estado redox. Las mutaciones en las enzimas mitocondriales llevan como consecuencia la aparición de disfunciones en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, lo cual incrementa la producción de ROS mitocondrial (ROSmt) [115]. Como ya se mencionó anteriormente, el preciso y balanceado estrés oxidativo promueve varios procesos tumorigénicos, como la inestabilidad genética, proliferación y resistencia a quimioterapias [56, 114]. Las mitocondrias son organelos dinámicos, en las cuales su morfología y distribución celular pueden reflejar el estado de la célula, así como también la presencia de perturbaciones, como el exceso de ROS [42]. En este trabajo, describimos que la disminución de la función de NUAK1 genera alteraciones en la morfología mitocondrial y específicamente induce la formación de estructuras mitocondriales con forma de anillo, conocidas como estructura tipo “donut” [102, 116]. La morfología de donut mitocondrial ha sido reportada frente a la inhibición de la cadena transportadora de electrones y en condición de desacople farmacológico mitocondrial [102, 116], procesos que involucran una elevada captura de calcio mitocondrial y un incremento en el ROSmt [102, 116]. El rol del ROSmt en la formación de la estructura de donuts mitocondrial ha sido sugerido debido a que el tratamiento con antioxidantes ayuda a atenuar la formación de estas estructuras inducidas por los inhibidores mitocondriales [102]. De manera similar a lo anterior, en nuestros resultados encontramos que frente a la perturbación de la morfología mitocondrial inducida por la carencia funcional de NUAK1, el tratamiento con antioxidantes también ayudó a disminuir la aparición de estas morfologías, sugiriendo que la influencia de NUAK1 sobre la mantención de la morfología mitocondrial involucra la mantención del

estrés oxidativo, y simultáneamente plantea la posibilidad de que NUAK1 participe de la mantención del correcto funcionamiento en los complejos mitocondriales asociados a la fosforilación oxidativa. Reportes anteriores han propuesto a NUAK1 como un facilitador clave de la respuesta antioxidante adaptativa en el cáncer de colon [56], donde este juega un papel protector contra el elevado estrés oxidativo, promoviendo la viabilidad celular. Además, frente a un incremento de estrés oxidativo NUAK1 es retenido en su localización citosólica [78], incluso en células en las cuales presenta preferencia en localización nuclear, lo cual podría facilitar su participación en la modulación de la función y morfología mitocondrial. Controversialmente, nuestros resultados mostraron que la aparición de la morfología de donut mitocondrial fue asociada a un incremento del  $mt\Delta\Psi$ , contrario a la caracterización publicada donde se reportó una disminución en el  $mt\Delta\Psi$  asociado a estas estructuras [116]. Como la morfología mitocondrial (fisión y fusión mitocondrial) y el potencial de membrana pueden ser procesos regulados de manera independientes, proponen que NUAK1 pudiese actuar río arriba o de manera parcial en la regulación de la morfología mitocondrial. La morfología de donuts mitocondrial ha sido asociada a la disminución en la transmisión sináptica con consecuencias cognitivas en la memoria [117], pero su rol en cáncer nunca ha sido estudiado.

Las células de cáncer para mantener el estrés oxidativo balanceado expresan enzimas con funciones antioxidantes, encargadas de prevenir la excesiva acumulación de ROS [115]. Adicionalmente, la regulación del ROS también depende del control intracelular de la razón NADPH/NADP<sup>+</sup>. El NADPH es producido por la desviación del metabolismo de la glucosa hacia la ruta de las pentosas [118, 119]. La ruta de las pentosas puede terminar con la producción de azúcares de 5 carbonos para la biosíntesis de nucleótidos, o sus subproductos fructosa-6-fosfato y G3P, pueden ser redirigidos nuevamente hacia la glicólisis, permitiendo la obtención de energía, NADPH y los productos finales piruvato o

lactato [118, 119]. Datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que NUA1 disminuye la actividad de la enzima fosfofructoquinasa e incrementa los niveles de NADPH celular, sugiriendo que NUA1 participa de la regulación e inicio de la ruta de las pentosas [120]. Basados en nuestros resultados de que NUA1 citosólico mantiene la capacidad glicolítica de la célula y que NUA1 nuclear incrementa el lactato extracelular, se sugiere que el rol de NUA1 en la glicólisis podría ser más complejo, e involucrar regulaciones de la ruta de las pentosas y el balance del ROS. Además, el NADPH también puede ser producido en la mitocondria por una transhidrogenasa, utilizando el gradiente de protones del espacio intermembrana [41], por lo que para lograr comprender el rol antioxidante de NUA1 y su participación en la producción de NADPH, mayores estudios deben ser realizados.

### **5.5. La relación de NUA1 con el oncogén c-Myc.**

El oncogén c-Myc, se encuentra desregulado en una amplia variedad de cáncer, es un factor transcripcional que regula un conjunto de genes pleiotrópicos, incluyendo genes relacionados al metabolismo celular [121]. Los blancos de Myc promueven y regulan la glicólisis, así como también la fosforilación oxidativa, la glutaminólisis y el metabolismo de los ácidos grasos, aunque la modulación de los procesos anteriores dependerá del contexto genético asociado y al tipo de cáncer. Por ejemplo, en carcinoma hepatocelular, los tumores con Myc desregulado, presentan una mayor absorción de glucosa y catabolismo hacia el lactato, pero también un aumentado catabolismo de glutamina, utilizado para satisfacer las necesidades bioenergéticas de la célula y suministrar intermediarios metabólicos para la promoción del crecimiento del tumor. Por otro lado, las células de cáncer de pulmón con Myc sobreexpresado, sólo presentan un elevado catabolismo de glucosa, pero no de glutamina [122]. Liu y colaboradores mostraron que células de hepatocarcinoma con Myc

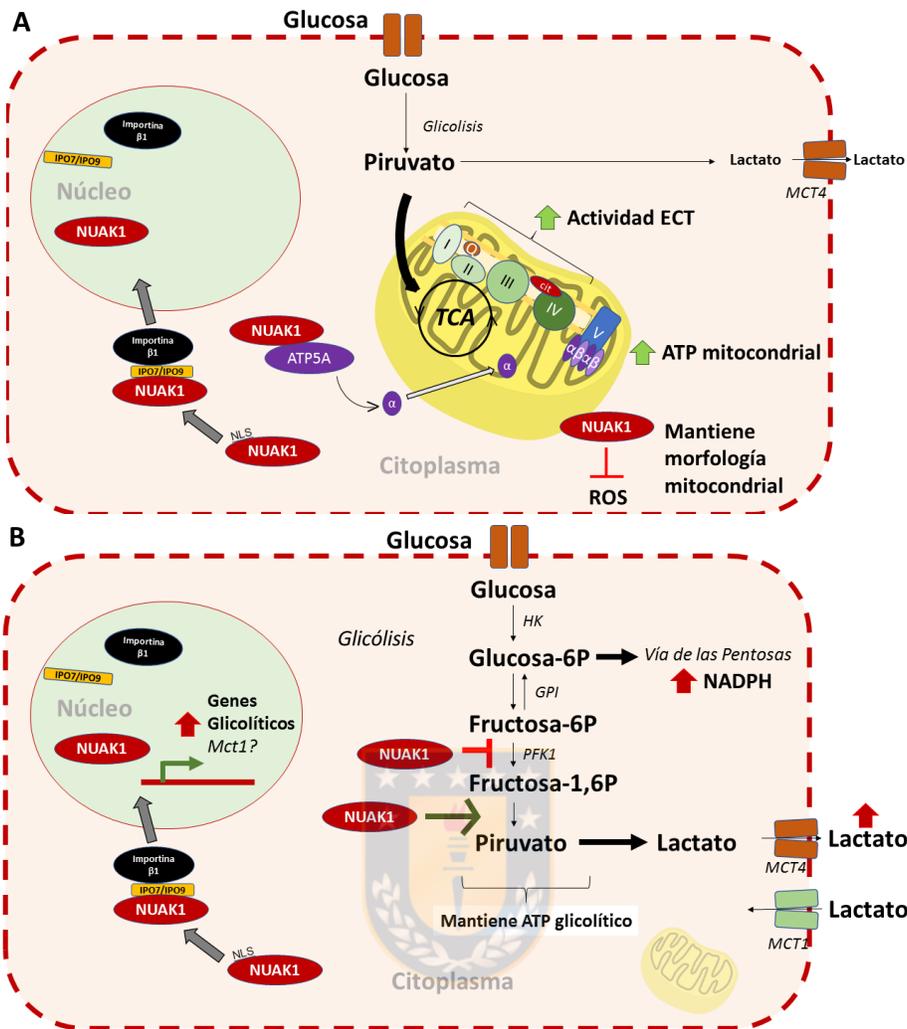
sobreexpresado, pero con NUA1 silenciado, fueron incapaces de conservar sus procesos metabólicos, como mantener el balance de ATP y el apropiado funcionamiento del metabolismo de la glucosa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Aunque los autores no encontraron el mecanismo molecular que relacione Myc a NUA1, evidenciaron que la expresión de NUA1 es esencial para el desarrollo de los procesos oncogénicos dependientes de Myc, en su modelo. En comparación, nuestro trabajo aporta con nuevos procesos metabólicos asociados a NUA1, como su participación en la mantención de las capacidades metabólicas, la mantención de la morfología mitocondrial y la promoción de la glicólisis en un contexto de switch glicolítico, aunque no realizamos estudios asociados a la presencia de Myc, reportes de bibliografía muestran la presencia de este oncogén en nuestros modelos celulares [123] [124], por lo que no descartamos que estas nuevas funciones metabólicas de NUA1 también estén asociadas a la actividad de Myc. Las terapias anti-cáncer contra el factor de transcripción Myc, han fallado debido a la dificultad de generar fármacos específicos contra esta proteína, debido a su naturaleza estructural intrínsecamente desordenada y a la baja solubilidad de las drogas generadas para este propósito [125]. Por lo anterior, lograr mayor comprensión entre la relación de NUA1 y Myc, podría ser de relevancia clínica y permitir alternativas en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas hacia los tumores con dependencia de Myc.

#### **5.6. Modelo de las funciones metabólicas de NUA1 abordadas en este trabajo.**

La reprogramación metabólica incluye alteraciones genéticas y modificaciones de las rutas metabólicas que abarcan desde la glicólisis hasta el metabolismo oxidativo mitocondrial, con el objetivo de permitir la adaptación de la célula de cáncer a las fluctuaciones de energía y sustratos presentes en el microambiente tumoral y la promoción de múltiples procesos tumorigénicos [18, 36, 103]. En resumen, nuestro estudio demuestra asociación entre las funciones metabólicas de NUA1 y su distribución celular, las cuales

se integran en el esquema resumen de la **Figura 21**. La comprensión de los roles celulares diferenciales ejercidos por NUA1 en una locación celular específica, podrían ser de ayuda en la clínica del cáncer, puesto que en muestras histológicas de cáncer gástrico y glioma se observa que NUA1 es acumulado en el citosol de acuerdo al grado más avanzado de cada muestra, mientras que en muestras de cáncer de pulmón, NUA1 siempre presenta localización nuclear [68, 71, 73]. Es decir, la distribución celular de NUA1 podría ser relevante para la reprogramación metabólica en el transcurso de la progresión del cáncer y por consecuencia, la caracterización clínica de la distribución de NUA1 podría sugerir información sobre el estado metabólico, la capacidad metabólica adaptativa y la respuesta a tratamientos. Futuros estudios podrían ayudar a entender en mayor medida los mecanismos involucrados en la regulación de NUA1 sobre las rutas metabólicas y la implicancia de esto para la comprensión de la adaptación metabólica en cáncer.





**Figura 21. Esquema resumen de las funciones metabólicas de NUAK1.** (A) En condición normal, NUAK1 localizado en el citosol incrementa la producción de ATP mitocondrial, posiblemente a través de su interacción con la subunidad catalítica del complejo ATP sintasa, ATP5A, y de la mantención de la capacidad operatoria de la cadena transportadora de electrones. Además, NUAK1 mantiene la correcta morfología mitocondrial, posiblemente a través de su función antioxidante celular. (B) Bajo la condición de inhibición mitocondrial, NUAK1 en su localización citosólica inhibe la enzima fosfofructoquinasa (PFK1) y promueve el incremento de NADPH, pero además mantiene la capacidad glicolítica y la producción de ATP glicolítico de la célula, posiblemente participando de la regulación de la ruta de la glicólisis río abajo de la PFK1. De manera complementaria, en su localización nuclear incrementa el lactato extracelular y la promoción del switch glicolítico, por lo que podría estar involucrado en la regulación transcripcional de genes glicolíticos (MCT1). Fuente: Elaboración propia.

## **6. Conclusiones**

Nuestro trabajo presenta evidencia que asocia nuevas funciones metabólicas de NUA1 con su distribución celular. Estos datos en su conjunto ayudarán a determinar la relevancia de NUA1 en cáncer, así como su potencial aplicación terapéutica asociada a la inhibición de NUA1. A continuación, se enuncian las principales conclusiones obtenidas, ordenadas de acuerdo con la distribución celular de NUA1:

### **En su localización citosólica:**

- La expresión de NUA1 promueve la producción de ATP mitocondrial, pero también es necesario para mantener la bioenergética glicolítica en un contexto de inhibición mitocondrial.
- NUA1 interacciona con la subunidad ATP5A.
- NUA1 promueve las máximas capacidades respiratorias y glicolíticas de la célula.
- NUA1 participa de la homeostasis mitocondrial, manteniendo su función y la correcta morfología mitocondrial, esta última a través de un mecanismo que involucra participación del estrés oxidativo.

### **En su localización nuclear:**

- NUA1 es necesario para que la célula realice el switch glicolítico e incremente el lactato extracelular, ante la condición de inhibición mitocondrial.

## 7. Bibliografía

1. World-Health-Organization, *World health statistics 2013*. 2013, World Health Organization. p. 172.
2. Departamento-de-Estadísticas-e-Información-de-Salud., *Indicadores básicos de salud en Chile 2012.*, M.d. Salud, Editor. 2013, 2013: Chile.
3. Weinberg, R., *The Biology of Cancer*. 2006.
4. Cooper, G.M., *The Cell: A Molecular Approach*. 2000.
5. Al-Hakim, A.K., et al., *Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains*. *Biochem J*, 2008. **411**(2): p. 249-60.
6. Iurlaro, R., C.L. Leon-Annicchiarico, and C. Munoz-Pinedo, *Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors*. *Methods Enzymol*, 2014. **542**: p. 59-80.
7. Toledo, F. and G.M. Wahl, *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(12): p. 909-23.
8. Olah, E., *Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination*. *EJIFCC*, 2005. **16**(2): p. 10-15.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
10. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(1): p. 11-22.
11. Engel, B.E., W.D. Cress, and P.G. Santiago-Cardona, *The Retinoblastoma Protein: A Master Tumor Suppressor Acts as a Link between Cell Cycle and Cell Adhesion*. *Cell Health Cytoskelet*, 2015. **7**: p. 1-10.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
13. Fouad, Y.A. and C. Aanei, *Revisiting the hallmarks of cancer*. *Am J Cancer Res*, 2017. **7**(5): p. 1016-1036.
14. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. *J Gen Physiol*, 1927. **8**(6): p. 519-30.
15. Kroemer, G. and J. Pouyssegur, *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(6): p. 472-82.
16. Isidoro, A., et al., *Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer*. *Biochem J*, 2004. **378**(Pt 1): p. 17-20.
17. Jose, C., N. Bellance, and R. Rossignol, *Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?* *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(6): p. 552-61.
18. Griguer, C.E., C.R. Oliva, and G.Y. Gillespie, *Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines*. *J Neurooncol*, 2005. **74**(2): p. 123-33.
19. LeBleu, V.S., et al., *PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2014. **16**(10): p. 992-1003, 1-15.
20. Guillaumond, F., et al., *Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(10): p. 3919-24.
21. Choi, Y.K. and K.G. Park, *Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018. **26**(1): p. 19-28.
22. Yang, M. and K.H. Vousden, *Serine and one-carbon metabolism in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2016. **16**: p. 650.

23. Nakajima, E.C. and B. Van Houten, *Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens*. Mol Carcinog, 2013. **52**(5): p. 329-37.
24. Kumar, S., et al., *Intra-Tumoral Metabolic Zonation and Resultant Phenotypic Diversification Are Dictated by Blood Vessel Proximity*. Cell Metab, 2019. **30**(1): p. 201-211 e6.
25. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
26. Giatromanolaki, A., et al., *Expression of enzymes related to glucose metabolism in non-small cell lung cancer and prognosis*. Exp Lung Res, 2017. **43**(4-5): p. 167-174.
27. Carvalho, K.C., et al., *GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66**(6): p. 965-72.
28. Foster, R., et al., *Multiple metabolic alterations exist in mutant PI3K cancers, but only glucose is essential as a nutrient source*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45061.
29. Shen, Y.M., et al., *Overexpression of GLUT1 in colorectal cancer is independently associated with poor prognosis*. Int J Biol Markers, 2011. **26**(3): p. 166-72.
30. Altenberg, B. and K.O. Greulich, *Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes*. Genomics, 2004. **84**(6): p. 1014-20.
31. Yeung, S.J., J. Pan, and M.H. Lee, *Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(24): p. 3981-99.
32. Munoz-Pinedo, C., N. El Mjiyad, and J.E. Ricci, *Cancer metabolism: current perspectives and future directions*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e248.
33. Tanner, L.B., et al., *Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells*. Cell Syst, 2018. **7**(1): p. 49-62 e8.
34. Reisz, J.A., et al., *Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells*. Blood, 2016. **128**(12): p. e32-42.
35. Grant, C.M., *Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress*. J Biol, 2008. **7**(1): p. 1.
36. Li, X., et al., *Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis*. Mol Cell, 2016. **61**(5): p. 705-719.
37. De Saedeleer, C.J., et al., *Lactate activates HIF-1 in oxidative but not in Warburg-phenotype human tumor cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46571.
38. An, J., et al., *Lactate dehydrogenase A promotes the invasion and proliferation of pituitary adenoma*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4734.
39. Fisher, J.S., et al., *Muscle contractions, AICAR, and insulin cause phosphorylation of an AMPK-related kinase*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(6): p. E986-92.
40. Lee, Y.C., et al., *Repeated occurrence of second primary lung cancer at different sites in trachea: a case report*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(17): p. e770.
41. Wallace, D.C., *Mitochondria and cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(10): p. 685-98.
42. Gottlieb, R.A. and D. Bernstein, *Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming*. Cell Calcium, 2016. **60**(2): p. 88-101.
43. Stryer, L., J. Berg, and J. Tymoczko, *Bioquímica*. Quinta Edición ed. 2003.
44. Magda, D., et al., *mtDNA depletion confers specific gene expression profiles in human cells grown in culture and in xenograft*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 521.
45. Yu, M., et al., *Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells*. Toxicol Lett, 2007. **170**(1): p. 83-93.
46. Porporato, P.E., et al., *A mitochondrial switch promotes tumor metastasis*. Cell Rep, 2014. **8**(3): p. 754-66.

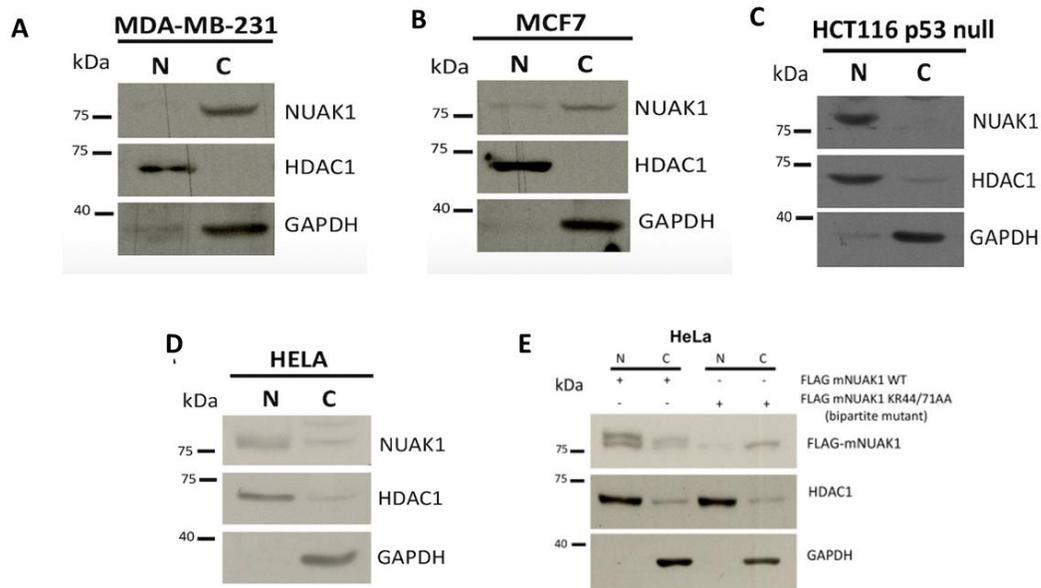
47. Morrish, F. and D. Hockenbery, *MYC and mitochondrial biogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(5).
48. Toki, N., et al., *Expression of mitochondrial transcription factor A in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations and prognostic significance*. Virchows Arch, 2010. **456**(4): p. 387-93.
49. Fogal, V., et al., *Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(6): p. 1303-18.
50. Yenugonda, V., et al., *A novel small molecule inhibitor of p32 mitochondrial protein overexpressed in glioma*. J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 210.
51. Alonso-Molero, J., et al., *Alterations in PGC1alpha expression levels are involved in colorectal cancer risk: a qualitative systematic review*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 731.
52. Vazquez, F., et al., *PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress*. Cancer Cell, 2013. **23**(3): p. 287-301.
53. Vara-Perez, M., B. Felipe-Abrio, and P. Agostinis, *Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation*. Cells, 2019. **8**(5).
54. Melser, S., et al., *Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 719-30.
55. Ralph, S.J., et al., *The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy*. Mol Aspects Med, 2010. **31**(2): p. 145-70.
56. Port, J.L.F., et al., *Colorectal tumors require NUAK1 for protection from oxidative stress*. Cancer Discov, 2018.
57. Weinberg, F., et al., *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(19): p. 8788-93.
58. Porporato, P.E., et al., *Mitochondrial metabolism and cancer*. Cell Res, 2018. **28**(3): p. 265-280.
59. Bardella, C., P.J. Pollard, and I. Tomlinson, *SDH mutations in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(11): p. 1432-43.
60. Ricketts, C., et al., *Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(17): p. 1260-2.
61. Ishii, T., et al., *A Mutation in the SDHC Gene of Complex II Increases Oxidative Stress, Resulting in Apoptosis and Tumorigenesis*. Cancer Research, 2005. **65**(1): p. 203-209.
62. Mu, X., et al., *Oncometabolite succinate promotes angiogenesis by upregulating VEGF expression through GPR91-mediated STAT3 and ERK activation*. Oncotarget, 2017. **8**(8): p. 13174-13185.
63. Schmidt, C., M. Sciacovelli, and C. Frezza, *Fumarate hydratase in cancer: A multifaceted tumour suppressor*. Semin Cell Dev Biol, 2019.
64. Kerins, M.J., et al., *Fumarate Mediates a Chronic Proliferative Signal in Fumarate Hydratase-Inactivated Cancer Cells by Increasing Transcription and Translation of Ferritin Genes*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(11).
65. Rohrig, F. and A. Schulze, *The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(11): p. 732-749.
66. Cui, J., et al., *Overexpression of ARK5 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. Tumour Biol, 2013. **34**(3): p. 1913-8.
67. Kusakai, G., et al., *ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 987-95.

68. Chen, P., et al., *High NUAK1 expression correlates with poor prognosis and involved in NSCLC cells migration and invasion*. *Exp Lung Res*, 2013. **39**(1): p. 9-17.
69. Bell, R.E., et al., *Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUAK1*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(2): p. 441-51.
70. Huang, X., et al., *miR96 functions as a tumor suppressor gene by targeting NUAK1 in pancreatic cancer*. *Int J Mol Med*, 2014. **34**(6): p. 1599-605.
71. Lu, S., et al., *ARK5 promotes glioma cell invasion, and its elevated expression is correlated with poor clinical outcome*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(3): p. 752-63.
72. Phippen, N.T., et al., *NUAK1 (ARK5) Is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer*. *Front Oncol*, 2016. **6**: p. 213.
73. Ye, X.T., et al., *Overexpression of NUAK1 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer*. *Med Oncol*, 2014. **31**(7): p. 61.
74. Inazuka, F., et al., *Muscle-specific knock-out of NUAK family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(20): p. 16379-89.
75. Lizcano, J.M., et al., *LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1*. *EMBO J*, 2004. **23**(4): p. 833-43.
76. Zagorska, A., et al., *New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion*. *Sci Signal*, 2010. **3**(115): p. ra25.
77. Hou, X., et al., *A new role of NUAK1: directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation*. *Oncogene*, 2011. **30**(26): p. 2933-42.
78. Palma, M., et al., *Identification of a nuclear localization signal and importin beta members mediating NUAK1 nuclear import inhibited by oxidative stress*. *J Cell Biochem*, 2019. **120**(9): p. 16088-16107.
79. Hirano, M., et al., *A new serine/threonine protein kinase, Omphk1, essential to ventral body wall formation*. *Dev Dyn*, 2006. **235**(8): p. 2229-37.
80. Suzuki, A., et al., *ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma*. *Oncogene*, 2005. **24**(46): p. 6936-44.
81. Humbert, N., et al., *Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUAK1*. *EMBO J*, 2010. **29**(2): p. 376-86.
82. Courchet, J., et al., *Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture*. *Cell*, 2013. **153**(7): p. 1510-25.
83. Suzuki, A., et al., *ARK5 Is a Tumor Invasion-Associated Factor Downstream of Akt Signaling*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004. **24**(8): p. 3526-3535.
84. Suzuki, A., et al., *Involvement of transforming growth factor-beta 1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31557-63.
85. Suzuki, A., T. Ogura, and H. Esumi, *NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during insulin-like growth factor-1 signaling*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 13915-21.
86. Chen, D., et al., *Knockdown of ARK5 Expression Suppresses Invasion and Metastasis of Gastric Cancer*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **42**(3): p. 1025-1036.
87. Banerjee, S., et al., *Characterization of WZ4003 and HTH-01-015 as selective inhibitors of the LKB1-tumour-suppressor-activated NUAK kinases*. *Biochem J*, 2014. **457**(1): p. 215-25.
88. Chang, X.Z., et al., *ARK5 is associated with the invasive and metastatic potential of human breast cancer cells*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012. **138**(2): p. 247-54.
89. Suzuki, A., et al., *Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 48-53.
90. Suzuki, A., et al., *Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5*. *Oncogene*, 2004. **23**(42): p. 7067-75.

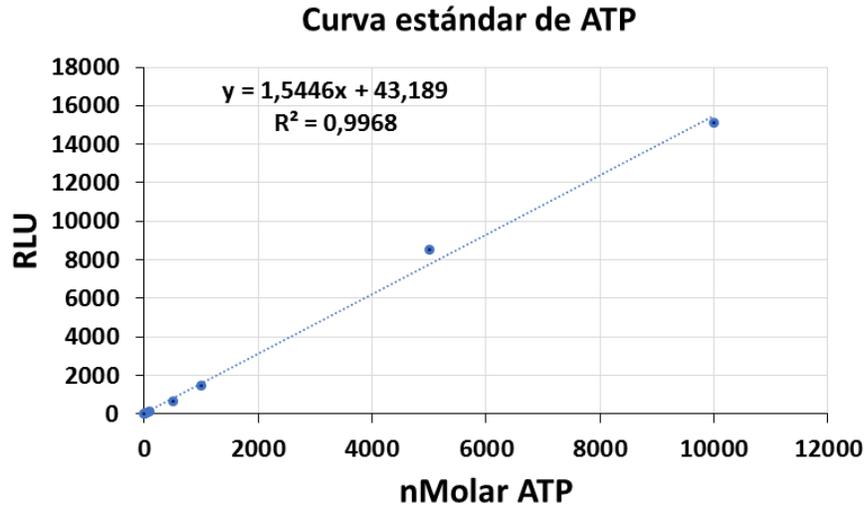
91. Suzuki, A., et al., *ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(40): p. 6177-82.
92. Li, F., et al., *Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(14): p. 6225-34.
93. Morrish, F., C. Giedt, and D. Hockenbery, *c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes*. *Genes Dev*, 2003. **17**(2): p. 240-55.
94. Wahlstrom, T. and M.A. Henriksson, *Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1849**(5): p. 563-9.
95. Liu, L., et al., *Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5*. *Nature*, 2012. **483**(7391): p. 608-12.
96. Kusakai, G., et al., *Strong association of ARK5 with tumor invasion and metastasis*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2004. **23**(2): p. 263-8.
97. Zhang, H.Y., et al., *Activation of ARK5/miR-1181/HOXA10 axis promotes epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer*. *Oncol Rep*, 2015. **34**(3): p. 1193-202.
98. Radde, B.N., et al., *Bioenergetic differences between MCF-7 and T47D breast cancer cells and their regulation by oestradiol and tamoxifen*. *Biochem J*, 2015. **465**(1): p. 49-61.
99. Monteverde, T., et al., *Calcium signalling links MYC to NUAK1*. *Oncogene*, 2017.
100. Seahorse, A., *Cell Mito Stress Test Kit User Guide*, I. Agilent Technologies, Editor. 2019.
101. Wu, M., et al., *Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C125-36.
102. Ahmad, T., et al., *Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e461.
103. DeBerardinis, R.J. and N.S. Chandel, *Fundamentals of cancer metabolism*. *Sci Adv*, 2016. **2**(5): p. e1600200.
104. Seo, H., et al., *ATP5B regulates mitochondrial fission and fusion in mammalian cells*. *Animal Cells and Systems*, 2016. **20**(3): p. 157-164.
105. Faccenda, D. and M. Campanella, *Molecular Regulation of the Mitochondrial F(1)F(o)-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF(1))*. *Int J Cell Biol*, 2012. **2012**: p. 367934.
106. Nowak, G. and D. Bakajsova, *Protein kinase C-alpha interaction with FOF1-ATPase promotes FOF1-ATPase activity and reduces energy deficits in injured renal cells*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(11): p. 7054-66.
107. Antico Arciuch, V.G., et al., *Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(14): p. 1234-49.
108. Goldberg, J., et al., *The mitochondrial ATP synthase is a shared drug target for aging and dementia*. *Aging Cell*, 2018.
109. Song, S.B. and E.S. Hwang, *A Rise in ATP, ROS, and Mitochondrial Content upon Glucose Withdrawal Correlates with a Dysregulated Mitochondria Turnover Mediated by the Activation of the Protein Deacetylase SIRT1*. *Cells*, 2018. **8**(1).
110. Santamaria, G., et al., *Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(5): p. 925-35.
111. Kim, S.Y., *Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018. **26**(1): p. 39-44.

112. Walenta, S., et al., *High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers*. *Cancer Res*, 2000. **60**(4): p. 916-21.
113. Xu, R.H., et al., *Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia*. *Cancer Res*, 2005. **65**(2): p. 613-21.
114. Reczek, C.R. and N.S. Chandel, *The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer*. *Annual Review of Cancer Biology*, 2017. **1**(1): p. 79-98.
115. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. *Curr Biol*, 2014. **24**(10): p. R453-62.
116. Miyazono, Y., et al., *Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 350.
117. Picard, M. and B.S. McEwen, *Mitochondria impact brain function and cognition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(1): p. 7-8.
118. Zhang, W., et al., *Quantification of lactate from various metabolic pathways and quantification issues of lactate isotopologues and isotopomers*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 8489.
119. Stincone, A., et al., *The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2015. **90**(3): p. 927-63.
120. Palma, M., *NUAK1 y cáncer: Elucidando los mecanismos moleculares involucrados en la regulación y función de la quinasa NUAK1.*, in *Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular*. 2019, Universidad de Concepción.
121. Dang, C.V., *MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(8).
122. Yuneva, M.O., et al., *The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type*. *Cell Metab*, 2012. **15**(2): p. 157-70.
123. Zwolinska, A.K., et al., *Suppression of Myc oncogenic activity by nucleostemin haploinsufficiency*. *Oncogene*, 2012. **31**(28): p. 3311-21.
124. Gupta, N., et al., *High Myc expression and transcription activity underlies intra-tumoral heterogeneity in triple-negative breast cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(17): p. 28101-28115.
125. Carabet, L.A., P.S. Rennie, and A. Cherkasov, *Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches*. *Int J Mol Sci*, 2018. **20**(1).

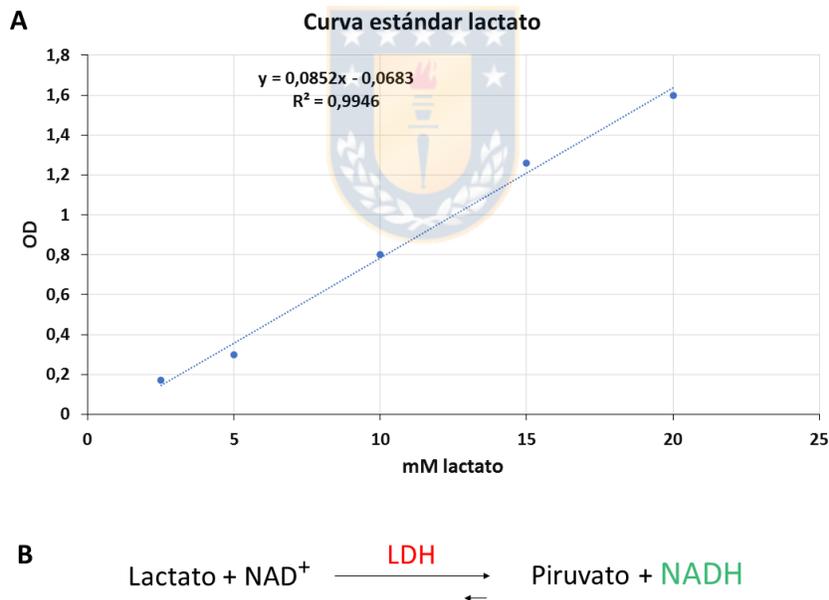
## 8. ANEXOS



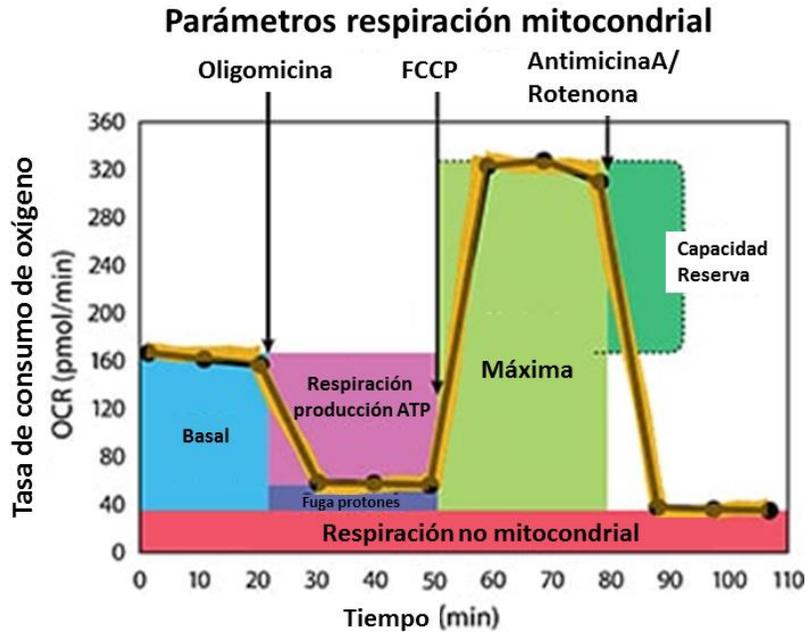
**Figura A1. Localización subcelular de NUAK1.** *Western blot* de fraccionamientos subcelulares núcleo/citosol de células MDA-MB-231 (**A**), MCF-7 (**B**), HCT116 p53 null (**C**), HeLa (**D**). (**E**) *Western blot* de fraccionamientos subcelulares núcleo/citosol de células HeLa transfectadas con FLAG-NUAK1 WT y FLAG-NUAK1 citosólico (KR44/71AA). N: núcleo, C: citosol. Fuente: Imagen modificada desde la tesis para el grado de Doctor de dominio público Palma, 2019, Universidad de Concepción. Fuente: Elaboración propia.



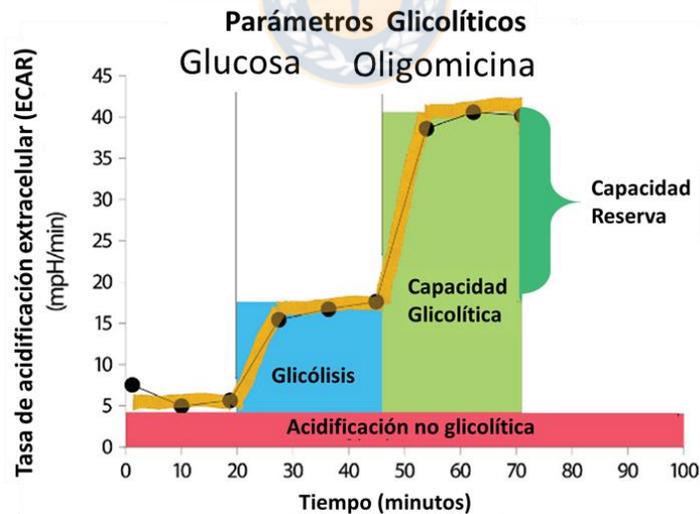
**Figura A2. Curva estándar utilizada para la medición de ATP.** Gráfico de concentración de ATP versus unidades relativas de luminiscencia (RLU), la cuantificación fue realizada de acuerdo con la descripción en la sección metodologías. Fuente: Elaboración propia.



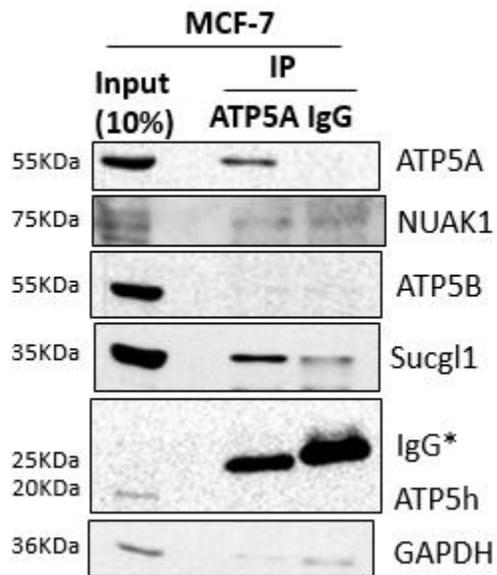
**Figura A3. Curva estándar de densidad óptica versus lactato.** (A) Gráfico de concentración de lactato versus densidad óptica (OD) a 340 nm, la cuantificación fue realizada de acuerdo con la descripción en la sección metodologías. (B) Reacción utilizada para cuantificar de manera indirecta el lactato. El producto NADH se evaluó a 340nm. Fuente: Elaboración propia.



**Figura A4. Esquema utilizado para el cálculo de parámetros de respiración mitocondrial.** Representación de las tasas de consumo de oxígeno, luego de la inyección de oligomicina A, FCCP, rotenona y antimicina A, respectivamente. Fuente: Modificado de manual *Seahorse XF24*.



**Figura A5. Esquema utilizado para el cálculo de parámetros glicolíticos.** Representación de las tasas de acidificación extracelular, luego de la inyección de glucosa y oligomicina A, respectivamente. Fuente: Modificado de manual *Seahorse XF24*.



**Figura A6. Evaluación de la interacción entre ATP5A y NUAK1 en MCF-7.** Co-inmunoprecipitación de la ATP5A endógena en células MCF-7. Se inmunodetectó NUAK1, ATP5A, ATP5B, Sucg1, ATP5H y GAPDH con anticuerpos específicos. Como control del experimento se detectó la cadena liviana de la inmunoglobulina (n=1). Fuente: Elaboración propia.

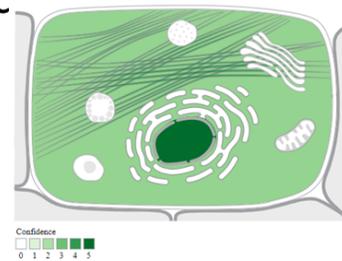


**A**

Ensembl Primary Identifier	ENSG00000074590	GenomeDB Identifier	HGNC:14311
NCBI Gene ID	9891	Mito Evidence Mass-Spec Independent Studies	0
Mito Evidence GFP	0	Mito Evidence Mass-Spec Experiments	0
Mito Evidence Gene Ontology Annotation	false	Mito Evidence IMPI	false
Mito Evidence MitoCarta	false	Mito Evidence IMPI score	0.0
Mito Evidence Human Protein Atlas	false	Mito Targeting Seq iPSORT	0.0
Mito Targeting Seq MitoProt	0.042	Mito Targeting Seq TargetP	0.079
Mito Targeting Seq MitoFates	0.0	Chromosome	12
Encoded in the mitochondrial genome	false		

**B**

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
sp_O60285_NUAK1_HUMA	661	0.079	0.072	0.907	_	1

**C**

**Figura A7. Predicción de localización mitocondrial de NUAK1. (A)** Parámetros de caracterización de localización y evidencia asociada a la mitocondria para NUAK1, obtenidos con *MitoMiner v3.1*. **(B)** Predicción de localización subcelular de NUAK1 realizada con *TargetP 1.1*. mTP, localización mitocondrial; SP, localización en la vía secretora; other, otra localización, RC, fuerza del ensayo, el 1 indica la mayor fuerza de predicción. **(C)** Esquema de la localización de NUAK1 obtenido de la base de datos: *COMPARTMENTS, Subcellular localization database*. Los valores más altos correlacionan con mayor probabilidad de localización. Fuente: Elaboración propia.