



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biotecnología

Tesis doctoral

Funciones del factor de inicio de la traducción eucariota 5A2 en el cáncer de pulmón

Arantxa Martínez Ferriz

Directora:

Dra. Rosa Farràs Rivera

Tutor:

Dr. Ramón Serrano Salom

Abril 2023

A los Martínez-Férriz

AGRADECIMIENTOS

Escribir estas palabras ha sido, sin duda, una de las partes más intensas y emotivas de todo este proceso. Espero que después de darles decenas de vueltas y releerlas una y otra vez, haya conseguido no dejarme a nadie por el camino. Y, sobre todo, espero conseguir transmitir la importancia que han tenido todas las personas que aquí se mencionan en el desarrollo de este proyecto, y en general, en mi vida.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Junta Provincial de Valencia de la AECC, a la Fundación Científica de la AECC y a todas las personas que forman parte de ellas, desde trabajadores a colaboradores. Cumplen una importantísima labor de apoyo al paciente de cáncer y sus familias, así como de promoción y divulgación de la investigación científica en cáncer. También a los promotores y organizadores del circuito de carreras RunCancer, que junto a AECC Valencia hacen posible la recaudación de fondos para las becas predoctorales de las que fui beneficiaria. Concederme esta beca me ha permitido cumplir mi objetivo y desarrollar este proyecto.

Gracias a todo mi equipo del I-57, la que ha sido mi casa durante más de 7 años. Gracias a **Rosa**, mi primera y única mentora. Mi directora de TFG, TFM, tesis y mucho más. Gracias por darme aquella primera oportunidad y seguir confiando en mí hasta el final. Por tu guía, por tener siempre el despacho abierto y ser tan cercana. Por tu inteligencia y buena disposición. Estos últimos meses sabes que no han sido nada fáciles, y aunque en más de un momento creía que ya no podía más, siempre has conseguido que termine viendo la luz al final del túnel. Creaste el entorno de trabajo ideal para mí, y contigo me he desarrollado como científica y como persona. Ha sido un placer crecer todos estos años contigo.

Carol, sin ti y tu ayuda esta tesis no sería ni una décima parte de lo que ha terminado siendo. Eres una persona increíble, luchadora y trabajadora, todo un ejemplo a seguir para mí, y todos los que te rodean. Eres una científica excelente, pero eres aún mejor persona. Eres una fuente de conocimiento sin igual. Siempre te he tenido cerca cuando te he necesitado, y cuando no, también. Eres la mejor compañera de laboratorio que he tenido, y afirmo sin lugar a dudas, jamás tendré. El CIPF no es consciente de la inmensa suerte que tiene de contar con personas como tú.

A los post-doc con los que he trabajado. A **Alí**, por cada experimento que he aprendido a hacer a tu lado. A **Bea**, porque su huella en el laboratorio es imborrable.

Por supuesto, no puedo olvidarme del resto de personas del CIPF que han colaborado para que esta tesis se llevase a cabo, sobre todo, a los responsables y técnicos de los distintos servicios tecnológicos. Mención especial a **Alicia y Domingo**,

las mejores personas llevando el mejor servicio. Me habéis ayudado en todo y más, siempre con buenas palabras y una sonrisa.

Si hay algo por lo que puedo estar agradecida al CIPF por encima de todo lo demás, es por todas las personas buenas que ha traído a mi vida para que se queden en ella para siempre. A mis rebeldes; **MJ, Andrea y Candela**. Cada una, a vuestra manera, os habéis convertido en imprescindibles. Habéis estado presentes en cada paso que he dado a lo largo de estos años, y vuestra ayuda y guía han hecho todo más fácil. Cada visita a vuestros laboratorios, cada cruce en el pasillo, cada duda resuelta, cada comida compartida (gracias, Emilio por lo feliz que me hacen tus migas), cada congreso, cada cumpleaños celebrado, cada cena o cada risa, solo me traen buenísimos recuerdos que guardaré para siempre. Hemos tenido momentos duros, nadie mejor que nosotras mismas para ser conscientes de lo que supone este proceso, pero todo lo hemos superado juntas, siempre apoyándonos e intentando hacernos ver el lado bueno de las cosas. Ha sido un honor veros convertirnos en doctoras, ver que toda nuestra lucha ha servido de algo y tiene su fruto. Ahora que nos hemos separado, estoy segura de que el futuro sólo nos traerá cosas buenas, y que siempre estaremos juntas para compartirlas.

Al resto de **personas seleccionadas naturalmente**, siempre intentando hacer el mundo mejor, más amable, menos malo. Gracias Fátima, Espe, Jesús, Vicent, Gustavo, María y Mar, y a la pequeña Patata, que nos ha hecho felices sólo con existir. Estoy deseando celebrar con todos vosotros esto. Y por supuesto, a **José Miguel**, mi otra mitad en el dúo dinámico del CIPF. Ha sido difícil no nombrarte veinte veces a estas alturas de los agradecimientos, has sido compañero de laboratorio, pero sobre todo eres amigo. Contigo empezó todo. Me enseñaste a trabajar en un laboratorio, a ser metódica y constante. Eres ejemplo de lo que es tener auténtica pasión por la ciencia y ser consciente de que nunca se sabe lo suficiente, siempre hay más por aprender. Fuiste el primer amigo que hice en el CIPF, y estoy muy agradecida por todo el tiempo que hemos podido compartir juntos.

Y, por último, a todos mis nuevos compañeros del **CBIT**. Habéis tenido una paciencia infinita conmigo estos primeros meses y me habéis apoyado muchísimo para que el depósito de esta tesis se hiciese realidad. Estoy muy contenta de formar parte de este nuevo grupo y de que todos os hayáis implicado tanto conmigo. Me hace muy feliz que también forméis parte de esto.

Y no puedo dejar atrás a la familia que he creado a lo largo de muchos años, todos mis amigos fuera del mundo de la investigación.

A mi **Equipo 9**. En el colegio, en el instituto, en las tardes de paseo o la Canaleta, en la falla, haciendo maldades en nuestras primeras noches de fiesta o comiendo hamburguesas en las borracheras más actuales... Sois las mejores amigas que una podría desear y me siento afortunada de teneros a todas y cada una de vosotras en mi vida. Llevamos toda la vida juntas, literalmente no recuerdo un momento de mi vida en el que no hayáis estado presentes, y sigo maravillándome cada día de lo preciosa que es esta amistad. Me siento inmensamente feliz de haber crecido y madurado junto a vosotras y ver en las mujeres fuertes, independientes, valientes e increíbles en las que os habéis convertido. Como hablábamos hace poco, si hemos llegado hasta aquí, esto ya es para siempre.

AMR, mi hogar en Camporrobles. Lo que podría parecer una amistad de verano ha trascendido a algo muchísimo más vital. Desde siempre, y para siempre, y a veces pienso que hasta eso se queda corto.

A mis **Limonos**. Con vosotros los años universitarios se han convertido en los mejores de mi vida. Veros luchar por lo que queréis y ver todo lo que habéis conseguido me llena de felicidad. Gracias a **Pedro**, por hacer de celestina sin querer y por acogerme en su grupo de toda la vida. Gracias a todos ellos por siempre hacerme sentir una más, por las cientos de quedadas a lo largo de estos años y vuestro cariño y compañía cuando lo he necesitado. Mención especial a mi **Maria**, mi *partner in crime*. Te admiro profundamente, a ti, tu capacidad de adaptación, tu entereza, tu resiliencia. Juntas hemos trabajado en que el modo supervivencia fuese algo puntual y en darle a las cosas la importancia que se merecen. Contigo he aprendido que las mejores macetas son las que se te parecen o las que hacen tus manos y que no hay nada como la quedada de la siesta. Hemos recorrido juntas cada paso del camino y al fin las dos hemos llegado a la meta. Ya tengo una botella de vino enfriando en la nevera para celebrarlo.

Y finalmente, a toda mi familia, cada uno, a vuestro modo, habéis aportado para que mis objetivos se cumplan. A mis **padres**, mi ejemplo a seguir en la vida. Sois un apoyo incondicional, mis fans número 1, aunque no entendáis nada de mi trabajo en el laboratorio. Sois las personas más honradas y trabajadoras que conozco. Aunque hemos pasado por momentos duros, hemos permanecido unidos y juntos somos capaces de superar cualquier adversidad. Me habéis dado todo y os debo todo. Me habéis educado para convertirme en la persona que soy hoy en día. Espero que ahora que se cierra esta etapa y empiezan nuevos retos, sigáis tan orgullosos de mí como lo habéis estado siempre, tanto como lo estoy yo de vosotros.

A mi pequeña flor, **Tamara**. Que estés aquí conmigo, verte crecer, y todo el tiempo y experiencias que hemos compartido, ha sido el mejor regalo que jamás podrán hacerme.

Eres la persona más responsable, buena y cariñosa que existe, aunque tengas la mecha corta, a mí me guste demasiado pincharte, y a veces te pueda la mala leche. Tu inteligencia y constancia te llevarán lejos, y sé que conseguirás absolutamente todo lo que te propongas. Te lo dejo por escrito aquí, de manera oficial, para que cuando vengan momentos de flaqueza y necesites leerlo sepas a donde recurrir. Sé que la diferencia de edad me ha hecho actuar muchas veces más como madre que como hermana y amiga, pero espero haber estado y estar a la altura en el futuro cada vez que me necesites. Estoy muy orgullosa de ti y de la mujer en la que te has convertido. Por miles de besos más en la frente.

Sé que no soy la persona más cariñosa del mundo y no os lo demuestro mucho, pero os quiero infinitamente a los tres.

Y, por último, y sí, más importante, a ti, **Emilio**. No te puedes llegar a imaginar lo que te admiro y lo mucho que me inspiras a ser mejor en todo, mi ingeniero que ingenia. Eres el mejor apoyo que se puede pedir en la vida, y en especial en esta etapa, en la que sabes que tu tranquilidad me ha hecho falta más veces de las que me gustaría admitir. Me has ayudado siempre y me has animado cada vez que ha hecho falta, siempre sacándome una sonrisa. Gracias por todos los abrazos en el momento oportuno. Por tu paciencia infinita, por calentarme siempre los pies y dejarme llenar la casa de plantas y purpurina en navidad. Gracias por ser familia y hogar. Por ser risa y calma. Te quiero muchísimo.

RESUMEN

Las poliaminas son metabolitos esenciales para el crecimiento de las células eucariotas y su metabolismo está frecuentemente desregulado en cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas. Una de las dianas moleculares de las poliaminas es el factor de elongación de la traducción eIF5A, una proteína esencial y conservada evolutivamente.

eIF5A es la única proteína celular conocida que contiene el aminoácido inusual hipusina, que deriva de la poliamina espermidina. En humanos existen dos isoformas, eIF5A1 y eIF5A2. *EIF5A2* se encuentra en el cromosoma 3q26, una región frecuentemente amplificada en muchos tumores, y está altamente expresada en carcinoma colorectal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, carcinoma de células escamosas esofágicas, y cáncer gástrico. eIF5A2 es esencial para el mantenimiento de la proliferación celular y su inhibición la suprime en muchos tumores.

Recientemente se ha correlacionado la sobreexpresión de eIF5A2 con la invasión y como biomarcador de mal pronóstico en algunos cánceres, incluido el CPNM y se ha observado que eIF5A2 induce la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en CPNM. La EMT es un proceso complejo y reversible que induce la diferenciación de las células epiteliales a células mesenquimales migrantes con capacidad de invasión. Numerosos estudios han demostrado que la EMT está relacionada con la progresión del cáncer, metástasis y mal pronóstico en muchos tumores. Por tanto, la determinación de un método eficaz para inhibir la EMT en CPNM podría mejorar significativamente los regímenes de los tratamientos actuales.

La naturaleza altamente selectiva de la hipusinación de eIF5A2 y su susceptibilidad a la inhibición farmacológica hacen de este proceso una diana terapéutica muy atractiva. Actualmente, se dispone de un análogo de poliamina, denominado GC7, que se utiliza para inactivar la reacción de hipusinación y se ha demostrado que inhibe el crecimiento de células cancerosas. Sin embargo, GC7 no es suficientemente selectivo y produce algunos efectos secundarios, además de que su biodisponibilidad está afectada por las poliaminooxidasas presentes en la sangre. Es por ello que no se utiliza en ensayos clínicos actualmente y es necesario realizar más estudios para identificar inhibidores más específicos de la hipusinación.

El presente trabajo de tesis doctoral tiene como objetivo caracterizar el papel patológico de eIF5A2 en el desarrollo del CPNM. Para ello, hemos estudiado, mediante alteraciones genéticas por silenciamiento y sobreexpresión, el papel de eIF5A2 en la

proliferación, motilidad e invasión celular utilizando líneas celulares de cáncer de pulmón. Para comprender mejor las condiciones fisiológicas del microambiente tumoral, hemos utilizado la activación ectópica de la EMT mediante la aplicación de TGF β 1. Así mismo, se ha estudiado el efecto del inhibidor GC7 en líneas celulares de CPNM y modelos murinos para determinar si aumenta la quimiosensibilidad de las células, previene o revierte la EMT, y reduce la migración y la invasión de células de CPNM. Por último, se ha analizado la correlación entre la expresión de eIF5A2, las variables clínico-patológicas y la supervivencia de los pacientes, en una colección de muestras de pacientes con CPNM. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una regulación entre las isoformas eIF5A1 y eIF5A2 para compensar la expresión de ambos homólogos. Además, nuestros datos apuntan a una coordinación temporal y posicional entre las vías TGF β 1 y eIF5A2 para impulsar la traducción requerida de proteínas para los reordenamientos del citoesqueleto y las características de motilidad de las células cancerosas invasivas.

Mediante experimentos llevados a cabo con modelos de ratón *in vivo*, demostramos que los tumores generados mediante xenotrasplante de células que sobreexpresan eIF5A2 tienen mayor capacidad invasiva. Finalmente, mostramos la existencia una correlación positiva entre la expresión de eIF5A2 y el marcador de proliferación Ki67 en tejido de tumores de CPNM, y que la tasa de supervivencia es menor en aquellos pacientes que expresaban altos niveles de eIF5A2.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo confirman que eIF5A2 podría ser empleado como un biomarcador de mal pronóstico en CPNM y su inhibición farmacológica podría emplearse como una posible herramienta terapéutica, sola o en combinación con otros fármacos, en aquellos casos en los que eIF5A2 se encuentre sobreexpresado.

ABSTRACT

Polyamines are essential metabolites for eukaryotic cells growth, and their metabolism is frequently deregulated in cancer and other hyperproliferative diseases. One of the molecular targets of polyamines is the translation elongation factor eIF5A, an essential and evolutionarily conserved protein.

eIF5A is the only cellular protein known that contains the unusual amino acid hypusine, which is derived from the polyamine spermidine. In humans there are two isoforms, eIF5A1 and eIF5A2. *EIF5A2* is located on chromosome 3q26, a region frequently amplified in many tumors, and is highly expressed in colorectal carcinoma, ovarian cancer, bladder cancer, hepatocellular carcinoma, non-small cell lung cancer (NSCLC), pancreatic cancer, carcinoma of the esophageal squamous cells and gastric cancer. eIF5A2 is essential for the maintenance of cell proliferation and its inhibition suppresses it in many tumors.

Recently, eIF5A2 overexpression has been correlated with invasion and as a biomarker of poor prognosis in NSCLC, and it has been observed that eIF5A2 induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in some cancers, including NSCLC. EMT is a complex and reversible process that induces the differentiation of epithelial cells into migrant mesenchymal cells with invasive capacity. Numerous studies have shown that EMT is related to cancer progression, metastasis, and poor prognosis in many tumors. Therefore, the determination of an effective method to inhibit EMT in NSCLC could significantly improve current treatment regimens.

The highly selective nature of eIF5A2 hypusination and its susceptibility to pharmacological inhibition make this process a very attractive therapeutic target. Currently, a polyamine analog, called GC7, is available and is used to inactivate the hypusination reaction and has been shown to inhibit cancer cell growth. However, GC7 is not sufficiently selective and produces some side effects, in addition to the fact that its bioavailability is affected by polyamine oxidases present in the blood. For this reason, it is not currently used in clinical trials and more studies are needed to identify more specific inhibitors of hypusination.

The objective of this doctoral thesis is to characterize the pathological role of eIF5A2 in the development of NSCLC. For this, we have studied, through genetic alterations by silencing and overexpression, the role of eIF5A2 in cell proliferation, motility and invasion using lung cancer cell lines. To better understand the physiological conditions of the tumor microenvironment, we have used the ectopic activation of EMT by the application of TGF β 1. Likewise, the effect of the GC7 inhibitor in NSCLC cell lines and murine

models has been studied to determine if it increases the chemosensitivity of cells, prevents or reverses EMT, and reduces migration and invasion of NSCLC cells. Finally, the correlation between the expression of eIF5A2, clinicopathological variables and patient survival has been analyzed in a collection of samples from patients with NSCLC. The results obtained suggest the existence of a regulation between the eIF5A1 and eIF5A2 isoforms to compensate the expression of both homologues. Furthermore, our data point to a temporal and positional coordination between the TGF β 1 and eIF5A2 pathways to drive the required translation of proteins for cytoskeletal rearrangements and motility characteristics of invasive cancer cells.

Through experiments carried out with *in vivo* mouse models, we demonstrate that tumors generated by xenotransplantation of cells that overexpress eIF5A2 have a greater invasive capacity. Finally, we show the existence of a positive correlation between the expression of eIF5A2 and the proliferation marker Ki67 in NSCLC tumor tissue, and that the survival rate is lower in those patients who expressed high levels of eIF5A2.

All the results obtained in this work confirm that eIF5A2 could be used as a biomarker of poor prognosis in NSCLC and its pharmacological inhibition could be used as a possible therapeutic tool, alone or in combination with other drugs, in those cases in which eIF5A2 is found overexpressed.

RESUM

Les poliamines són metabòlits essencials per al creixement de les cèl·lules eucariotes i el seu metabolisme està freqüentment desregulat en càncer i altres malalties hiperproliferatives. Una de les dianes moleculars de les poliamines és el factor d'elongació de la traducció eIF5A, una proteïna essencial i conservada evolutivament.

eIF5A és l'única proteïna cel·lular coneguda que conté l'aminoàcid inusual hipusina, que deriva de la poliamina espermidina. En humans hi ha dues isoformes, eIF5A1 i eIF5A2. *EIF5A2* es troba al cromosoma 3q26, una regió freqüentment amplificada en molts tumors, i que està altament expressada en carcinoma colorectal, càncer d'ovari, càncer de bufeta, carcinoma hepatocel·lular, càncer de pulmó no microcític (CPNM), càncer de pàncrees, cèl·lules escamoses esofàgiques i càncer gàstric. eIF5A2 és essencial per al manteniment de la proliferació cel·lular i la seva inhibició la suprimeix en molts tumors.

Recentment s'ha correlacionat la sobreexpressió d'eIF5A2 amb la invasió i com a biomarcador de mal pronòstic a CPNM i s'ha observat que eIF5A2 indueix la transició epitelial-mesenquima (EMT) a alguns càncers, entre els quals es troba el CPNM. L'EMT és un procés complex i reversible que indueix la diferenciació de les cèl·lules epitelials a cèl·lules mesenquimals migrants amb capacitat d'invasió. Nombrosos estudis han demostrat que l'EMT està relacionada amb la progressió del càncer, la metastasi i el mal pronòstic en molts tumors. Per tant, la determinació d'un mètode eficaç per inhibir l'EMT a CPNM podria millorar significativament els règims dels tractaments actuals.

La naturalesa altament selectiva de la hipusinació d'eIF5A2 i la susceptibilitat a la inhibició farmacològica fan d'aquest procés una diana terapèutica molt atractiva. Actualment, es disposa d'un anàleg de poliamina, anomenat GC7, que s'utilitza per inactivar la reacció d'hipusinació i s'ha demostrat que inhibeix el creixement de cèl·lules canceroses. No obstant això, GC7 no és prou selectiu i produeix alguns efectes secundaris, a més que la seva biodisponibilitat està afectada per les poliaminooxidases presents a la sang. És per això que actualment no s'utilitza en assaigs clínics i cal fer més estudis per identificar inhibidors més específics de la hipusinació.

Aquest treball de tesi doctoral té com a objectiu caracteritzar el paper patològic d'eIF5A2 en el desenvolupament del CPNM. Per això, hem estudiat, mitjançant alteracions genètiques per silenciament i sobreexpressió, el paper d'eIF5A2 en la proliferació, la motilitat i la invasió cel·lular utilitzant línies cel·lulars de càncer de pulmó. Per comprendre millor les condicions fisiològiques del microambient tumoral, hem fet servir l'activació ectòpica de l'EMT mitjançant l'aplicació de TGF β 1. Així mateix, s'ha estudiat

l'efecte de l'inhibidor GC7 en línies cel·lulars de CPNM i models murins per determinar si augmenta la quimiosensibilitat de les cèl·lules, prevé o reverteix l'EMT i redueix la migració i la invasió de cèl·lules de CPNM. Finalment, s'ha analitzat la correlació entre l'expressió d'eIF5A2, les variables clinicopatològiques i la supervivència dels pacients en una col·lecció de mostres de pacients amb CPNM. Els resultats obtinguts suggereixen que hi ha una regulació entre les isoformes eIF5A1 i eIF5A2 per compensar l'expressió dels dos homòlegs. A més, les nostres dades apunten a una coordinació temporal i posicional entre les vies de TGF β 1 i eIF5A2 per impulsar la traducció requerida de proteïnes per als reordenaments del citosquelet i les característiques de motilitat de les cèl·lules canceroses invasives.

Mitjançant experiments duts a terme amb models de ratolí *in vivo*, demostrem que els tumors generats mitjançant xenotrasplantament de cèl·lules que sobreexpressen eIF5A2 tenen més capacitat invasiva. Finalment, mostrem l'existència una correlació positiva entre l'expressió d'eIF5A2 i el marcador de proliferació Ki67 en teixit de tumors de CPNM, i que la taxa de supervivència és menor en aquells pacients que expressaven alts nivells d'eIF5A2.

Tots els resultats obtinguts en aquest treball confirmen que eIF5A2 podria ser emprat com un biomarcador de mal pronòstic a CPNM i la seva inhibició farmacològica podria utilitzar-se com una possible eina terapèutica, sola o en combinació amb altres fàrmacs, en aquells casos en què eIF5A2 es trobe sobreexpressat.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

RESUM

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
1. Poliaminas.....	2
1.1. Tipos y estructura.....	2
1.2. Metabolismo de las poliaminas	3
1.3. Funciones de las poliaminas	5
1.4. Poliaminas y cáncer	6
2. Cáncer.....	7
2.1. Rasgos distintivos	7
3. La transición epitelio-mesénquima.....	14
3.1. Cambios morfológicos y reorganización del citoesqueleto	15
3.2. Cambios en la expresión génica y proteica	17
3.3. Factores de transcripción que dirigen la EMT	18
3.4. EMT en condiciones fisiológicas normales y cáncer.....	22
4. El factor de traducción eIF5A.....	23
4.1. Descubrimiento y estructura.....	24
4.2. Isoformas de eIF5A.....	25
4.3. Expresión y localización celular de eIF5A	26
4.4. El aminoácido hipusina	28
4.4.1. Ruta de hipusinación.....	29
4.4.2. Importancia de la hipusinación	30

4.5. Función biológica	31
4.6. eIF5A y cáncer	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Ácidos nucleicos.....	40
1.1. ARN de interferencia	40
1.2. ADNs y plásmidos.....	40
1.3. Transformación de bacterias por choque térmico.....	41
1.4. Purificación del ADN	41
2. Cultivos celulares.....	42
2.1. Líneas celulares estables comerciales de CPNM.....	42
2.2. Generación de líneas celulares estables	42
2.2.1. Análisis de la capacidad proliferativa celular	43
2.3. Cultivo en adherencia de las líneas celulares.....	43
3. Ensayos celulares.....	44
3.1. Transfecciones transientes	44
3.2. Silenciamiento génico mediado por ARN pequeño de interferencia	45
3.3. Inducción de la EMT con TGF β 1	45
3.4. Inhibición farmacológica de eIF5A con GC7.....	45
4. Análisis de expresión génica.....	46
4.1. Extracción de ARN.....	46
4.2. Transcripción reversa.....	47
4.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	47
5. Análisis de expresión proteica.....	49
5.1. Preparación de extractos proteicos	49
5.2. Cuantificación de la concentración proteica	49
5.3. <i>Western Blot</i>	49
6. Análisis de la traducción celular.....	51
6.1. Perfiles polisomales	51

6.2. Ensayos de marcaje con puromicina.....	53
7. Análisis de imagen.....	53
7.1. Fijación del citoesqueleto	53
7.2. Inmunofluorescencia	54
8. Análisis celular.....	55
8.1. Citometría de flujo.....	55
8.2. Ensayos de proliferación	56
8.3. Ensayos de migración.....	56
9. Modelos experimentales <i>in vivo</i>	57
9.1. Animales de experimentación	57
9.2. Inyección subcutánea de células.....	58
9.3. Obtención de muestras	58
10. Análisis histológico de las muestras de modelo animal.....	58
10.1. Fijación en PFA.....	58
10.2. Inclusión en parafina y criopreservación	59
10.3. Obtención de cortes	59
10.4. Inmunofluorescencia	59
11. Análisis histológico de las muestras de biopsias de pacientes.....	60
11.1. Micromatrices de tejido (TMA) y técnicas de marcaje inmunohistoquímico ...	60
12. Análisis estadísticos.....	61
RESULTADOS	63
1. Clasificación fenotípica de las líneas celulares A549, H1395, PC9 y H441.....	64
2. Estudio de la inhibición génica de eIF5A1 y eIF5A2.....	68
2.1. El silenciamiento génico de eIF5A es específico de cada isoforma y existe una regulación entre ambas.....	68
2.2. El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> disminuye la proliferación celular.....	71
2.3. El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> inhibe el cambio de la morfología celular en la EMT inducida por TGF β 1	72
2.4. El silenciamiento génico de eIF5A2 inhibe la migración celular.....	73

2.5.	El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> en presencia de TGFβ1 disminuye la expresión de marcadores de tipo mesenquimal	76
2.6.	El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> en presencia de TGFβ1 disminuye la expresión de proteínas implicadas en la EMT	78
2.7.	El silenciamiento génico de <i>eIF5A2</i> provoca la rotura de los filamentos de actina y su acumulación en nudos.....	83
3.	Estudio de la sobreexpresión constitutiva de <i>eIF5A</i>	84
3.1.	Generación de las líneas estables H1395-EV y H1395- <i>eIF5A2</i>	85
3.2.	La sobreexpresión de <i>eIF5A2</i> aumenta la proliferación celular	89
3.3.	La sobreexpresión de <i>eIF5A2</i> induce la migración celular.....	92
3.4.	Efecto del tratamiento con TGFβ1.....	93
3.4.1.	El tratamiento con TGFβ1 induce la expresión de <i>eIF5A2</i> y <i>eIF5A2</i> hipusinado.....	93
3.4.2.	El tratamiento con TGFβ1 aumenta la expresión de algunos marcadores de fenotipo mesenquimal en las células H1395- <i>eIF5A2</i>	96
3.4.3.	El tratamiento con TGFβ1 aumenta la expresión de proteínas involucradas en la EMT en las células H1395- <i>eIF5A2</i>	98
3.5.	Efecto de la inhibición farmacológica con GC7, solo o en combinación con TGFβ1.....	100
3.5.1.	La inhibición farmacológica con GC7 inhibe la expresión de <i>eIF5A</i> y <i>eIF5A</i> -Hip	101
3.5.2.	El tratamiento con GC7 inhibe la expresión de marcadores de fenotipo mesenquimal en las células H1395- <i>eIF5A2</i>	103
3.5.3.	El tratamiento con GC7 inhibe la expresión de proteínas involucradas en la EMT en las células H1395- <i>eIF5A2</i>	105
3.6.	El tratamiento con TGFβ1 induce la localización en la membrana plasmática de <i>eIF5A2</i> -Hip.....	108
4.	Papel de <i>eIF5A2</i> en la traducción de proteínas.....	109
4.1.	La sobreexpresión de <i>eIF5A2</i> aumenta la cantidad de polisomas en las células..	110
4.2.	<i>eIF5A2</i> -Hip colocaliza con puromicina en puntos de traducción activos	111

5. Estudio de eIF5A2 <i>in vivo</i> en modelos de xenotrasplante en ratón	114
5.1. La sobreexpresión de eIF5A2 promueve la formación de masas de células metastásicas	114
6. Expresión de eIF5A2 en muestras de pacientes de CPNM.....	116
DISCUSIÓN	125
1. Características fenotípicas de las líneas de CPNM estudiadas.....	126
2. Inhibición génica de eIF5A.....	126
3. Efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre la expresión de eIF5A.....	128
4. Papel de eIF5A2 en la señalización por TGFβ1.....	130
5. La inhibición de eIF5A2 mediante GC7 como posible diana terapéutica.....	134
6. Modelos experimentales <i>in vivo</i> para el estudio de la función de eIF5A.....	135
7. Relación de eIF5A2 con la maquinaria de traducción.....	137
8. Modelo de acción y perspectivas futuras.....	138
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	145
CONTRIBUCIONES	169
ANEXO	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las poliaminas.....	3
Figura 2. Esquema del metabolismo de las poliaminas.....	4
Figura 3. Rasgos distintivos y características promotoras del cáncer.	8
Figura 4. Esquema de los cambios morfológicos y de expresión génica y proteica propios de la activación del programa de EMT.....	16
Figura 5. Esquema de las vías de señalización que activan el programa de EMT.	19
Figura 6. Estructura del factor de transcripción eIF5A.....	25
Figura 7. Ruta de hipusinación del factor eIF5A, generando el factor activo eIF5A hipusinado.	29
Figura 8. Modelo de la función de eIF5A en la traducción de proteínas con motivos de prolinas consecutivas.....	32
Figura 9. Construcción del plásmido pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP.	41
Figura 10. Expresión basal de E-cadherina y vimentina en las líneas celulares de CPNM A549, PC9, H1395 y H441.....	65
Figura 11. Expresión basal de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en las líneas celulares de CPNM A549, PC9, H1395 y H441.....	67
Figura 12. Secuencia de oligonucleótidos específicos para el silenciamiento por ARNpi contra eIF5A1 y eIF5A2.....	68
Figura 13. Expresión de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en las líneas de CPNM A549 y H1395.	70
Figura 14. Ensayos de viabilidad por MTS en las líneas de CPNM A549 y H1395.	71
Figura 15. Imágenes de contraste de fases en las líneas de CPNM A549 y H1395... ..	73
Figura 16. Análisis de la migración celular mediante ensayos de herida en las líneas de CPNM A549 y H1395.....	75
Figura 17. Expresión de fibronectina, E-cadherina, N-cadherina y vimentina en las líneas de CPNM A549 y H1395.....	78
Figura 18. Expresión de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 en las líneas de CPNM A549 y H1395.....	82
Figura 19. Imágenes de microscopía de fluorescencia en las líneas de CPNM A549 y H1395.....	84

Figura 20. Generación de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.	87
Figura 21. Citometría de flujo en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2 para analizar las poblaciones de células GFP positivas en distintos pases del cultivo celular.	89
Figura 22. Ensayos de viabilidad por MTS en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.....	91
Figura 23. Curvas de dosis letal media en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.....	91
Figura 24. Análisis de la migración celular mediante ensayos de herida en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.	93
Figura 25. Expresión de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.....	95
Figura 26. Expresión de fibronectina, E-cadherina y N-cadherina en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.	97
Figura 27. Expresión de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.	100
Figura 28. Expresión de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en la línea estable H1395-eIF5A2.	102
Figura 29. Expresión de fibronectina, E-cadherina y N-cadherina en la línea estable H1395-eIF5A2	104
Figura 30. Expresión de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 en la línea estable H1395-eIF5A2.....	107
Figura 31. Imágenes de microscopía de fluorescencia en la línea estable H1395-eIF5A2.	109
Figura 32. Perfil polisomal de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.....	111
Figura 33. Imágenes de microscopía de fluorescencia en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.....	113
Figura 34. Estudio de la capacidad iniciadora de tumores y capacidad invasiva de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2 en ratones NSG.....	115
Figura 35. Inmunohistoquímica de la micromatriz de tejido de las muestras LF01, LF05, LF09, LF15, LF19, LF20, LF21 y LF29.	120
Figura 36. Matriz de correlación entre eIF5A2 y Ki67.....	122

Figura 37. Curvas de supervivencia de pacientes de CPNM con relación a la expresión de eIF5A2.	123
Figura 38. Modelo de acción planteado para eIF5A2. Creado con BioRender.com. .	139
Figura S1. Comprobación de la linealidad entre la densidad celular y la absorbancia a 490nm por MTS.	176
Figura S2. Secuencia proteica de fibronectina, E-cadherina, N-cadherina, vimentina, FHOD1, p85, MTA1 ezrina y SNAI1.....	180

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en qPCR.	48
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot y su uso.	51
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia y su uso.	54
Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia y su uso.	55
Tabla 5. Características clínico-patológicas de los pacientes.	61
Tabla 6. Resumen de las características clínicas e inmunohistoquímicas de las muestras de los pacientes LF01, LF05, LF09, LF15, LF19, LF20, LF21 y LF29.	121

ABREVIATURAS

- ADC – Adenocarcinoma
- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- ADNc - Ácido desoxirribonucleico complementario
- ARNm – Ácido ribonucleico mensajero
- ARNt – Ácido ribonucleico transferente
- ARNpi – Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
- BSA - Albúmina sérica bovina
- CDH1 - Cadherin 1, codifica para E-cadherina
- CDH2 - Cadherin 2, codifica para N-cadherina
- CHX - Cicloheximida
- CPNM – Carcinoma de pulmón no microcítico
- CSC - Del inglés *cancer stem cell* (Célula madre tumoral)
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DHS - Desoxihipusina sintasa
- DL50 – Dosis letal media
- DMEM - Del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (medio de Eagle modificado por Dulbecco)
- DOHH - Desoxihipusina hidroxilasa
- ECM - Matriz extracelular
- EIF5A1 - Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1, codifica para eIF5A1
- EIF5A2 - Eukaryotic initiation factor 5A isoform 2, codifica para eIF5A2
- EMT - Del inglés *epithelial to mesenchymal transition* (Transición epitelio-mesénquima)
- EV – Del inglés *Empty Vector* (Vector vacío)
- EZR – ezrina, codifica para ezrina
- FHOD1 – Del inglés *formin homology 2 domain containing 1*
- FN1 – Formin 1, codifica para FHOD1
- G418 - Geneticina
- GFP – Del inglés *green fluorescent protein* (Proteína de fluorescencia verde)
- GC7 – N1-guanil-1,7-diamino-heptano
- MTA1 - Del inglés *metastasis-associated 1*, codifica para MTA1
- MTS - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium)
- ODC - Ornitina descarboxilasa

- P85 - Del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase 85 KDa regulatory subunit alpha*, codifica para p85
- PAOX - Del inglés *peroxisomal N1-acetylpolyamine oxidase*
- PBS – Del inglés *phosphate buffered saline* (Tampón fosfato salino)
- PFA – Paraformaldehído
- PTS - Del inglés *polyamine transport system* (sistemas de transporte de poliaminas)
- qPCR – Del inglés *quantitative polymerase chain reaction* (Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa)
- RNPm – Ribonucleoproteína unida a mensajero
- SASP – Del inglés *senescence-associated secretory phenotype* (fenotipo secretor asociado a senescencia)
- SLE – Supervivencia libre de enfermedad
- SNAI1 - Del inglés *snail family transcriptional repressor 1*, codifica para SNAI1
- SSAT – Del inglés *spermidine/spermine N1-acetyltransferase*
- TGFβ1 – Del inglés, *Transforming Growth Factor beta 1* (Factor de crecimiento transformante beta 1)
- TME – Del inglés *tumoral microenvironment* (microambiente tumoral)
- VIM – Vimentin, codifica para vimentina

INTRODUCCIÓN

1. Poliaminas

Las poliaminas son compuestos orgánicos policatiónicos que se encuentran en todos los organismos vivos. Se sintetizan a través de la L-ornitina o mediante la descarboxilación de aminoácidos (Sagar *et al.* 2021). Son esenciales para el crecimiento celular y están implicadas en funciones críticas como el desarrollo embrionario, la diferenciación y la proliferación (Novita Sari *et al.* 2021).

Los primeros estudios realizados que las identificaron los realizó Antonie van Leeuwenhoek en 1678, cuando observó una sustancia cristalina a partir de una muestra de semen seco humano. No fue hasta 1924 que Roshenheim consiguió sintetizar la putrescina, la espermina y la espermidina, dando inicio a una nueva era en los estudios de las poliaminas (Bachrach 2010).

1.1. Tipos y estructura

Las poliaminas que se producen en mamíferos son tres, la putrescina, la espermina y la espermidina. Además de estas, en plantas y bacterias se sintetiza la agmatina, que aunque está presente en la flora intestinal, no está claro que tenga una función biológica importante (Pegg 2009).

Las poliaminas con compuestos alifáticos de bajo peso molecular, que contienen grupos amino repartidos a lo largo de su cadena y están cargadas positivamente a pH fisiológico (Novita Sari *et al.* 2021). La putrescina es una diamina, al contener dos grupos amino. La espermidina es una triamina, al tener tres grupos amino en su estructura. Por último, la espermina se clasifica como una tetramina, al contener cuatro grupos amino (Fig. 1).

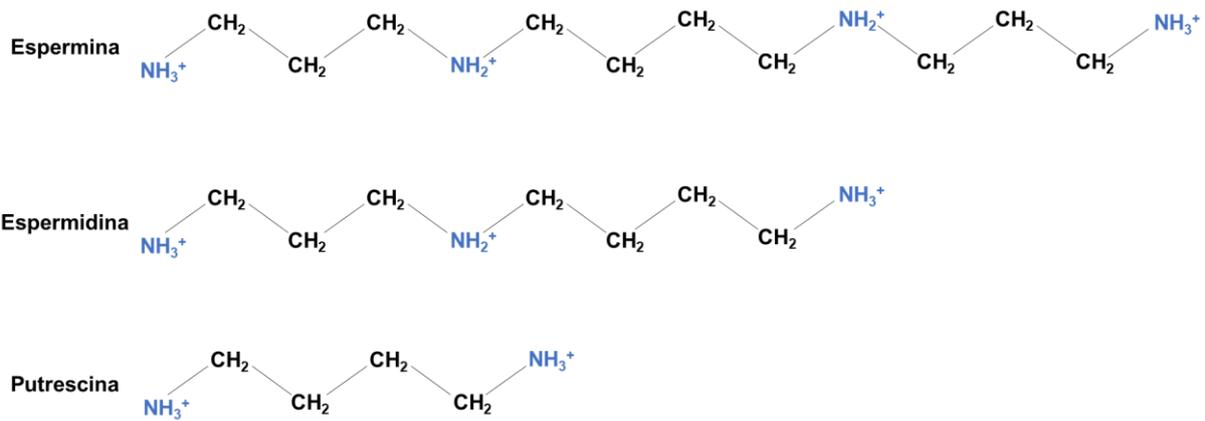


Figura 1. Estructura de las poliaminas.

1.2. Metabolismo de las poliaminas

En el metabolismo de las poliaminas se incluyen aquellas reacciones que dan lugar a su biosíntesis, su catabolismo y su transporte.

En primer lugar, la síntesis de las poliaminas ocurre en el citoplasma celular. Se sintetizan a partir de los aminoácidos metionina y arginina, que se ingieren en la comida. Por un lado, la enzima arginasa descompone la arginina para dar lugar a la ornitina. La ornitina también puede producirse como un producto del ciclo de la urea. Esta ornitina es entonces descarboxilada por la ornitina descarboxilasa (ODC) produciendo la putrescina, poliamina precursora de la espermidina y la espermina. Por otro lado, la metionina se transforma en S-adenosil-L-metionina (AdoMet), que se descarboxila por la enzima AMD1 para generar el residuo DcAdoMet. Este residuo es empleado por la espermidina sintasa (SRM) para transferir su grupo aminopropil a la putrescina, generando así la espermidina. La adición a la espermidina de un nuevo grupo aminopropil del residuo DcAdoMet por la espermina sintasa (SMS) da lugar a la espermina (Pegg 2009; Miller-Fleming *et al.* 2015; Sagar *et al.* 2021; Novita Sari *et al.* 2021).

Una vez sintetizadas, las poliaminas son transportadas a través de sistemas específicos de transporte de poliaminas (PTS), que requieren gasto energético y son saturables y dependientes de concentración, tiempo y temperatura (Palmer and Wallace 2009). Estos PTS no se han descrito completamente, pero algunos de los sistemas implicados son el transportador de membrana SLC22A1, que ayudaría a la captación de poliaminas al interior de la célula, y la proteína MDR1 de la superfamilia de transportadores dependientes de ATP, que intervendría en la salida de moléculas similares a las poliaminas (Abdulhussein and Wallace 2013). Mediante estos canales también pueden entrar poliaminas a las células, lo que aumentará la cantidad de

poliaminas disponibles y activará al antizima (AZ) que a su vez inhibe la enzima ODC, deteniendo así la síntesis de más poliaminas.

Finalmente, los mecanismos catabólicos existentes en el metabolismo de las poliaminas permiten que las poliaminas superiores vuelvan a transformarse en sus precursores, putrescina y espermidina. La espermina se oxida en espermidina mediante la acción de la espermidina oxidasa (SMOX). Además, a través de las enzimas espermina/espermidina N1-acetiltransferasa (SSAT), la espermina y la espermidina pueden acetilarse y secretarse al espacio extracelular, o bien convertirse en espermidina o putrescina mediante la enzima N1-acetilpoliamina oxidasa peroxisomal (PAOX) (Battaglia *et al.* 2014; Novita Sari *et al.* 2021).

Un resumen de las rutas detalladas se muestra esquematizado en la Figura 2.

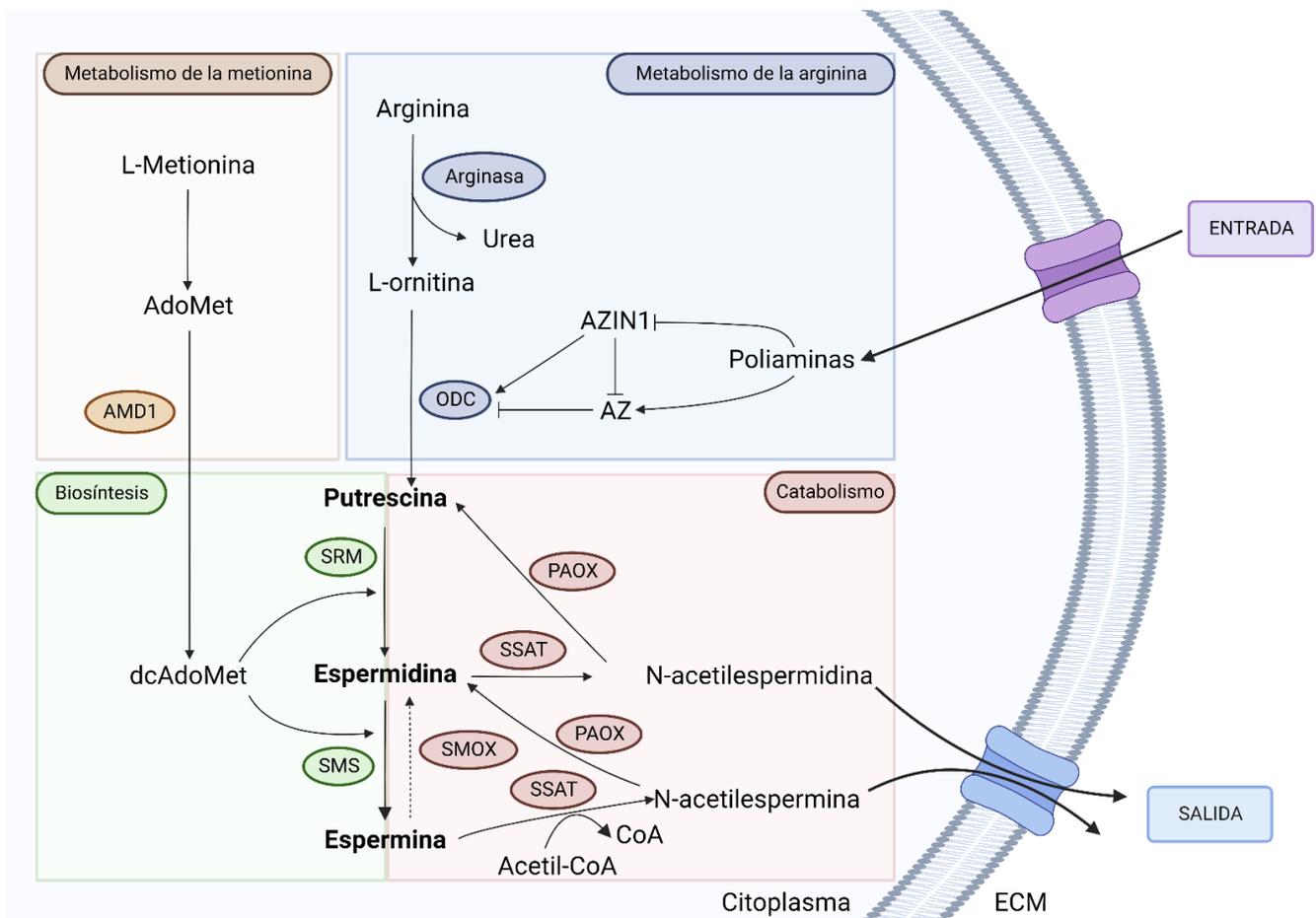


Figura 2. Esquema del metabolismo de las poliaminas. En él se indican las rutas que participan en la biosíntesis, el catabolismo y el transporte de las poliaminas. Creado con BioRender.com, basada en (Novita Sari *et al.* 2021).

1.3. Funciones de las poliaminas

Los procesos en los cuales las poliaminas están implicadas incluyen la diferenciación y proliferación celular, la regulación génica, la señalización celular, la apoptosis y la traducción (Sagar *et al.* 2021).

En primer lugar, las poliaminas son necesarias para la correcta proliferación celular. Los tejidos de rápido crecimiento tienen un mayor contenido en poliaminas. Señales regenerativas y estímulos hormonales que promueven el crecimiento activan la síntesis de poliaminas (Pegg 2016). Además, la eliminación de la espermidina y la espermina aumenta la actividad de la enzima SSAT y provoca la disminución de la viabilidad celular y un paro en el crecimiento, induciendo la apoptosis (Mandal, Mandal, and Park 2015).

Por otro lado, las poliaminas son moléculas que a pH fisiológico están cargadas positivamente, por lo que pueden unirse a grupos ácidos de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos de membrana (Pegg 2009). Las poliaminas están implicadas en la regulación génica a través de multitud de procesos, como pueden ser la condensación de la cromatina o la conformación del ADN. Una elevada cantidad de poliaminas en la célula puede provocar la solubilización de la cromatina, haciendo accesible la cadena de ADN a la unión con la maquinaria de transcripción y replicación. También se ha visto que son capaces de activar la quinasa CK2 que, entre otras, fosforila proteínas como c-myc y p53 (Childs, Mehta, and Gerner 2003).

Las poliaminas también juegan un papel importante en la regulación de canales iónicos de transporte, como pueden ser los canales del receptor de glutamato, que median la transmisión sináptica de señales excitadoras en el cerebro; los canales Kir, que regulan la cantidad de potasio dentro de las células y el potencial de membrana y otros canales relacionados con el transporte de sodio o calcio intracelular (Pegg 2009).

Por último, las poliaminas actúan sobre la maquinaria de traducción para estimular la síntesis de proteínas. Intervienen en la regulación de la traducción de mRNAs que codifican proteínas clave en procesos metabólicos y regulatorios, como la antizima (AZ), el inhibidor 1 de la antizima (AZIN1) o la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC) (Dever and Ivanov 2018). Además, la espermidina sirve como precursor para la modificación post-traducciona del factor de traducción eIF5A, necesario para la traducción de proteínas difíciles de traducir por su rigidez, como son las proteínas con motivos de prolina consecutivas en su secuencia. Esta modificación post-traducciona inusual se conoce como hipusinación. Para que ocurra, la espermidina transfiere su residuo aminobutilo a la lisina 50 de eIF5A, generando el aminoácido hipusina, en una reacción enzimática que es imprescindible para la actividad de eIF5A (M. H. Park and

Wolff 2018). Más adelante en este trabajo se profundizará sobre esta modificación post-traducciona l y el papel de eIF5A en la síntesis de proteínas.

1.4. Poliaminas y cáncer

Los niveles de poliaminas, así como de las enzimas que intervienen en su síntesis, están frecuentemente desregulados en varios tipos de cáncer, asociándose su aumento con un mayor crecimiento tumoral en cánceres como el de próstata, pulmón, mama o colorrectal, entre otros (Arruabarrena-Aristorena, Zabala-Letona, and Carracedo 2018). De esta forma, el exceso de poliaminas se acumula en las células tumorales, tejidos, orina y el suero de pacientes con cáncer, lo que ha permitido que se empleen como marcador de diagnóstico (Novita Sari *et al.* 2021; M. H. Park and Igarashi 2013).

Esta desregulación positiva, llevó a investigar la ruta de las poliaminas como posible vía terapéutica, estudiando inhibidores de las proteínas que intervienen en su metabolismo o sintetizando análogos de poliaminas. El primero que se testó fue un inhibidor de la ODC, el α -difluorometilornitina (DMFO). Pese a que se realizaron ensayos *in vitro* en los que se tuvo éxito inhibiendo el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer, en ensayos *in vivo* resultó ineficaz, tanto solo como en combinación con otros fármacos. También se han testado varios inhibidores de la adenosilmetionina descarboxilasa, algunos de los cuales han llegado a emplearse en ensayos clínicos en fase I y fase II. Respecto a los análogos sintéticos de poliaminas, lo que se busca es que sean capaces de interrumpir la síntesis natural de las poliaminas y puedan competir con ellas por su absorción celular, reduciendo la cantidad de poliaminas presente en las células, siendo lo suficientemente distintos a las poliaminas como para no impedir a las poliaminas realizar sus funciones. Existen análogos de primera, segunda y tercera generación, que han mostrados resultados positivos como agentes antiproliferativos y como causantes de apoptosis celular, aunque ninguno ha sido exitoso en ensayos clínicos por el momento (Damiani and Wallace 2018).

Otra de las estrategias en las que se han utilizado las poliaminas para el diseño de tratamientos contra el cáncer, es emplearlas como vehículos para la distribución de fármacos. La captación de poliaminas a través de los PTS es mayor en células tumorales, y además, los PTS no se restringen a las poliaminas naturales, si no que aceptan otras moléculas como análogos o poliaminas conjugadas con fármacos que sean estructuralmente similares a las poliaminas naturales (Novita Sari *et al.* 2021).

En el ámbito de la quimioprevención como estrategia en aquellas personas que tienen un riesgo elevado de padecer ciertos cánceres, interferir en el metabolismo de

las poliaminas ha resultado ser una herramienta efectiva. En este aspecto, el fármaco más empleado es el DFMO, que solo, o en combinación con otros fármacos esteroideos o antiinflamatorios, ha demostrado tener éxito en la prevención de cánceres como el de colon, próstata, piel y neuroblastomas (Damiani and Wallace 2018).

Por último, además de la relación entre las poliaminas y el cáncer, cabe mencionar que existen numerosos estudios que indican el posible papel que pueden tener las poliaminas, su metabolismo y su abundancia, en procesos como el estrés y la memoria o en enfermedades como Alzheimer, Huntington o Parkinson (Sagar *et al.* 2021).

2. Cáncer

El cáncer es el término general que se emplea para hacer referencia a un conjunto de enfermedades en las cuales las células dejan de responder a las señales que normalmente dirigen su comportamiento y empiezan a dividirse descontroladamente, generando masas tumorales y pudiendo invadir tejidos adyacentes o diseminarse a otras partes del cuerpo en un proceso conocido como metástasis (World Health Organization 2022; National Cancer Institute at the National Institutes of Health 2021).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Actualmente, se conocen más de 100 tipos distintos de cáncer, que se nombran normalmente en función del órgano o tejido donde se origina el tumor primario. Los más comunes en 2022, en función de los nuevos casos diagnosticados son los de mama, pulmón, colorrectal, próstata, de piel y estómago, siendo el de pulmón el causante del mayor número de muertes asociadas al cáncer (World Health Organization 2022).

2.1. Rasgos distintivos

En el año 2000, Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000) publicaron un trabajo seminal en el que revisaban y describían aquellas propiedades que caracterizan las células del cáncer y las clasificaron en seis rasgos distintivos o *hallmarks*. Esta revisión fue ampliada en el año 2011 (Hanahan and Weinberg 2011), donde se incluyeron dos características que resultaban favorables para el desarrollo y la progresión del cáncer y dos nuevos *hallmarks*. Recientemente, en 2022, Hanahan (Hanahan 2022) ha publicado una nueva revisión en la que amplía sus trabajos anteriores en dos características promotoras más y dos rasgos distintivos de las células tumorales (Fig. 3).



Figura 3. Rasgos distintivos y características promotoras del cáncer. Modificada de (Hanahan 2022).

Los rasgos distintivos se describen como las capacidades funcionales que adquieren las células al convertirse en células tumorales. Según Hanahan y Weinberg, son diez. A continuación, se describen brevemente los detalles más importantes de estas características y rasgos distintivos de las células cancerosas:

- Señalización proliferativa sostenida

Los tejidos y células normales controlan estrictamente la producción de señales de crecimiento y división celular, con el fin de garantizar una adecuada homeostasis del número de células, manteniendo así el correcto funcionamiento y organización de los tejidos. Por el contrario, las células tumorales son capaces de desregular estas señales promoviendo su proliferación crónica. Las células tumorales emplean varios mecanismos para alcanzar este punto, como la secreción de factores de crecimiento por ellas mismas o por células de su entorno a las que estimulan, aumentando el número de receptores en su membrana, modificando los receptores para que puedan activarse

independientemente del ligando, activando de manera constitutiva componentes de las rutas de señalización que actúan tras la activación de los receptores o evadiendo las señales negativas que atenúan la proliferación (Lemmon and Schlessinger 2010; Witsch, Sela, and Yarden 2010).

- Evasión de señales supresoras del crecimiento

Los supresores tumorales actúan de diversas formas para limitar el crecimiento y la proliferación celular, y las células tumorales son capaces de inactivarlos o evadir su señalización para continuar proliferando. Entre estos supresores tumorales destacan la proteína del retinoblastoma (pRb) y la proteína tumoral 53 (p53). pRb recibe señales extracelulares e intracelulares y decide si una célula debe continuar con su ciclo celular o no (Lipinski and Jacks 1999). Por su parte, p53 recibe información del interior celular, detectando anomalías como daños en el genoma o condiciones subóptimas en los niveles de glucosa u oxígeno, deteniendo el ciclo celular cuando es necesario (Lane 1992). Además de evadir a estos supresores tumorales, las células tumorales emplean otras herramientas para evitar este tipo de señales inhibitorias del crecimiento, como evadir las señales de inhibición del crecimiento generadas por contacto célula-célula en poblaciones celulares de alta densidad o el cambio en la actividad del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), que pasa de tener efectos antiproliferativos a promover la proliferación y la transición epitelio-mesénquima (EMT) en estados más avanzados de los tumores.

- Resistencia a la muerte celular

La muerte celular programada mediante apoptosis supone una barrera contra el desarrollo del cáncer. La apoptosis puede inducirse mediante señales extracelulares que activan la respuesta extrínseca, o mediante señales intracelulares que activan la respuesta intrínseca. En ambos casos, se produce la activación de las caspasas 8 y 9 respectivamente, que inician la cascada proteolítica que lleva a la desintegración de la célula. Las células tumorales son capaces de esquivar la apoptosis mediante varios mecanismos, como la sobreexpresión del inhibidor de apoptosis BCL-2 o mutaciones en p53 que inhiben su actividad pro-apoptótica, permitiendo así que células tumorales con mutaciones o ADN dañado puedan seguir acumulándose, fomentando también el aumento de la resistencia a la quimioterapia (Strasser and Vaux 2020).

- Inducción de la angiogénesis

El desarrollo de la vasculatura es un proceso muy importante durante la embriogénesis, que implica la unión de células endoteliales en tubos (vasculogénesis) y la creación de nuevos vasos a partir de los ya existentes (angiogénesis). En etapas adultas, aparte de para procesos como el cierre de heridas o durante el ciclo reproductivo femenino, estos procesos permanecen quiescentes. Sin embargo, la alta tasa proliferativa de las células tumorales hace que estas requieran del aporte continuo de nutrientes y oxígeno, así como de poder eliminar desechos metabólicos, por lo que el proceso de angiogénesis está continuamente activo. En esto, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un papel clave, y la liberación de otros factores como angiopoyetinas o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también están implicados en la activación de la angiogénesis. Sin embargo, la rapidez con la que se desarrollan estos nuevos vasos afecta a su maduración, por lo que suelen ser vasos defectuosos. Esto implica modificaciones en el microambiente tumoral (TME), desarrollando hipoxia, la disminución de la infiltración y la actividad de las células inmunitarias y un mayor riesgo de diseminación metastásica (Viallard and Larrivé 2017).

- Activación de la invasión y la metástasis

La invasión y metástasis es un proceso complejo que engloba multitud de pasos, en lo que se conoce como la cascada de invasión-metástasis. En primer lugar, las células tumorales son capaces de invadir localmente el tejido que las rodea, intravasarse en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos y alcanzar puntos lejanos del organismo. Estas células podrán entonces extravasarse los vasos y penetrar en el parénquima de estos tejidos lejanos, generando pequeños nódulos de células conocidos como micrometástasis. Finalmente, estos nódulos crecen colonizando el tejido y formando tumores. Un proceso clave en el desarrollo de estos procesos es la EMT, mediante la cual las células epiteliales son capaces de adquirir características mesenquimales a través de varias etapas celulares. La EMT está asociada con la iniciación tumoral, la invasión, la metástasis y la resistencia a terapias anticancerígenas (Pastushenko and Blanpain 2019). Sobre ella se hablará en profundidad en el apartado 3 de este trabajo.

- Inmortalidad replicativa

Las células normales pueden llevar a cabo un número limitado de ciclos de crecimiento y división, tras los cuales las células pueden entrar, o bien en un periodo irreversible de senescencia, en el cual las células son viables, pero no proliferan o entran

en una fase de crisis que conduce a la muerte celular. En esta limitación del número de divisiones está muy implicada la longitud de los telómeros, que protegen el extremo de los cromosomas y se van acortando en las distintas rondas de división, hasta que son incapaces de proteger el ADN de los cromosomas. Las células tumorales han desarrollado mecanismos para mantener la longitud de los telómeros y así evitar la senescencia y/o apoptosis y poder dividirse de manera indefinida. Estos mecanismos implican la expresión constitutiva de la enzima telomerasa y la activación de la vía alternativa de alargamiento de los telómeros, basada en procesos de recombinación homóloga dependiente de intercambios o dependiente de la síntesis de ADN telomérico (de Vitis, Berardinelli, and Sgura 2018).

- Evasión del sistema inmune

Las células y tejidos están siendo vigilados constantemente por el sistema inmune, que es capaz de reconocer y eliminar cualquier célula que detectan como una amenaza para el organismo, incluyendo la mayoría de las células tumorales que forman parte de los tumores nacientes. Por tanto, los tumores sólidos que acaban teniendo lugar en el organismo han sido capaces de evadir esta vigilancia de alguna forma. La supresión de la inmunidad tumoral y la creación de un entorno inmunosupresor parece ser una característica propia de las células madre tumorales (CSC), que son capaces de fomentar este entorno mediante distintos mecanismos como el fallo en la presentación de antígenos, la regulación positiva de ligandos inhibidores de células *Natural Killer* o la secreción de inmunosupresores como TGF β , IL-6 y CCL20, entre otros (Tsuchiya and Shiota 2021).

- Desregulación del metabolismo energético

Las células tumorales deben ajustar su metabolismo energético para poder atender las necesidades metabólicas que conllevan su proliferación y crecimiento sostenido. Para ello, las células tumorales reprograman su metabolismo de la glucosa, y en vez de emplear la glicólisis como las células normales, emplean la vía glicolítica anaeróbica para obtener energía, incluso en presencia de oxígeno, en un fenómeno conocido como el “efecto Warburg” (Liberti and Locasale 2016). La desregulación de vías oncogénicas o supresoras de tumores como las de PI3K-AKT, Myc y Hippo median la expresión génica de genes relacionados con el metabolismo, aumentando así la actividad de enzimas metabólicos. Además, la desregulación de otras vías metabólicas contribuye a fallos en la transducción de señales celulares, proporcionando energía, potencial redox

y los componentes necesarios para la proliferación celular sin restricciones (Jae Hyung Park, Pyun, and Park 2020) .

- Plasticidad fenotípica

Durante la progresión del cáncer, las células tumorales sufren cambios moleculares y fenotípicos que se denominan en conjunto plasticidad celular, que permiten a las células revertir su estado de célula diferenciada y adquirir características de CSC. Estos cambios se producen en respuesta a señales en el TME o alteraciones genéticas y epigenéticas, y contribuyen a la heterogeneidad tumoral y por tanto, a que su tratamiento sea más complejo. Los procesos que dan lugar a esta plasticidad celular son tres. La dediferenciación hace referencia a la readquisición de características de célula progenitora por parte de células ya diferenciadas. En segundo lugar, el bloqueo de la diferenciación impide que células parcialmente diferenciadas continúen su progreso hacia una diferenciación completa. Finalmente, la transdiferenciación, en la cual células ya diferenciadas son capaces de cambiar a otro tipo células también diferenciado (Yuan, Norgard, and Stanger 2019; Gupta *et al.* 2019).

- Senescencia celular

Generalmente, la senescencia celular se refiere a un estado irreversible en el cual células dañadas ya no pueden continuar dividiéndose. En esta condición, las células sufren una serie de cambios como son una detención prolongada del ciclo celular, modificaciones transcripcionales, cambios morfológicos y en el metabolismo y la activación de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). La senescencia juega un papel doble en el cáncer, ya que en determinadas condiciones puede suponer un efectivo supresor tumoral al bloquear la proliferación de células dañadas. Pero por otro lado, el SASP puede promover la progresión del cáncer al inducir el crecimiento de células preneoplásicas y modificar el TME. Por ejemplo, mediante la activación de proteasas que degradan la matriz extracelular (ECM) se favorece la invasión y la motilidad celular (Roger, Tomas, and Gire 2021).

Por otro lado, las características promotoras que impulsan a las células a adquirir estos rasgos son cuatro:

- Inestabilidad genómica

La inestabilidad genómica se define como el aumento de la frecuencia mutacional en el genoma. En tejidos normales, existen mecanismos capaces de detectar y resolver estos fallos en el ADN, manteniendo la tasa de mutaciones baja a lo largo de las distintas generaciones. Sin embargo, las células tumorales tienen defectos en estos sistemas, lo que permite la acumulación de mutaciones, llevando a las células a su proliferación descontrolada y por tanto, a un aumento de su supervivencia y la progresión del cáncer (H. Li, Zimmerman, and Weyemi 2021).

- Inflamación

La presencia de células del sistema inmune en todos los tipos de tumores, de pequeñas infiltraciones a grandes inflamaciones visibles mediante técnicas histoquímicas, es algo generalizado. Señales inflamatorias puntuales y agudas pretenden activar el sistema inmune innato y la respuesta adaptativa con el fin de dar una respuesta terapéutica y eliminar las células tumorales. Sin embargo, la inflamación puede cronificarse y las células tumorales continúan liberando al TME factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos, factores de supervivencia, enzimas que modifican la matriz o especies reactivas de oxígeno que tienen un efecto mutagénico en las células cercanas. Esto tiene un efecto patológico en el tejido, favoreciendo la adquisición de diferentes *hallmarks* por las células tumorales, promoviendo así la supervivencia, proliferación, invasión, metástasis o quimioresistencia tumoral (Singh *et al.* 2019).

- Reprogramación epigenética

Los cambios epigenéticos en el ADN son modificaciones que no afectan a la secuencia de ADN pero que estabilizan la expresión génica a lo largo de las diferentes etapas celulares, facilitando la respuesta a señales ambientales o del desarrollo. Estos cambios incluyen modificaciones en los genes, las histonas y la estructura de la cromatina. Con relación al cáncer, un estado restrictivo de la cromatina puede impedir la correcta inducción de genes supresores de tumores o, por el contrario, un estado permisivo de la cromatina puede activar oncogenes o funciones celulares no fisiológicas, contribuyendo en ambos casos a la patogénesis del cáncer (Flavahan, Gaskell, and Bernstein 2017). Así, las modificaciones epigenéticas suponen una herramienta distinta a la inestabilidad genómica y las mutaciones para conseguir una mayor plasticidad celular y que las células tumorales alcancen los distintos rasgos distintivos del cáncer.

- Microbiomas polimórficos

Se conocen pocos microbios que causen cáncer directamente, pero existen evidencias de que algunas especies de bacterias en el colón y el intestino están implicadas en la modulación cancerígena, por ejemplo, estimulando señales proliferativas o inhibiendo el crecimiento. Estudios recientes han afirmado que la microbiota está presente en los tumores y que, por tanto, podría emplearse como una estrategia terapéutica (Sepich-Poore *et al.* 2021).

3. La transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) se define como un cambio reversible de fenotipo durante el cual células epiteliales pierden su polaridad apical-basal, modifican su citoesqueleto y disminuyen sus uniones célula-célula para adquirir, individual o colectivamente, características de un fenotipo mesenquimal, aumentando su motilidad y capacidad invasiva. Este proceso puede ir seguido de la transición inversa, conocida como transición mesénquima-epitelio (MET), en la cual las células mesenquimales adquieren propiedades de células epiteliales (J. Yang *et al.* 2020).

Los estudios acerca de la EMT se iniciaron por el interés que existía en entender los cambios que experimentaban los tejidos durante la embriogénesis y el desarrollo. En este aspecto, la pionera fue Elizabeth Hay, que en 1985 demostró que las células epiteliales de la córnea de un embrión de pollo respondían a moléculas de la ECM aplanando su superficie basal, reorganizando el citoesqueleto de actina y aumentando la producción de estroma. También observó que estos cambios inducían el alargamiento de fibroblastos y pseudópodos (Hay 1985). Posteriormente, los estudios se centraron en tratar de identificar los factores que dirigían la EMT. Así, estudios genéticos llevados a cabo con *Drosophila melanogaster*, permitieron la identificación de los factores de transcripción SNAIL y Twist (Leptin 1991), y posteriormente el factor Slug (Snai2) se identificó como un inductor de la gastrulación de la cresta neural en polluelos (Nieto *et al.* 1994).

Durante la EMT ocurren una serie de procesos moleculares entre los que se incluyen la activación de factores de transcripción específicos, la expresión de proteínas específicas de superficie celular, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la ECM y cambios en la

expresión de microARNs específicos (Kalluri and Weinberg 2009). Sobre estos eventos, se tratará en profundidad a continuación.

3.1. Cambios morfológicos y reorganización del citoesqueleto

Las uniones célula-célula son imprescindibles para garantizar la integridad del epitelio, lo que se consigue a través de distintos tipos de unión, como son las uniones estrechas subapicales, las uniones adherentes, uniones gap y los desmosomas laterales. Durante la EMT, es necesario que estas uniones se deshagan y las proteínas que forman parte de ellas se degraden o reubiquen en la célula. Huang *et al.* (Huang, Guilford, and Thiery 2012) describieron en 2012 los eventos que conllevan la destrucción de estas uniones que tienen lugar al iniciar la EMT.

En primer lugar, se rompen las uniones estrechas. La ocludina, una proteína presente en estas uniones, forma un complejo en el receptor de TGF β 1 (TGF β R1) y PAR6, pero tras la estimulación de la EMT con TGF β , TGF β R2 se recluta en este complejo y fosforila PAR6, iniciando una cascada que provoca la degradación de RhoA, lo que interfiere con el citoesqueleto de actina. A continuación, se desestabilizan las uniones adherentes a causa de una disminución de los niveles de E-cadherina y β -catenina producida por distintos mecanismo que llevan a su degradación. En el caso de los desmosomas, estos se deshacen al mismo tiempo que la uniones adherentes, mediante la fosforilación de la placofilina 2, lo que a su vez desestabiliza la desmoplaquina, una proteína clave en la integridad estructural de los desmosomas. Una vez desanclados estos complejos de unión, proteínas que formaban parte de ellos como la β -catenina, la p120-catenina y la placofilina 2, se localizan en el núcleo gracias a las señales de localización nuclear que poseen. Allí, se ha observado que la β -catenina podría participar en la inducción de la EMT mediante la activación de Wnt y ZEB1 (Huang, Guilford, and Thiery 2012).

La reorganización del citoesqueleto de actina es otro paso clave en la progresión de la EMT. Las células en las que se activa el proceso de EMT reorganizan las fibras de estrés de actina adquiriendo una forma que permite el alargamiento dinámico de la célula y la motilidad direccional, creando proyecciones en la membrana como son los lamelipodios y los filopodios, que actúan como extensiones sensoriales del citoesqueleto y facilitan la movilidad y la invasión celular gracias a su función proteolítica degradando la ECM (Lamouille, Xu, and Derynck 2014). Para dirigir la motilidad, es muy importante la polaridad frontal-trasera, dirigida mayoritariamente por CDC42. Al romperse las uniones estrechas subapicales, CDC42 y el complejo PAR6-aPKC se relocalizan en el borde celular y mediante la estimulación quimiotáctica impulsan la

relocalización del centrosoma y el aparato de Golgi a esa zona de la célula. Los centros organizadores de microtúbulos asociados con ellos promueven el crecimiento de los microtúbulos hacia el frente de la célula, facilitando la formación de frentes protusivos. Los microtúbulos ayudan a la formación de los lamelipodios mediante el reclutamiento del complejo CLIP-170-mDia1, que acelera la elongación de los filamentos de actina, y además, ayudan a establecer la polaridad frontal-trasera mediante el transporte de quinasas y factores de intercambio de nucleótidos de guanina a las Rho GTPasas del borde celular (Rubtsova, Zhitnyak, and Gloushankova 2021). Las Rho GTPasas son las encargadas de regular la dinámica de la actina durante la EMT y controlar su reordenamiento. RhoA promueve la formación de fibras de estrés de actina a la vez que se localiza en la parte trasera de la célula y ayuda a conseguir la polaridad frontal-trasera mediante el desmontaje de los complejos de adhesión y la retracción celular. RAC1 y CDC42 también estimulan la formación de lamelipodios y filopodios como se ha mencionado anteriormente (Lamouille, Xu, and Derynck 2014). Un resumen de estos cambios morfológicos se muestra en la Figura 4.

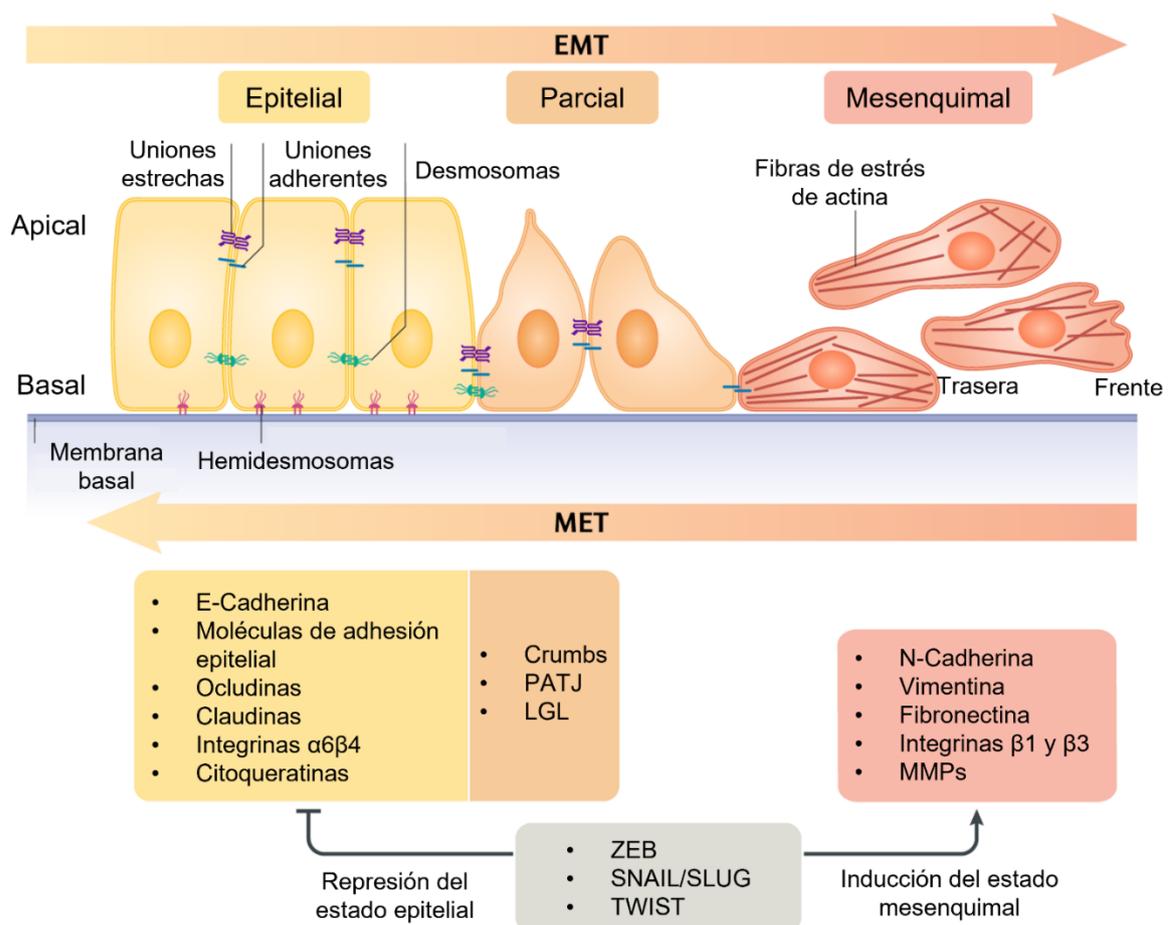


Figura 4. Esquema de los cambios morfológicos y de expresión génica y proteica propios de la activación del programa de EMT.

(Continuación Fig. 4) Durante el desarrollo de la EMT las células epiteliales pierden sus uniones célula-célula y reorganizan su citoesqueleto de actina para adquirir el fenotipo característico de las células mesenquimales. Modificada de (Dongre and Weinberg 2019).

3.2. Cambios en la expresión génica y proteica

Como también muestra la Figura 4, durante la EMT las células desregulan la expresión de proteínas epiteliales y reforman su programa de expresión génica para inducir la expresión de aquellas proteínas que promueven cambios en la organización del citoesqueleto y la remodelación de la ECM, entre otros. Así, se consigue la progresión hacia la diferenciación mesenquimal de las células (Lamouille, Xu, and Derynck 2014).

La desregulación de la E-cadherina es un rasgo distintivo de la EMT. Esto, junto a la represión de la expresión de claudinas, ocludinas, desmoplaquinas y placofilinas, consigue la desestabilización de las uniones adherentes, estrechas y desmosomas, respectivamente (Huang, Guilford, and Thiery 2012). Estos cambios van acompañados por la activación de genes cuyos productos promueven el paso a célula mesenquimal, como es un aumento de la N-cadherina, lo que resulta en un cambio de cadherinas que altera la adhesión celular y promueve la movilidad y la invasión celular (Wheelock *et al.* 2008). La N-cadherina se conecta con el citoesqueleto a través de su interacción con la α -catenina, β -catenina y la catenina p120. Además, se relaciona con receptores de tirosina quinasas, como el factor PDGF y receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). También interactúa con la molécula de adhesión de células neurales para modular la función de los receptores de tirosina quinasas asociados a ellas (Yilmaz and Christofori 2009).

Además, durante la EMT tiene lugar la modificación de la expresión de genes que dan lugar a proteínas que intervienen en la organización del citoesqueleto y la polaridad celular. Por ejemplo, la disminución de los niveles de citoqueratinas y el aumento de la expresión de vimentina modifica la composición de los filamentos intermedios del citoesqueleto (Huang, Guilford, and Thiery 2012). Los filamentos intermedios son los encargados de mantener la integridad celular y organizar la localización de los distintos orgánulos dentro de la célula (Toivola *et al.* 2005), por lo que modificaciones en su composición afectan a la organización del citoesqueleto y a la motilidad celular. En células migratorias, la vimentina trabaja junto a otras proteínas para favorecer la formación de nuevas adhesiones focales a través de integrinas, la degradación de la ECM a través de la vía metaloproteasa MMP14, que es capaz de degradar el colágeno

I, y la pérdida de adhesiones célula-célula a través de los factores de transcripción que regulan la EMT. También protege a la proteína de anclaje Scrib de la degradación, favoreciendo la migración y la proliferación. Además, es capaz de unirse a gránulos de estrés para favorecer la supervivencia celular en situaciones de estrés interno (Usman *et al.* 2021).

Finalmente, la remodelación y la degradación de la ECM, así como modificar las interacciones entre las células y la ECM es otro paso esencial para la iniciación y la progresión de la EMT. Conforme las células epiteliales adquieren un fenotipo más mesenquimal, dejan de interactuar con la membrana celular y se comunican con una ECM diferente. Así, se modifica la expresión de algunas integrinas, como por ejemplo, un aumento de las integrinas $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$, que interactúan con el colágeno I, facilitando la ruptura de los complejos de E-cadherina y el paso nuclear de la β -catenina (Koenig *et al.* 2006). Estas modificaciones en la expresión de distintas integrinas van acompañadas de un aumento de la expresión de ciertas proteasas, como un aumento de la expresión de las metaloproteasas de matriz MMP2 y MMP9, ayudando así a la degradación de proteínas de la ECM y facilitando la invasión (Nisticò, Bissell, and Radisky 2012). Además, la degradación de la ECM puede dar lugar a la liberación de factores de crecimiento que actúan sobre las mismas células invasoras. Por ejemplo, algunas proteasas y algunas integrinas, como $\alpha\beta6$, activan el factor TGF β (Sheppard 2005), lo que a su vez promueve la continuidad de la EMT mediante la expresión de proteínas de ECM como la fibronectina y distintos colágenos, aumentando así la remodelación de la ECM, cambiando sus propiedades y composición molecular.

3.3. Factores de transcripción que dirigen la EMT

Todos los cambios y modificaciones mencionados anteriormente, que inducen el paso de un fenotipo más epitelial a uno más mesenquimal, implican la activación de factores de transcripción como SNAIL, TWIST y ZEB. Estos factores tienen distintos perfiles de expresión, y su contribución en la EMT depende del tipo de célula o tejido implicado y las rutas de señalización que inician la EMT. Juntos, coordinan la represión de genes epiteliales y la inducción de genes mesenquimales, y a menudo los mismos factores de transcripción dirigen tanto la represión como la activación (Craene and Berx 2013).

Entre los distintos componentes de la superfamilia SNAIL, SNAI1 (también conocido como SNAIL), y SNAI2 (también conocido como SLUG) activan la EMT durante el desarrollo, la fibrosis y el cáncer (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005), reprimiendo genes

epiteliales uniéndose a secuencias E-box de su ADN, a través de dominios dedos de zinc carboxi-terminales (Peinado, Olmeda, and Cano 2007; J. Xu, Lamouille, and Derynck 2009).

Por otro lado, de toda la familia bHLH (del inglés *basic helix-loop-helix*) de factores de transcripción; E12 y E47, TWIST1 y TWIST2 y el inhibidor de la diferenciación (ID) también tienen papeles clave en la progresión de la EMT (Craene and Berx 2013; Peinado, Olmeda, and Cano 2007). Específicamente, en células tumorales, TWIST1 reprime la E-cadherina e induce la N-cadherina de forma independiente a SNAIL a través de su unión con otras proteínas, como la metiltransferasa SET8 (J. Xu, Lamouille, and Derynck 2009; F. Yang *et al.* 2012).

Por último, ZEB1 y ZEB2 también se unen a las secuencias E-box del ADN y pueden actuar como represores o activadores transcripcionales en función del gen diana al que se unan. En concreto, reprimen algunas uniones epiteliales y genes de polaridad y activan genes mesenquimales que definen el fenotipo EMT (Peinado, Olmeda, and Cano 2007; J. Xu, Lamouille, and Derynck 2009).

Estos factores de transcripción pueden inducirse a través de diversas rutas de señalización, como muestra la Figura 5, que se activan cuando ligandos secretados por el microambiente estromal se unen a receptores de células epiteliales, desencadenando una serie de eventos que dan lugar a la activación del programa de EMT (Dongre and Weinberg 2019).

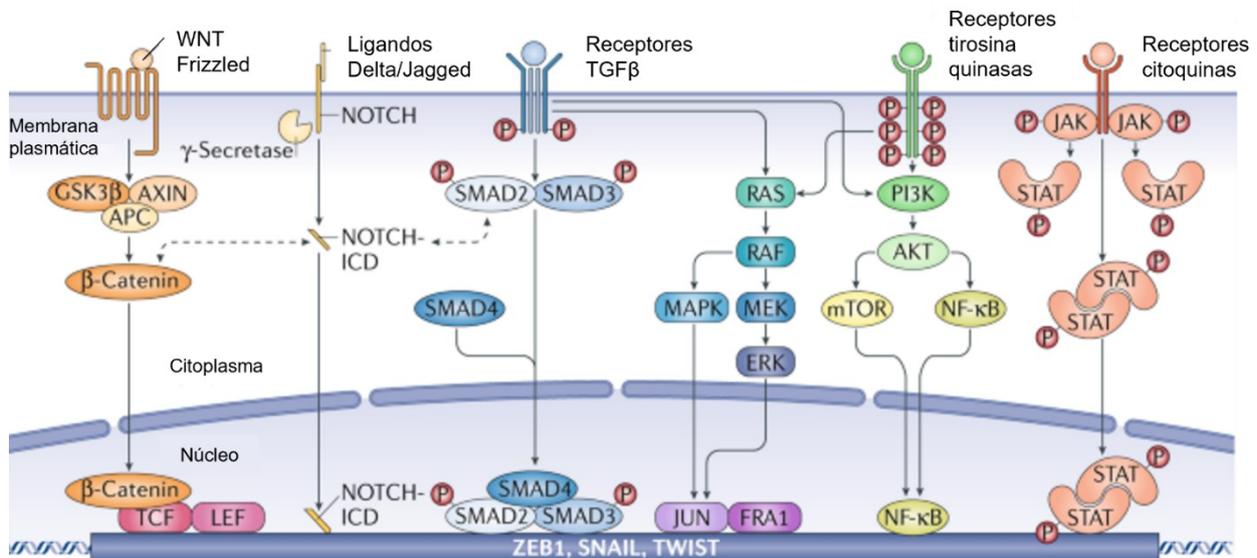


Figura 5. Esquema de las vías de señalización que activan el programa de EMT. La activación de los principales factores de transcripción responsables de la inducción de la EMT se consigue a través de diferentes rutas de señalización que cooperan entre sí.

(Continuación Fig. 5) Estas rutas son principalmente la ruta WNT, la de TGF β , la de NOTCH, la de PI3 kinasa y la de JAK/STAT. Modificada de (Dongre and Weinberg 2019).

TGF β es una citoquina multifuncional que pertenece a una superfamilia que incluye tres isoformas de TGF β , dos activinas y varias proteínas BMP. Las tres isoformas de TGF β tienen un papel clave en la inducción de la EMT en diferentes tejidos y en enfermedades proliferativas como el cáncer (J. Xu, Lamouille, and Derynck 2009; Hao, Baker, and Dijke 2019). TGF β se une a los receptores de superficie de tipo 1 y 2 (TGF β R1 y TGF β R2), activando su función serina/treonina quinasa para fosforilar a los factores SMAD2 y SMAD3, que a su vez forman complejos heteroméricos con SMAD4. Estos complejos pueden translocar al núcleo, donde pueden regular la expresión de un gran número de genes, activando genes mesenquimales como la vimentina y la fibronectina, así como los factores SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST, que a su vez reprimen la E-cadherina. Los complejos SMAD también pueden interactuar con la β -catenina y el dominio intracelular de NOTCH (NOTCH-ICD), relacionando así distintas vías de activación de factores de transcripción. Por otro lado, mediante otras vías no canónicas, los receptores de TGF β pueden activar otras rutas como la PI3K-AKT, que a su vez desencadena la activación del complejo mTOR y el factor nuclear- κ B (NF- κ B), la vía p38 MAPK y el eje de señalización RAS-RAF-MEK-ERK (Hao, Baker, and Dijke 2019; Dongre and Weinberg 2019). Además, el factor TGF β también desempeña un papel en el control de factores de transcripción de la EMT a nivel traduccional, ya que la señalización mediante TGF β media la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF4E, promoviendo así la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) de Snail1 y la metaloproteasa Mmp-3 (Robichaud *et al.* 2015). Finalmente, TGF β es capaz de inducir modificaciones post-traduccionales, como la sumoilación de la lisina 234 del factor SNAIL, otorgándole su actividad transcripcional, induciendo la expresión de genes inductores de la EMT (Gudey *et al.* 2017).

Existen tres vías de señalización por WNT que actúan en respuesta a la unión de 19 ligandos distintos a la familia de receptores Frizzled, situados en la membrana plasmática. Tras la activación de la ruta canónica, la β -catenina se libera del complejo GSK3 β -AXIN-APC, permitiendo su traslocación al núcleo, donde se une a los factores de transcripción TCF y LEF para inducir la expresión de genes relacionados con la diferenciación, la proliferación, el destino celular y la tumorigenesis (Dongre and Weinberg 2019). Además de la vía canónica, otras dos vías de WNT no canónicas actúan en las células, de manera independiente a β -catenina. Un ejemplo, es la

inducción de SNAIL y vimentina, y la represión de E-cadherina mediante la activación por WNT5A de la proteína quinasa C (Dissanayake *et al.* 2007).

La vía NOTCH se activa tras la unión de los ligandos de las familias Delta y Jagged al receptor transmembrana NOTCH. Existen cuatro isoformas del receptor, NOTCH1-NOTCH4 que, tras la unión con el ligando, provocan una serie de eventos proteolíticos que liberan NOTCH-ICD, translocándose al núcleo donde cumple su función como un coactivador transcripcional (Dongre and Weinberg 2019).

Finalmente, factores de crecimiento mitógenos, que actúan estimulando la división celular, como PDGF o EGF, también pueden activar la EMT. La unión de estos factores a sus receptores específicos provoca la dimerización de los receptores, lo que a su vez desencadena la actividad de proteínas tirosina quinasas asociadas a los receptores. Estas proteínas son capaces de fosforilar los dominios C-terminal de estos, provocando la activación de las vías PI3K-AKT, ERK-MAPK, p38 MAPK y JNK, promoviendo el crecimiento, la proliferación y la migración celular mediante la inducción de la EMT (Domenico and Giordano 2017).

En los últimos años se ha postulado que la EMT está regulada por al menos cuatro redes reguladoras fundamentales (Craene and Berx 2013), que están estrechamente relacionadas entre sí, por lo que la modulación de cualquiera de ellas tiene un gran efecto en las restantes. La red más estudiada es la que acabamos de detallar en este mismo apartado, la red transcripcional construida alrededor de los factores nucleares SNAIL, ZEB y TWIST. Las otras tres redes que están también implicadas en la activación del programa de EMT son la expresión de ARN no codificante, el *splicing* diferencial y el control traduccional y post-traduccional de las proteínas implicadas en este proceso.

Actualmente, los mecanismos de regulación de la traducción durante la EMT son poco conocidos, con la excepción de los resultados ya mencionados que relacionan la señalización mediante TGF β con la traducción de ARNm específicos mediada por fosforilación de eIF4E (Robichaud *et al.* 2015). Este proyecto de tesis doctoral se centra en la importancia del control de la traducción en la EMT activada por TGF β . Entre los factores de traducción implicados en la EMT, se ha sugerido recientemente que la sobreexpresión del factor de traducción eIF5A podría promover la EMT en cáncer (F. Wang, Guan, and Xie 2013).

3.4. EMT en condiciones fisiológicas normales y cáncer

La EMT es un proceso que tiene lugar tanto en condiciones fisiológicas, durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas, como en patologías como la fibrosis y el cáncer. Esto ha dado lugar a la clasificación de distintos procesos de EMT en tres tipos, el tipo 1, asociado con la formación de embriones, la implantación y el desarrollo de los órganos; el tipo 2, relacionado con los procesos de cicatrización de heridas y regeneración de tejidos, que puede terminar generando fibrosis; y por último, el tipo 3, que se asocia con procesos patológicos como el cáncer (Kalluri and Weinberg 2009).

La EMT tipo 1 durante las primeras etapas de la embriogénesis juega un papel crucial en la implantación del embrión y la formación de la placenta, que ocurre gracias a que diferentes poblaciones del trofoblasto se someten a un proceso de EMT para favorecer la invasión del endometrio y la posterior fijación de la placenta (Vićovac and Aplin 1996; Aplin *et al.* 1998). Durante la gastrulación, una vez generado el mesendodermo a partir de la línea primitiva, este se separa para formar el mesodermo y endodermo a través de una EMT dirigida por factores de la familia Wnt y TGF β , así como factores BMPs y Nodal y receptores FGF (L. Wang and Chen 2016). Además, durante el desarrollo embrionario, la EMT también participa en diferentes fases, como en la formación de las células migratorias de la cresta neural, y posterior diferenciación de estas células en otros tipos celulares como los melanocitos, o en la formación de las válvulas del corazón (Kalluri and Weinberg 2009).

La EMT tipo 2 tiene lugar en respuesta a señales inflamatorias producidas tras traumatismos o heridas, a partir de las cuales las células epiteliales se diferencian en células similares a los fibroblastos para reparar los tejidos dañados en un proceso llamado reepitelización. Las células encargadas de esta reparación tienen morfología epitelial y siguen expresando marcadores como citoqueratinas y E-cadherina, pero a la vez expresan marcadores mesenquimales como α -SMA y FSP1, demostrando así que este proceso se dirige por una EMT parcial. En cuanto a la fibrosis, se caracteriza por una acumulación anómala de tejido conjuntivo fibroso en un tejido, que puede repararse gracias a miofibroblastos originados por una EMT. Si se producen miofibroblastos de manera puntual, se considera una fibrosis reparadora, sin embargo, cuando existe una inflamación crónica, estos miofibroblastos se acumulan, formando un depósito excesivo en la ECM y destruyendo el parénquima del órgano. Este proceso ocurre en órganos como el riñón, hígado, pulmón e intestino. Marcadores como FSP1, α -SMA, colágeno I, DDR2, vimentina y desmina se emplean para identificar las células epiteliales que se someten a EMT en respuesta a una inflamación crónica (Marconi *et al.* 2021).

Finalmente, la EMT tipo 3 tiene lugar mayoritariamente en células neoplásicas, en las cuales, como ya se ha mencionado anteriormente, la activación de la EMT y la adquisición de un fenotipo más mesenquimal, migratorio e invasivo es un rasgo clave en la progresión tumoral (Hanahan and Weinberg 2011). En respuesta a señales que promueven la EMT, las células epiteliales situadas en el borde invasivo del tumor, pueden perder parte de sus características epiteliales, separándose así del tumor. A medida que las células se individualizan, adquieren más características mesenquimales, lo que facilita su intravasación en los vasos linfáticos o capilares sanguíneos próximos, y también facilita su supervivencia durante la circulación. Estas células pueden extravasar en órganos distantes e invadirlos. Con las señales adecuadas, las células pueden someterse al proceso inverso, la MET, y readquirir características epiteliales, como una mayor capacidad proliferativa, favoreciendo el crecimiento de macrometástasis (Tam and Weinberg 2013). Actualmente, está aceptado que, en el caso del cáncer, los procesos de EMT y MET raramente son activados completamente, si no que en las células tumorales tiene lugar una EMT híbrida o parcial. Esto permite a las células tener características mesenquimales, como una mayor capacidad migratoria y mantener características epiteliales, como el contacto célula-célula, lo que permite una migración coordinada más eficiente (Nieto *et al.* 2016; Brabletz *et al.* 2021).

4. El factor de traducción eIF5A

El factor de inicio de la traducción eucariota 5A es una proteína esencial y abundante, que está altamente conservada a lo largo de la evolución, sugiriendo que eIF5A desempeña una función fundamental en los organismos (Wolff *et al.* 2007). La proteína eIF5A tiene un peso molecular de 17 kDa y posee dominios de unión al ARN. Es la única proteína conocida que sufre una modificación post-traducciona, única en la naturaleza, que genera el residuo hipusina (M.-H. Park, Cooper, and Folk 1981). Esta modificación es esencial para la actividad y función de la proteína. eIF5A, además de estar implicado en la traducción de proteínas, también se ha relacionado con la transcripción, el recambio de ARNm y el transporte nucleocitoplasmático (Mathews and Hershey 2015).

En el siguiente apartado se describen las características y funciones de eIF5A.

4.1. Descubrimiento y estructura

En 1970, Prichard *et al.*, purificaron a partir de ribosomas de reticulocitos de ratón tres factores de iniciación que intervenían en la síntesis de la hemoglobina, IF-M1, IF-M2 e IF-M3 (Prichard *et al.* 1970). Comprobaron que los factores IF-M1 e IF-M2 eran necesarios para la síntesis polipeptídica dirigida por polyU a concentraciones bajas de Mg^{++} (D. A. Shafritz *et al.* 1970), para catalizar la unión del Met-tRNA_f al codón de inicio AUG (David A. Shafritz and Anderson 1970) y para la formación del enlace peptídico entre la metionina (transportada por Met-tRNA_f) y la puromicina (David A Shafritz, Laycock, and Anderson 1971). En 1972, este mismo grupo fue capaz de separar IF-M2 en dos componentes, IF-M2A y IF-M2B, con tamaño y funciones distintivas (D. A. Shafritz *et al.* 1972).

En 1976, Kemper *et al.*, fueron un paso más allá y purificaron los dos componentes proteicos que formaban parte del factor IF-M2B, IF-M2B α y IF-M2B β . Inicialmente, el bajo peso molecular de estos factores, de solo 17 kDa, contrastaba con otros factores de iniciación previamente purificados. Además, confirmaron que era el factor IF-M2B β el que era necesario para la síntesis de hemoglobina (Kemper, Berry, and Merrick 1976).

Tras la introducción de un sistema único de nomenclatura para unificar todos los nombres de factores de iniciación, elongación y terminación de la traducción en eucariotas, IF-M2B α pasó a llamarse eIF-5A, es decir, factor de iniciación eucariota 5A (Safer 1989).

En 1998, Kim *et al.* consiguieron cristalografar la primera estructura de un factor eIF5A en la arquea *Methanococcus jannaschii* (MJ-eIF5A). La estructura descrita, la comprenden dos dominios de hojas β antiparalelas, de unos 63 Å de largo y 23 Å de ancho. El primer dominio, con los residuos 0 a 73, lo conforman las hojas β 1- β 6 dispuestas formando una hoja antiparalela plegada en forma de barril β parcialmente abierto, y la única hélice α presente en la estructura. Este dominio está cargado positivamente. El segundo dominio es ligeramente más pequeño que el primero y está cargado negativamente. Lo forman los residuos 74 a 182, que se agrupan en las hojas β 7- β 11, formando un sándwich en el que las hojas β 7, β 8 y β 9 se enfrentan a las hojas β 10, β 11 y β 7. En esta publicación, también se pudo identificar el sitio de modificación a hipusina, en la lisina 40 situada en un bucle largo que sobresale entre las hojas β 3 y β 4 (Kim *et al.* 1998).

Años después, Tong *et al.* consiguieron cristalografar el factor eIF5A humano, cuya estructura se muestra en la Figura 6. Comparando su estructura con la descrita previamente de MJ-eIF5A, observaron que el dominio N-terminal (residuos 15-83) del factor humano apenas se diferenciaba de MJ-eIF5A, sin embargo, el dominio C-terminal

de eIF5A humano (residuos 84-150) contiene una α hélice de tres vueltas que conecta las hojas β_9 y β_{10} , que en *M. jannaschii* se sustituye por un único bucle. En eIF5A humano, el sitio de modificación a hipusina es una lisina en posición 50, ubicada también en el bucle de alta exposición que conecta las hojas β_3 y β_4 del dominio N-terminal (Tong *et al.* 2009).

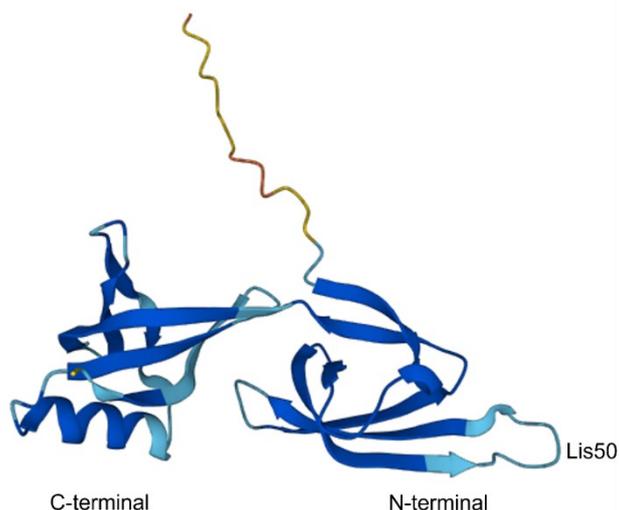


Figura 6. Estructura del factor de transcripción eIF5A. En la imagen se observa el dominio C-terminal del factor, cargado positivamente, y el dominio N-terminal, destacando el bucle de alta exposición que se localiza en la Lisina 50, donde tiene lugar la modificación post-traducciona de hipusinación. Obtenida del AlphaFold Protein Structure Database (“AlphaFold Protein Structure Database” n.d.).

4.2. Isoformas de eIF5A

En experimentos realizados en embriones de pollo, Wolff *et al.* consiguieron aislar por primera vez dos variantes de eIF5A que contenían el aminoácido hipusina, llamadas por ellos I, con una masa aproximada de 20 kDa y un punto isoelectrico de 5,6 y II, con una masa de unos 18 kDa y punto isoelectrico de 5,35. Ambas eran isoformas funcionales de eIF5A2, y al analizar la composición en aminoácidos de estas proteínas, observaron que eran proteínas que, pese a que guardaban un alto grado de similitud, eran distintas (Wolff *et al.* 1992)

En 1995, Klier *et al.* purificaron y resolvieron la estructura de varias isoformas de eIF5A en células HeLa. Caracterizaron una isoforma principal, que suponía el 95% de la proteína total purificada, y otras tres isoformas, que conformaban el 5% restante de la proteína total purificada. La isoforma principal detectada tiene un peso medio de

16.830,7 ± 1,5 Da y un punto isoelectrico de 5,1, y contiene el aminoácido hipusina en la posición 50.

Las otras tres isoformas minoritarias, tienen un punto isoelectrico de 5,2. De las tres, sólo una de ellas, la que tenía una masa de 16.870,8 ± 0,8 Da contenía el aminoácido hipusina, y todas sufren una modificación postraduccional que acetila la lisina en posición 47. Esta modificación podría tener un papel en la localización de las isoformas, ya que la isoforma principal fue purificada tanto de la fracción nuclear como de la citoplasmática, mientras que las isoformas minoritarias únicamente se detectaron en la fracción citoplasmática (Klier *et al.* 1995).

El gen que codifica para eIF5A1 se encuentra en el cromosoma 17, en la región p12-p13 (Steinkasserer *et al.* 1995), mientras que el gen que codifica para la proteína eIF5A2 está localizado en el cromosoma 3, en la región q25-q27 (Jenkins, Hååg, and Johansson 2001), una región conocida por ser muy inestable en varios tipos de cáncer, ya que se ha estimado que en un 20% de los casos de cánceres humanos, existe una ganancia del número de copias en esta región cromosómica (Fields, Justilien, and Murray 2016). La secuencia codificante de *EIF5A2* comparte un 80% de identidad con el ADNc de *EIF5A1*, y sus proteínas son un 84% idénticas y un 94% similares (Jenkins, Hååg, and Johansson 2001).

En los siguientes apartados nos referiremos a la isoforma eIF5A1, que es la más conocida y estudiada, simplemente como eIF5A.

4.3. Expresión y localización celular de eIF5A

La proteína eIF5A1 se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos y células (Clement *et al.* 2006), mientras que eIF5A2 únicamente se ha encontrado expresada en algunas zonas del cerebro y testículos (Jenkins, Hååg, and Johansson 2001; Clement *et al.* 2006). Además, existe una correlación entre la sobreexpresión de eIF5A1 y eIF5A2, especialmente con eIF5A2 y el cáncer (Ning *et al.* 2020; Mathews and Hershey 2015; F. Wang, Guan, and Xie 2013), sobre la que se profundizará más adelante en este trabajo.

Los primeros experimentos llevados a cabo con eIF5A, pusieron de manifiesto el papel que tenía este factor en la traducción proteica, uniéndose a los ribosomas al principio del proceso para estabilizar el ARNt-Met dentro del sitio peptidil del ribosoma (M.-H. Park *et al.* 1991; Hershey, Smit-McBride, and Schnier 1990), lo que indicaba que eIF5A es un factor que debía estar localizado en el citoplasma para llevar a cabo esta

función. Poco después, Shi *et al.* confirmaban la distribución mayoritariamente citoplasmática de eIF5A mediante inmunofluorescencia y *Western Blot*. En sus resultados, la expresión de eIF5A era muy intensa en la zona perinuclear, y se extendía a lo largo de todo el citoplasma celular hasta la membrana plasmática, mientras que apenas era detectable en el núcleo celular (Shi *et al.* 1996). Estos resultados contradecían los publicados unos años antes por Ruhl *et al.*, en los que gran parte de eIF5A se detectaba en el núcleo de la célula (Ruhl *et al.* 1993).

Años más tarde, Lee *et al.* estudiaron la expresión subcelular de eIF5A en células HeLa, centrándose en las diferencias de localización que podían producirse a causa de las modificaciones postraduccionales que sufre eIF5A, en concreto, la hipusinación de la Lys50 y la acetilación de residuos de lisina. Mediante análisis inmunocitoquímicos descubrieron que eIF5A hipusinado se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que el precursor sin hipusinar se localizaba tanto en el núcleo como en el citoplasma. Además, identificaron que el principal residuo acetilable de eIF5A era la Lys47, aunque no pudieron confirmar un papel de la acetilación en la localización celular (Lee *et al.* 2009). La implicación de la acetilación en la localización celular fue confirmada en 2012 por Ishfaq *et al.*, que demostraron que la forma acetilada de eIF5A se encontraba mayoritariamente en el núcleo, mientras que la forma desacetilada estaba mayoritariamente presente en el citoplasma. También comprobaron que la presencia de inhibidores de histonas deacetilasas promovían la acumulación de eIF5A en el núcleo, y concluyeron que al ser la acetilación una modificación reversible (al contrario de lo que ocurre con la hipusinación) era más probable que el control de la localización celular de eIF5A fuese dependiente de la acetilación y no de la hipusinación (Ishfaq *et al.* 2012b). Un estudio similar se llevó a cabo con la isoforma eIF5A2, obteniendo resultados similares (Ishfaq *et al.* 2012a). Pese a que eIF5A carece de una señal clásica de localización nuclear, se ha postulado que una extensión de 19 aminoácidos en el extremo N-terminal sería la encargada de marcar la localización nuclear del factor (Parreiras-e-Silva *et al.* 2007).

La entrada y acumulación en el núcleo de eIF5A tiene lugar mediante difusión pasiva, ya que, debido a su pequeño tamaño, de unos 17 kDa, puede entrar por los poros nucleares. Sin embargo, la exportación debe producirse de manera activa y podría estar mediada por la exportina 4 (XPO4) (Lipowsky *et al.* 2000), o a través de su unión con el receptor CRM1 del complejo del poro nuclear (Rosorius *et al.* 1999). En el caso de la interacción con la XPO4, la hipusina parece jugar un rol principal, ya que en mutantes de eIF5A en los que se elimina esta modificación, la unión con XPO4 es 35 veces menor que con la proteína completa (Lipowsky *et al.* 2000). Además, se ha publicado que sería

directamente el residuo hipusina el que interaccionaría con un bolsillo de la XPO4, formando el complejo de exportación Xpo4-RanGTP-eIF5A (Aksu, Trakhanov, and Görlich 2016). Por tanto, el transporte de eIF5A fuera del núcleo tendría lugar tras su hipusinación. La exportación nuclear de eIF5A es importante, además de para que la función citoplasmática de eIF5A tenga lugar, para evitar una acumulación problemática de eIF5A en el núcleo, ya que este se une a estructuras nucleares como el nucleolo, lugar donde se ensamblan los ribosomas, impidiendo su correcta biogénesis (Lipowsky *et al.* 2000; Aksu, Trakhanov, and Görlich 2016).

Finalmente, en 2016 Pereira *et al.* descubrieron que el uso de un codón de inicio alternativo en la traducción de algunas variantes del gen *EIF5A1*, daban lugar a una proteína 30 aminoácidos más larga en el extremo N-terminal, que también podía ser hipusinada. Esta proteína contenía una secuencia que marcaba su localización en la mitocondria, sugiriendo así una posible función de eIF5A en la mitocondria (Pereira *et al.* 2016).

4.4. El aminoácido hipusina

El aminoácido hipusina se identificó por primera vez en un ensayo de extracción con ácido tricloroacético a partir de tejido de cerebro bovino. Se nombró hipusina por su relación con la hidroxiputrescina y la lisina. Su estructura se determinó mediante resonancia magnética nuclear como ácido N⁶-(4-amino-2-hidroxi-butil)-2,6-diaminohexanoico y se concluyó que era un aminoácido muy básico (Shiba *et al.* 1971). Estudios posteriores observaron la presencia de hipusina en otros tejidos de mamíferos aparte de en el cerebro, como en hígado, riñones, músculo y sangre. Además, se encontró presente en orina humana de sujetos de diferentes sexos y edades (Nakajima *et al.* 1971).

Años después, Park *et al.* fueron capaces de aislar una única proteína a partir de linfocitos humanos que contenía el aminoácido hipusina (M.-H. Park, Cooper, and Folk 1981), que más tarde fue identificada por Cooper *et al.* como eIF5A (Cooper *et al.* 1983). Actualmente, es la única proteína conocida que contiene el residuo hipusina, pero hay que ser prudentes respecto a esta afirmación, ya que es posible que exista una proteína muy poco abundante que pudiese contenerla y que no haya podido ser detectada todavía a causa de la elevada cantidad de eIF5A presente en las células (Mathews and Hershey 2015).

4.4.1. Ruta de hipusinación

En 1973, Imaoka y Nakijama encontraron la primera evidencia de que la formación de la hipusina podía deberse a la unión del residuo 4-amino-2-hidroxitubilo al radical N⁶-amino de una lisina (Imaoka and Nakajima 1973). Se identificó la lisina 50 como el residuo que sufre la modificación a hipusina (Smit-McBride, Dever, *et al.* 1989), y también que el precursor de la hipusina era la poliamina espermidina (M.-H. Park, Cooper, and Folk 1981) y no la putrescina, como se creía hasta ese momento.

La hipusinación tiene lugar mediante una ruta que incluye dos reacciones enzimáticas consecutivas (Fig. 7). En la primera de ellas, de carácter reversible, la desoxihipusina sintasa (DHS) cataliza la transferencia del grupo aminobutil de la poliamina espermidina al grupo ϵ -amino de la Lys-50 de eIF5A, usando como cofactor NAD⁺. Así se forma el residuo desoxihipusina (Dhp), dando lugar a eIF5A-Dhp, que es parcialmente activo. A continuación, la desoxihipusina hidroxilasa (DOHH) hidroxila Dhp para formar la hipusina (Hpu), en una reacción irreversible y dependiente de la presencia de oxígeno y de Fe(II). Se genera así eIF5A-Hpu, que es la forma activa y funcional del factor (M.-H. Park, Wolff, and Folk 1993; Mathews and Hershey 2015).

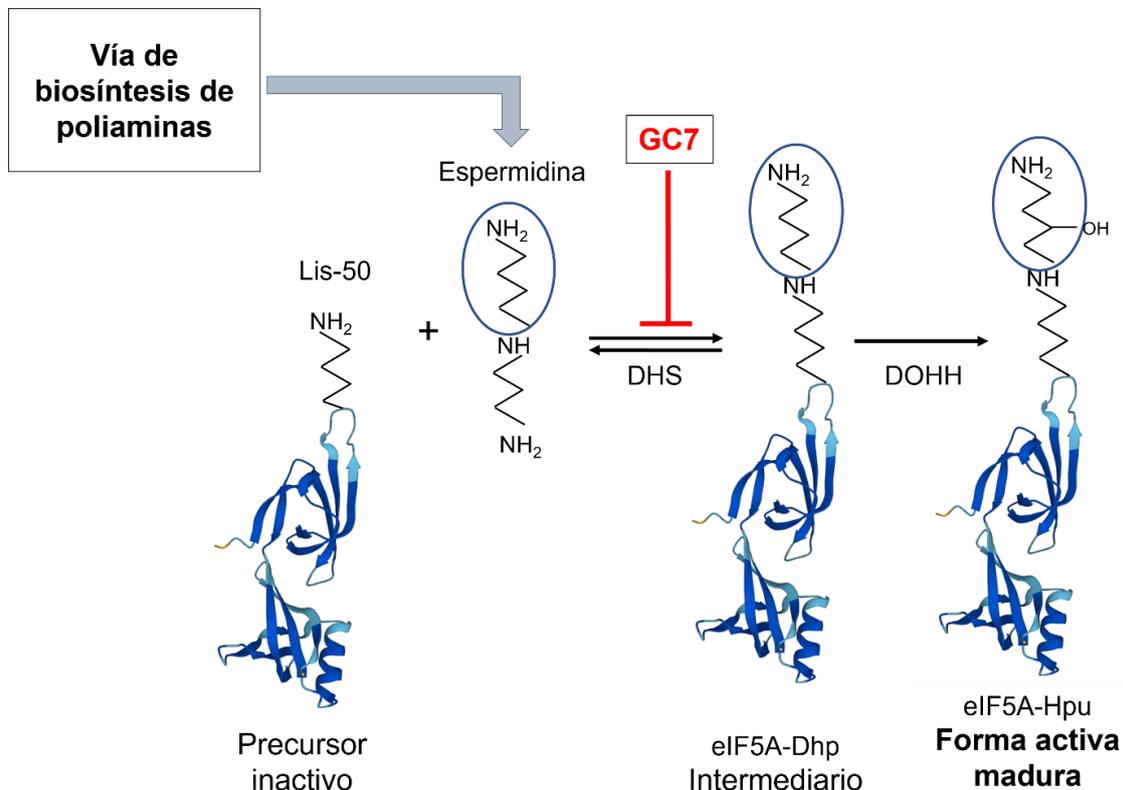


Figura 7. Ruta de hipusinación del factor eIF5A, generando el factor activo eIF5A hipusinado.

(Continuación Fig. 7) El residuo hipusina se genera a través de la acción consecutiva de las enzimas DHS y DOHH, que catalizan la transferencia del grupo aminobutil de la espermidina a la Lys-50 de eIF5A y su posterior hidroxilación. En rojo se destaca el fármaco GC7, que actúa como inhibidor competitivo de la DHS impidiendo la activación de eIF5A.

4.4.2. Importancia de la hipusinación

eIF5A, el aminoácido hipusina y las enzimas DHS y DOHH se encuentran presentes en todos los eucariotas (Wolff *et al.* 2007). Además, la secuencia que flanquea la Lys-50 en la que se produce la modificación, que comprende desde la serina en posición 45 hasta la alanina en posición 54, también está estrictamente conservada en los eucariotas (Cano *et al.* 2008), poniendo de manifiesto la importancia de la modificación en el correcto funcionamiento de eIF5A. En el dominio archaea, existe una proteína homóloga a eIF5A que se llama aIF5A y también existe la DHS (Bartig, Schümman, and Klink 1990), aunque aún no se ha encontrado un homólogo para la DOHH (Jong Hwan Park *et al.* 2006). Además, eIF5A y aIF5A comparten la lisina en la que ocurre la hipusinación (M. H. Park and Wolff 2018). En bacterias existe un ortólogo a eIF5A, el factor de elongación P (EF-P), que estimula la actividad de la peptidil transferasa en los ribosomas (Wolff *et al.* 2007). Aunque la enzima DHS no se ha encontrado en la gran parte de las bacterias que han sido estudiadas, si se ha detectado la existencia de genes relacionados con la DHS, que probablemente han sido transferidos de arqueas mediante transferencia horizontal (Brochier, López-García, and Moreira 2004). Por tanto, EF-P no se hipusina, pero existen evidencias de que algunas de las proteínas EF-P contienen un residuo correspondiente a la Lys-50 que se puede conjugar con una β -lisina, generando una cadena básica que es importante para la funcionalidad del factor (M. H. Park and Wolff 2018).

La hipusinación es necesaria para la actividad de eIF5A y que este sea capaz de estimular la síntesis metionil-puromicina *in vitro*, aunque se ha observado que eIF5A-Dhp es parcialmente activo (Smit-McBride, Schnier, *et al.* 1989). Estudios de inactivación llevados a cabo en varias especies, como son *S. cerevisiae*, *C. elegans* y ratones, han puesto de manifiesto la esencialidad tanto de eIF5A como de la DHS. En levaduras, se ha observado un descenso de la viabilidad al eliminar *EIF5A* (Schnier *et al.* 1991) o el gen que codifica para la DHS, *DHPS* (M. H. Park, Joe, and Kang 1998; Sasaki, Abid, and Miyazaki 1996). Sin embargo, se ha observado que la proteína DOHH no es esencial en levaduras, ya que son viables al eliminarla, aunque su crecimiento

empeora (Jong Hwan Park *et al.* 2006). La delección de cualquiera de los genes de *EIF5A*, *DHSP* (Nishimura *et al.* 2012) o *DOHH* (Sievert *et al.* 2014), conduce a letalidad embrionaria en ratones. Además, la pérdida de *DOHH* también resulta letal en *C.elegans* (Sugimoto 2004) y drosófila (Patel *et al.* 2009). Todo lo anterior, pone de manifiesto el papel esencial que tiene la espermidina, a través de la hipusinación, en el crecimiento y la viabilidad de las células (M. H. Park and Wolff 2018).

Por último, cabe destacar que la reacción de hipusinación puede ser inhibida con la adición de inhibidores específicos de las enzimas DHS y DOHH, y de esta forma se inhibe de forma específica la activación de eIF5A, y por tanto su actividad, ya que es la única proteína conocida actualmente que lleva a cabo la reacción de hipusinación. Entre los inhibidores existentes hoy en día, es el N1-guanil-1,7-diaminoheptano (GC7) el que ha demostrado ser más efectivo de todos los compuestos guanidino para inhibir la actividad de la DHS *in vitro* uniéndose de forma específica a su sitio activo (M.-H. Park *et al.* 1994; Y. Tanaka *et al.* 2020). Que la actividad de eIF5A pueda inhibirse de forma específica mediante GC7 puede revelar posibles dianas terapéuticas en aquellos cánceres en los que eIF5A pueda estar sobreexpresado. Sin embargo, debemos ser precavidos en este aspecto, ya que la inhibición de eIF5A, al estar implicado en varios procesos celulares, tendrá múltiples efectos colaterales (Tauc *et al.* 2021).

4.5. Función biológica

Inicialmente, cuando se identificó eIF5A se describió como un factor de inicio de la traducción, ya que se observó que dirigía el proceso de síntesis del ensayo de la metionil-puromicina empleado en su aislamiento (Kemper, Berry, and Merrick 1976). Poco después se comprobó que eIF5A no estimulaba otros ensayos de inicio de la traducción, como la unión del metionil-ARNt o la formación del complejo 80S (Benne and Hershey 1978), por lo que dejó de considerarse un factor de inicio de la traducción general. Estudios recientes apuntan a que el papel de eIF5A en el proceso de inicio de la traducción está más relacionado con la selección del codón de inicio adecuado, ya que su inhibición conlleva un aumento del inicio de la traducción aguas arriba, generando así proteínas con el extremo N-terminal más largo (Manjunath *et al.* 2019).

La función de eIF5A durante el proceso de elongación ha sido mucho más estudiada. Diversos estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* pusieron de manifiesto que la delección de eIF5A conlleva un descenso del ratio de síntesis proteica y una acumulación de los polisomas más ligeros (Saini *et al.* 2009; Henderson and Hershey 2011). Además, eIF5A juega un papel crucial en la traducción de motivos de prolinas consecutivos

(Fig.8). En bacterias, los ribosomas se estancan durante la elongación de proteínas que contienen tres codones prolina consecutivos, a causa de la rigidez que tiene este aminoácido (Woolstenhulme *et al.* 2013; Shin *et al.* 2017), y en mamíferos se han identificado varios puntos de estancamiento, la mayoría de ellos formados por un glutamato o un aspartato en el sitio A, seguidos por una prolina o una glicina y a continuación otra prolina (Ingolia, Lareau, and Weissman 2011). De hecho, se ha visto que la ausencia de eIF5A provoca el estancamiento del ribosoma en más de 200 tripletes distintos, la mayoría de ellos con prolinas, glicinas o aminoácidos cargados en el sitio P (Pelechano and Alepuz 2017).

En este punto, eIF5A es capaz de relajar este estancamiento, permitiendo la continuación de la síntesis (Gutierrez *et al.* 2013). Cuando un peptidil-ARNt^{Pro} reside en el sitio P del ribosoma y llega otro Pro-ARNt^{Pro} al sitio A, el factor eIF5A se une al sitio E ribosomal (Pochopien *et al.* 2021) y presenta el bucle que contiene la hipusina al sitio P, uniéndose al extremo CCA del ARNt y permitiendo de forma alostérica la formación del siguiente enlace peptídico entre prolinas, previniendo así el estancamiento ribosomal (Schmidt *et al.* 2015).

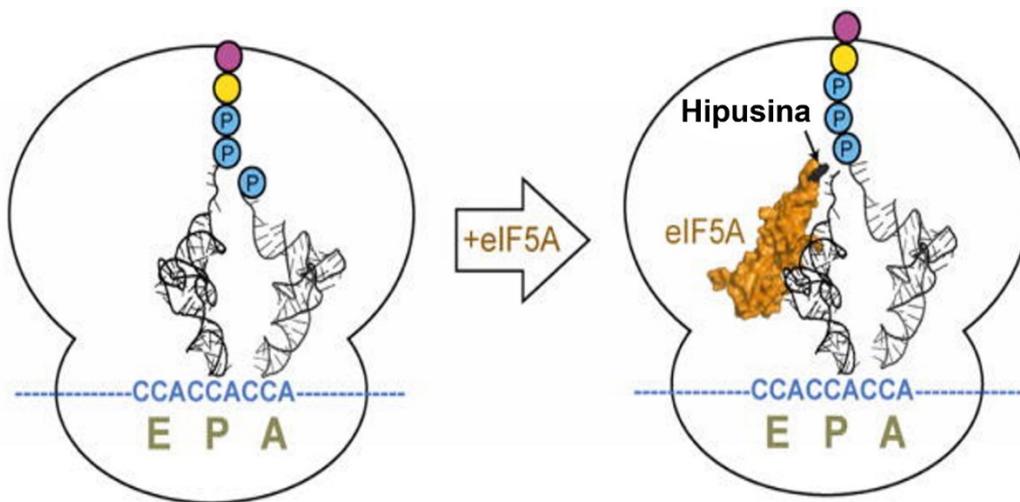


Figura 8. Modelo de la función de eIF5A en la traducción de proteínas con motivos de prolinas consecutivas. La prolina es un aminoácido muy rígido, que puede causar el estancamiento del ribosoma en aquellas proteínas que contienen más de tres prolinas consecutivas en su secuencia, deteniendo la traducción proteica.

(Continuación Fig. 8) En este punto, el factor eIF5A es capaz de relajar este estancamiento, permitiendo que la traducción continúe. Modificada de (Gutierrez *et al.* 2013).

Esta función concreta de eIF5A llevó a los laboratorios de Señalización Oncogénica del CIPF y Mecanismos Moleculares de Acción de las Poliaminas en Plantas del IBMCP-CSIC, a realizar análisis de ontología génica para estudiar la distribución de proteínas que contuviesen motivos de más de tres prolinas consecutivas en diferentes sistemas eucariotas (T. Li *et al.* 2014). Los resultados obtenidos indican un enriquecimiento de proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina, como las forminas, y otras proteínas implicadas en el proceso de EMT, como ezrina (resultados no publicados). Las forminas son proteínas clave en el proceso de polimerización de la actina (Chesarone, DuPage, and Goode 2010) y además se han relacionado con la progresión del cáncer, ayudando a la reorganización del citoesqueleto de actina durante la EMT en respuesta a señales de TGF β (Rana *et al.* 2018). Por su parte, ezrina funciona como conector junto a la radixina y moesina (ERM) entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina y participan en la adhesión celular y la formación de microvellosidades. La sobreexpresión de ezrina, induce una serie de cambios en el citoesqueleto que fomentan la invasión celular (Clucas and Valderrama 2014).

eIF5A también se ha relacionado con la terminación de la traducción, ya que podría promover la hidrólisis del peptidil-ARNt mediada por eRF1, y la ausencia del factor provoca la acumulación de los ribosomas en codones de terminación y en el extremo 3' UTR (Pelechano and Alepuz 2017; Schuller *et al.* 2017).

Además de estar relacionado con la traducción en todas sus etapas, eIF5A también realiza otras funciones en la célula. La estructura de eIF5A pone de manifiesto la posibilidad de que pueda unirse a ácidos nucleicos, ya que contiene un dominio C-terminal similar al dominio de choque frío que poseen algunas proteínas de unión a ADN y ARN. Además, el dominio N-terminal contiene la hipusina, que tiene dos cargas positivas y es muy similar a la espermidina y la espermina, moléculas que se sabe que interaccionan con el ADN y el ARN (Tauc *et al.* 2021). Respecto a esto, Xu *et al.* identificaron una serie de ARNm que coprecipitaban con el factor eIF5A, entre los que se incluían la subunidad deshidrogenasa de la NADH o la ADP-ribosa pirofosfatasa, confirmando así el papel de eIF5A como proteína de unión al ARN (A. Xu, Jao, and Chen 2004).

También se ha relacionado eIF5A con el transporte núcleo-citoplasma del ARNm (Hofmann *et al.* 2001) y el balance entre el reclutamiento del ARNm por los ribosomas

para su traducción y su degradación (Zuk and Jacobson 1998; Schrader *et al.* 2006). Otros estudios han puesto de manifiesto el rol de eIF5A-Hpu en la respiración y función mitocondrial, aunque un exceso de eIF5A desregula el funcionamiento de la mitocondria (Barba-Aliaga and Alepuz 2022).

Finalmente, se ha relacionado eIF5A y el metabolismo de las poliaminas con el sistema inmune y la inmunomodulación de células senescentes. Por ejemplo, Puleston *et al.* han demostrado que el correcto metabolismo de las poliaminas es crucial para la activación y especificidad de los linfocitos Th CD4+ (Puleston *et al.* 2021). Por otro lado, altos niveles de eIF5A hipusinado mantienen la expresión de diferentes componentes senostáticos como citoquinas, que en etapas tempranas de la senescencia juegan un papel importante estimulando el sistema inmune para eliminar células premalignas (Jiang and Loayza-Puch 2022).

4.6. eIF5A y cáncer

Existe una fuerte correlación entre el aumento de los niveles de eIF5A y algunos cánceres.

eIF5A1 está sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma de pulmón, neoplasia vulvar intraepitelial, carcinoma colorrectal, cáncer cervical, glioblastoma y adenocarcinoma pancreático. Además, el ARNm de *EIF5A1* también se ha encontrado elevado en pacientes con leucemia mieloide crónica (Mathews and Hershey 2015). Aunque el mecanismo exacto por el cual eIF5A1 está relacionado con estos cánceres aún necesita ser investigado, varios trabajos han empezado a dilucidar su papel en esta enfermedad. Por ejemplo, en cáncer de pulmón se ha visto que, aunque el ARNm aumenta, esto no coincide con un aumento de los niveles proteicos de eIF5A1, por lo que su regulación podría ser post-transcripcional, traduccional o post-traduccional. Además, niveles proteicos elevados de eIF5A1 coincidían con mutaciones oncogénicas en la vía K-ras, por lo que su regulación podría estar relacionada con esta vía (G. Chen *et al.* 2003). En una línea celular de cáncer de esófago se ha encontrado que existe una expresión alterada de las proteínas Hsc70 y eIF5A1, que están involucradas en el transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas y, por tanto, fallos en este sistema pueden tener un papel en la carcinogénesis de esófago (Moghanibashi *et al.* 2013). Por último, en cáncer de cérvix se ha comprobado que una mayor expresión de *EIF5A1* está relacionada con peor prognosis y tasas de supervivencia y con un aumento de la proliferación, la migración y

la invasión celular. Además, la inhibición de eIF5A1 mediante la adición de GC7 revertía este efecto (J. Zhang *et al.* 2018).

Por su parte, ya se ha hecho referencia a que *EIF5A2* se localiza en la región cromosómica 3q26, que está frecuentemente amplificada en muchos tipos de tumores. Esta región se identificó por primera vez en cáncer ovárico, planteándose que *EIF5A2* podría ser un posible oncogén (Guan *et al.* 2001). Otros cánceres en los que se ha observado la sobreexpresión de eIF5A2 son el colorrectal, el de vejiga, hepatocelular, páncreas, gástrico, de células escamosas del esófago o cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La sobreexpresión de eIF5A2 también se ha relacionado con un estado más avanzado y agresivo de la enfermedad, un aumento de la recurrencia, metástasis y disminución de la supervivencia, lo que apoya que eIF5A2 pueda emplearse como marcador de pronóstico en el cáncer (Mathews and Hershey 2015). Al igual que con eIF5A1, existen un gran número de estudios que tratan de esclarecer el mecanismo biológico que relaciona eIF5A2 con el cáncer. En cáncer de células escamosas del esófago, se ha relacionado la sobreexpresión de eIF5A2, inducida por una amplificación génica o condiciones de hipoxia, con un aumento de la expresión de HIF1- α y VEGF, lo que conlleva a un aumento de la metástasis y la angiogénesis (Y. Li *et al.* 2014). En carcinoma hepatocelular, la sobreexpresión de eIF5A2 se ha correlacionado con un aumento de la movilidad celular y la inducción de la EMT, lo que contribuye a la metástasis celular. Además, *EIF5A2* era capaz de activar la vía RhoA/Rac1 para estimular la creación de lamelipodios y fibras de estrés. La inhibición de *EIF5A2* mediante GC7 o ARN pequeño interferente (ARNpi) disminuía la movilidad (Tang *et al.* 2010). El papel activo de *EIF5A2* en la inducción de la EMT también se ha observado a través de la regulación al alza de la proteína asociada a metástasis MTA1, a través de un aumento del reclutamiento de c-myc, GCN5 y TIP60 en el promotor de *MTA1* (Zhu *et al.* 2012). La proteína MTA1 también se ha relacionado con el proceso de EMT en otros tipos de cáncer, como el CPNM (Ma *et al.* 2017), y con eIF5A2 en cáncer gástrico, donde se ha observado que la sobreexpresión de eIF5A2 en células de este tipo de cáncer se correlaciona con la disminución de la expresión de E-cadherina y un aumento de la expresión de vimentina, c-myc, las ciclinas D1 y D3 y MTA1 (Meng *et al.* 2015). En CPNM también se ha asociado eIF5A2 con una mayor migración y capacidad invasiva, ya que su inhibición mediante ARNpi disminuye estas capacidades y además provoca el descenso en la expresión de vimentina, c-myc o el regulador de la apoptosis Bcl-2 (C. Chen *et al.* 2018) y se le considera como un marcador de peor pronóstico y estado más avanzado de la enfermedad (He *et al.* 2011). Además, se ha relacionado eIF5A2 con el microambiente tumoral, mediante la mediación de señales que regulan la

apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis, como las de las rutas Akt/MMP-2, MTA1, Ros, HIF1- α , PEAK1 y TGF β 1 (Ning *et al.* 2020).

En conclusión, la diferencia existente entre la expresión de eIF5A1 y eIF5A2 en tejidos normales y su sobreexpresión en algunos tipos de cánceres, especialmente en el caso de eIF5A2, que es prácticamente indetectable en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas normales, los posiciona como posibles marcadores de peor pronóstico de la enfermedad. Su inhibición mediante GC7 u otros inhibidores específicos de la hipusinación ha mostrado signos de disminuir el crecimiento tumoral y la metástasis, por lo que sería una interesante diana terapéutica sola, o en combinación con otros fármacos.

OBJETIVOS

Actualmente, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte asociada al cáncer en hombres y la segunda más común en mujeres. La cirugía y la quimioterapia son las estrategias terapéuticas principales para el tratamiento de este cáncer, pero la metástasis y la resistencia a los fármacos provocan el fracaso terapéutico. Es por ello que existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Con este proyecto se propone investigar el efecto patológico de eIF5A2 en CPNM, y profundizar en los mecanismos moleculares que regulan su actividad en las células cancerosas.

El objetivo final es la identificación de eIF5A2 como un marcador de pronóstico en CPNM, y abrir una nueva ventana terapéutica para pacientes con cáncer de pulmón avanzado que muestran altos niveles de eIF5A2, mejorando así la probabilidad de una respuesta terapéutica efectiva.

Los objetivos concretos son:

1. Analizar la expresión génica y proteica de eIF5A2 en líneas derivadas de CPNM.
2. Investigar el papel de eIF5A2 en la proliferación celular, la capacidad de migración e invasión celular y el desarrollo de la EMT.
3. Estudiar el efecto del inhibidor de la hipusinación GC7 en la proliferación celular, la capacidad de migración e invasión celular y el desarrollo de la EMT.
4. Relacionar eIF5A2 con la maquinaria de traducción e investigar el papel de eIF5A2 en la síntesis de proteínas específicas de la EMT.
5. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de eIF5A2 en la generación de tumores y migración e invasión celular en modelos de ratón xenotrasplantados.
6. Correlacionar la expresión de eIF5A2 en muestras de tumores de pacientes con CPNM con variables clínico-patológicas y curso clínico de la enfermedad, con el fin de evaluar su papel como biomarcador.

MATERIALES Y

MÉTODOS

1. Ácidos nucleicos

1.1. ARN de interferencia

Para inhibir la expresión génica de *EIF5A1* y *EIF5A2* de forma específica, se introdujo en las células mediante transfección un ARN pequeño de interferencia (ARNpi), como se indica en el apartado 3.2.

Las secuencias de los ARNpi se diseñaron específicamente para silenciar cada una de las isoformas de *EIF5A*, *EIF5A1* y *EIF5A2*. La secuencia para silenciar *EIF5A1* es GTACGACTGTGGAGAAGAG, y para silenciar *EIF5A2* es GACAGAACTGGTGAAG-TT, ambos de Sigma-Aldrich Corporation (MO, USA). Ambos se conservan a una concentración de 100 uM en un ultracongelador a -80°.

1.2. ADNs y plásmidos

Los plásmidos empleados para la transfección y obtención de líneas celulares que sobreexpresen eIF5A2 de manera estable, y su respectiva línea control, fueron las construcciones pCIG-IRES-GFP (vector vacío-EV) y pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP. Ambos fueron cedidos por el Dr. Antonio Herrera (*Neurodevelopmental system biology lab, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, Lausana, CH*). Ambos plásmidos son resistentes a geneticina.

El diseño del plásmido pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP se muestra en la Figura 9. Para su construcción, se digirió el plásmido pcDNA3-Flag-eIF5A2 con las enzimas EcoRI y PmeI y el fragmento Flag-eIF5A2 resultante se insertó en el plásmido pCIG-IRES-GFP. La etiqueta FLAG, cuya secuencia es DYKDDDDK, está fusionada a la proteína eIF5A2 y permite su purificación mediante cromatografía de afinidad y observar su localización dentro de las células vivas. También para ayudar a comprobar su localización y expresión en las células, este plásmido incluye la expresión de GFP, por lo que las células transfectadas con este plásmido emitirán luz verde fluorescente cuando se exponga a la luz en el rango azul a ultravioleta. Finalmente, el elemento IRES (Sitio interno de entrada al ribosoma) es una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la síntesis proteica de forma independiente a la caperuza en 5'.

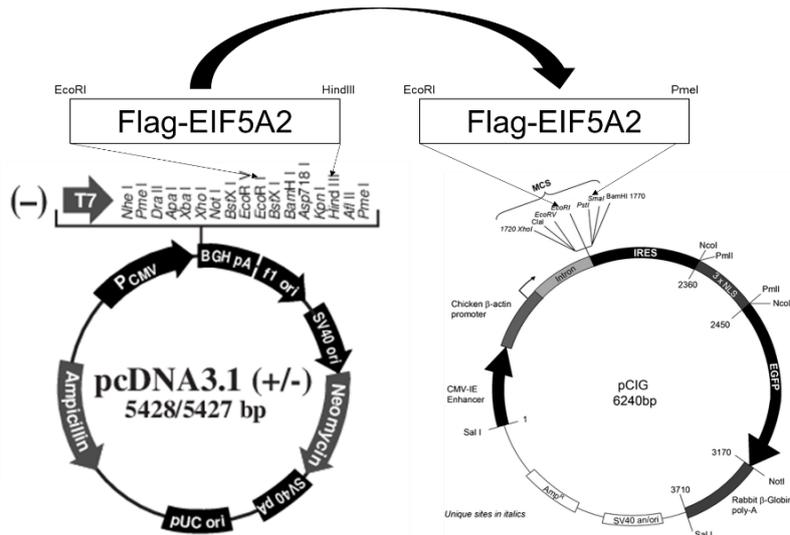


Figura 9. Construcción del plásmido pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP.

1.3. Transformación de bacterias por choque térmico

Mediante choque térmico, se transformaron las bacterias *E. Coli* químicamente competentes (One Shot™ MAX Efficiency™ DH10B T1 Phage-Resistant Cells, REF 12331013, Invitrogen, MA, USA) para introducirles los dos plásmidos de interés, pCIG-IRES-GFP y pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP. Para ello, se mezcló el ADN con las bacterias competentes y se incubó la mezcla en hielo durante 30 min. Tras este tiempo, se realizó el choque térmico, incubando el vial a 42°C durante 45 seg, y después, 2 min más en hielo.

A continuación, se añadió 1 mL de medio LB líquido (10 g/L de bacto-triptona (Condalab, Madrid, ES), 5 g/L de bacto-extracto de levadura (Condalab, Madrid, ES) y 10 g/L de NaCl (VWR, PA, USA) y se incubaron las bacterias durante 1h a 37°C. Finalmente, se sembraron las bacterias en placas LB-agar (medio LB con 15 g/L de bacto-agar (Condalab, Madrid, ES)), suplementado con ampicilina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE) a 50 mg/mL para la selección de aquellas bacterias que han insertado el plásmido, y se crecieron durante la noche en una estufa a 37°C.

1.4. Purificación del ADN

Se seleccionaron colonias crecidas en la placa de LB-agar y se crecieron en medio LB selectivo en tubos de ensayo tapados, durante la noche a 37°C y en agitación.

En primer lugar, con este cultivo, se realizó una Miniprep con el kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, DE), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se

comprobó la cantidad e integridad del ADN obtenido mediante el Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, MA, USA) y posteriormente se secuenció en el servicio de Genómica y Genética Traslacional del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), con el fin de comprobar que el plásmido amplificado coincide en algún punto, en este caso, con la secuencia de eIF5A2.

Una vez realizada esta comprobación, se volvió a realizar todo el proceso de transformación bacteriana y crecimiento, hasta cultivar las bacterias seleccionadas en un matraz de 1 L con medio LB selectivo, durante la noche a 37°C y en agitación.

Finalmente, se extrajo el ADN plasmídico mediante Maxiprep con el kit NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Düren, DE), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobó la cantidad e integridad del ADN obtenido mediante Nanodrop y se conservaron a -20°C alícuotas de los plásmidos a una concentración de 1 µg/µL.

2. Cultivos celulares

2.1. Líneas celulares estables comerciales de CPNM

Se han empleado células de las líneas de cáncer de pulmón A549, NCI-H1395 (en adelante nombrada como H1395) y NCI-H441 (en adelante nombrada como H441), obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*, VA, USA). También se empleó la línea celular PC-9 (conocidas anteriormente como PC-14), obtenidas de la ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Salisbury, UK).

Las células A549 se derivaron de tejido de un adenocarcinoma de pulmón de un varón caucásico de 58 años. Las células H1395 también se derivaron de tejido de un adenocarcinoma de pulmón, pero en este caso, de una mujer blanca de 55 años. Las células H441 fue derivada a partir del líquido pericárdico de un paciente con adenocarcinoma papilar de pulmón. Por último, la línea PC-9 se derivó de un adenocarcinoma de pulmón diferenciado.

2.2. Generación de líneas celulares estables

Con la construcción que codifica eIF5A2 junto a la proteína fluorescente verde GFP (pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP) y el plásmido control que sólo expresa GFP (pCIG-IRES-GFP), se han generado líneas celulares que sobreexpresan eIF5A2 de manera estable.

En primer lugar, se transfectaron las células parentales H1395 con estos plásmidos, como se detalla más adelante en el apartado 3.1. A las 48 h de la transfección, se comprobó mediante microscopía de fluorescencia que las células expresaban GFP y por tanto eran verdes, y en ese momento se añadió al cultivo el antibiótico G418 (geneticina) (Corning Incorporated, NY, USA) con el fin de seleccionar por resistencia a este antibiótico aquellas células en las que se había insertado el plásmido. Las células se mantuvieron en cultivo, cambiando el medio con el antibiótico de forma periódica, hasta llegar a tener células únicas que tenían incorporado el plásmido con las que se las había transfectado.

Estas células se amplificaron hasta obtener un cultivo confluyente, que se pasó por *Cell Sorter MoFlo XDP* (Beckman-Coulter, CA, USA) para identificar aquellas células que eran GFP+ y continuar con ellas en el cultivo. Así, las líneas estables cuentan con una doble selección.

De esta forma, se generaron dos líneas celulares, H1395-eIF5A2, que sobreexpresa Flag-eIF5A2 junto a GFP de manera estable y su correspondiente línea control, H1395-EV (por *Empty vector*), que expresan el vector IRES-GFP vacío. La sobreexpresión de eIF5A2 y la expresión de Flag y GFP se comprobó posteriormente mediante *Western Blot*.

2.2.1. Análisis de la capacidad proliferativa celular

Para analizar la capacidad proliferativa de las líneas celulares estables generadas, se realizaron pases consecutivos de las células hasta 20 pases seriados. Cada vez, se sembraron las células a 1500 células/cm² y se renovó el medio de cultivo cada 3-4 días. Semanalmente, se levantaron las células y se contaron con la cámara Neubauer. Los doblajes poblacionales (DP) se calcularon mediante la fórmula: $DP = \frac{\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_1)}{\log_{10}(2)}$, donde N_H es el número de células recogidas y N_1 es el número de células sembradas. Los doblajes poblacionales acumulativos (DPA) se calcularon añadiendo a cada pase el DP de los pases anteriores.

2.3. Cultivo en adherencia de las líneas celulares

Con la excepción de la línea H441, el medio de cultivo estándar para el crecimiento en adherencia de las líneas celulares (incluidas las líneas estables generadas en el laboratorio y las derivadas de paciente) fue DMEM/F-12 (medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) + GlutaMAX. La línea H441 se cultivó con medio

comercial RPMI (medio *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco, Paisley, UK). Ambos medios se suplementaron con un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Biowest, Nuaille, FRA) y un 1% de los antibióticos Penicilina-Estreptomicina (Gibco, Paisley, UK). El crecimiento de todas las líneas se realizó en el interior de un incubador Steri-Cycle CO₂ Incubador HEPA class 100 (Huco Erlös, Madrid, ES), a 37° de temperatura, con humedad atmosférica del 80% y 5% de CO₂.

Para el mantenimiento de las líneas, se emplearon placas de 100 mm o frascos de cultivo celular de 25 cm² o 75 cm² (Corning Costar, Corning Incorporated, NY, USA). Para la siembra de experimentos, se utilizaron placas de 6 o 96 pocillos (Corning Costar, Corning Incorporated, NY, USA) o placas de 150 mm (Sarstedt, Nümbrecht, DE). En todos los casos, los frascos y placas estaban fabricados en poliestireno y tratadas para el cultivo en adherencia. Se eligió la placa de siembra en función del experimento a realizar.

Al llegar cerca de la confluencia en el cultivo de mantenimiento, se realizaban los pases del cultivo. Para ello, se empleaba tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate buffered saline* (Biowest, Nuaille, FRA)) atemperado para los lavados del cultivo y Tripsina-EDTA (Gibco, Paisley, UK) para hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas de adhesión de la membrana celular y así dejar las células en suspensión. A continuación, un volumen de 10 µL de la suspensión celular se mezclaba 1:1 con el tinte azul tripán (Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE) para comprobar la viabilidad celular y realizar el conteo de las células en una cámara de recuento Neubauer (Hirschmann, Neckartenzlingen, DE). Según el experimento a realizar o si es un pase de mantenimiento, se realiza la resiembra celular con un determinado número de células por pocillo o placa de siembra.

3. Ensayos celulares

3.1. Transfección transiente

Se realizaron transfecciones transitorias en la línea H1395. Las células transfectadas son las que posteriormente se seleccionaron para desarrollar las líneas estables, tal y como se indica en el apartado 2.2. Para las transfecciones se empleó el reactivo Lipofectamina LTX (Invitrogen, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos pCIG-IRES-GFP y pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP se añadieron en proporción 1:3 con el reactivo Lipofectamina LTX y 1:1 con el reactivo Plus Reagent, utilizando el medio reducido en suero Opti-MEM (Invitrogen, MA, USA).

La transfección se llevó a cabo en cultivo con medio sin antibióticos y tras 6h con el reactivo de transfección se cambió el medio de cultivo a medio de adherencia completo.

3.2. Silenciamiento génico mediado por ARN pequeño de interferencia

La introducción de un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) es una de las herramientas más empleadas para silenciar de forma específica la expresión génica. Su mecanismo se basa en la complementariedad de secuencia que tiene con el mRNA diana, y al unirse a él, provoca su rotura y degradación.

Para este trabajo, el silenciamiento se realizó con el reactivo Lipofectamina 3000 (Invitrogen, MA, USA), utilizado según las instrucciones del fabricante.

El ARNpi específico para silenciar *EIF5A1* y *EIF5A2*, se introdujo junto al reactivo Lipofectamina 3000 en proporción 1:1 en el silenciamiento llevado a cabo en las células H1395 y en proporción 1:2 en el silenciamiento realizado en A549. En todos los casos, se utilizó el medio reducido en suero Opti-MEM. Como control, se empleó la mezcla de transfección sin ningún ARNpi.

La transfección se llevó a cabo en cultivo con medio sin antibióticos y tras 6h con el reactivo de transfección se cambió el medio de cultivo a medio de adherencia completo.

3.3. Inducción de la EMT con TGFβ1

En este trabajo se ha utilizado la citoquina TGFβ1 para inducir el desarrollo de la EMT en el cultivo en adherencia, tanto en las células en las que se silenciaba *EIF5A1* y *EIF5A2*, como en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2.

Estas células se trataron en cultivo con la proteína humana recombinante TGFβ1 (PeproTech, London, UK) a una concentración de 10 ng/mL, durante los tiempos indicados en los distintos experimentos. Como la proteína es inestable en cultivo, se suplementaba periódicamente en el medio que se añadía al cultivo. El control en estos experimentos fueron células sin tratamiento.

3.4. Inhibición farmacológica de eIF5A con GC7

En las líneas celulares estables H1395-EV y H1395-eIF5A2 se llevó a cabo la inhibición farmacológica de eIF5A empleando GC7 (N1-guanil-1,7-diamino-heptano).

GC7 es un inhibidor competitivo de la enzima de la ruta de hipusinación DHS, y por tanto, impide la hipusinación de eIF5A y que este se active en la célula.

En primer lugar, se hizo una curva de dosis letal media (DL50), con distintas concentraciones de GC7 (Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) que comprendían desde 0 μM hasta 68,12 μM . Los resultados obtenidos mostraron que la DL50 para la línea H1395-EV es de 16,53 μM y en el caso de las células H1395-eIF5A2, de 17,04 μM , por lo que se empleó esta concentración más alta en todos los experimentos llevados a cabo con este inhibidor.

El inhibidor se añadía directamente al medio de cultivo en adherencia y se dejaba actuar durante un tiempo determinado en función del experimento. Como control en estos experimentos, se emplearon células sin tratamiento.

4. Análisis de expresión génica

4.1. Extracción de ARN

En función del experimento, se puso fin a los cultivos a distintos tiempos. En el caso de los silenciamientos génicos, se recogieron los extractos 72 h después de realizar el silenciamiento y tras 48 h de tratamiento con TGF β 1. En el caso de la inducción de la EMT a distintos tiempos con TGF β 1 en las líneas estables, se recogieron extractos tras 4 h, 8 h, 24 h, 48 h y 72 h de tratamiento con la citoquina TGF β 1. Por último, en los experimentos en células de la línea estables H1395-eIF5A2 tratada con TGF β 1 y GC7, se recogieron extractos tras 24 h, 48 h y 72 h de tratamiento.

Todos los extractos se recogieron sobre lecho de hielo, rascando en 200 μL de PBS frío. Se extrajo el ARN de todas las muestras con el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basilea, CH), siguiendo los pasos detallados por el fabricante.

Para determinar la concentración y pureza de las muestras obtenidas, se cuantificaron en el Nanodrop. Tanto en el ratio $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}}$ como en el ratio $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ se obtuvieron unos niveles óptimos, lo que indicaba que no había contaminaciones con sales o proteínas en las muestras. También se extrajo cantidad suficiente para continuar con la transcripción reversa.

4.2. Transcripción reversa

Para continuar con el estudio de la expresión génica, se retrotranscribió el ARN obtenido a su ADN complementario (ADNc). Para ello, se prepararon diluciones con 1 µg de ARN en un volumen máximo de 10 µL en agua libre de RNasas. Se empleó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, MA, USA), que contiene el tampón de reacción 10X, la mezcla equimolar de dNTPS, un mix aleatorio de cebadores y la enzima transcriptasa reversa. Se siguieron las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla de componentes y se llevó a cabo la reacción de transcripción en un termociclador (Eppendorf, Hamburgo, DE), incubando la muestra a 25°C durante 10 min, seguido de 120 min a 37°C. La reacción se detuvo subiendo la temperatura hasta 85°C durante 5 min. Se prepararon diluciones 1:100 y se conservó el ADNc obtenido a -20°C hasta su uso.

4.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Las qPCR se llevaron a cabo en placas de 96 o 384 pocillos (Axygen Scientific, CA, USA), cargando en cada una de ellas, por triplicado, 5 µL de ADNc de la muestra de interés, 0.5 µL de la mezcla de oligonucleótidos directo + inverso, 2 µL de la mezcla 5X PyroTaq EvaGreen (Cultek, Madrid, ES) y agua libre de RNasas hasta completar un volumen final de reacción por pocillo de 10 µL.

Los oligonucleótidos empleados estaban previamente diluidos a una concentración de uso de 10 µM. Sus secuencias, tanto del oligo directo como el inverso, se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en qPCR.

Gen	Secuencia oligonucleótido
EIF5A2	Directo: AACTGCCAGAAGGTGAACTAGG Inverso: GTTCCGTTTATTTGCAGGGT
EIF5A2 (plasmídico)	Directo: GGCTTCCAGCACTTACCCTA Inverso: ATGGTCGTCCTTTGAGCACC
EIF5A1	Directo: TTGGCAAGGAGATTGAGCAG Inverso: TTTGCCATGGCCTTGATTGC
FN1	Directo: TGCTTCCTGGCCGAAAATAC Inverso: ATCAGGCGCTGTTGTTTGTG
CDH1	Directo: TGCCCCAATACCCAGCGT Inverso: ACGGTGGCTGTGGAGGTGGT
CDH2	Directo: GGACCGAGAATCACCAAATG Inverso: AACACTTGAGGGGCATTGTC
VIM	Directo: CCTTGAACGCAAAGTGGAAAT Inverso: TTTGGACATGCTGTTCTGA
FHOD1	Directo: GCCAGCTGATGCTCTTTGTG Inverso: CAGCTTCAGGGCTGTCTTCA
P85	Directo: GTCCGAGATGCTTCTAGCAAG Inverso: CAGCTTATTGTTCCCGCCTTT
MTA1	Directo: AGATACGTGCAGCAGAAACG Inverso: TTGACGCTGATTTGGTTCCGG
EZR	Directo: CTGAGACTGCCGTGCTCTTG Inverso: GTAAGTTTGTGCTGGTCCATCACT
SNAI1	Directo: CTAGGCCCTGGCTGCTACAA Inverso: CCTGGCACTGGTACTTCTTGA
S26	Directo: CTGCACTAACTGTGCCCGATGCGTG Inverso: GACGCTCGCTTCAGAAATGTCCCTG

La amplificación del ADN y la detección de la fluorescencia emitida se realizó en un termociclador LightCycler 480 (Roche, Basilea, CH), con un programa que consistía en una incubación previa de 15 min a 95°C para activar la enzima Taq polimerasa, seguida de 45 ciclos de 15 seg de desnaturalización a 95°C, hibridación con los cebadores durante 20 seg a 65°C y 20 seg de elongación a 72°C. Finalmente, se llevó a cabo una curva de desnaturalización, incrementando la temperatura de forma continua desde 60°C a 97°C a una velocidad de 0.11°C/s para comprobar la especificidad de la amplificación.

Por último, se cuantificó la cantidad relativa de ADN en cada muestra siguiendo el método de $\Delta\Delta C_t$ descrito por Applied Biosystems (Livak and Schmittgen 2001), normalizando la expresión de cada gen de interés respecto a la del gen de referencia S26.

5. Análisis de expresión proteica

5.1. Preparación de extractos proteicos

Los experimentos se finalizaron a los mismos tiempos que aquellos recogidos para la extracción de ARN.

Todos los extractos se recogieron de la misma forma. Sobre lecho de hielo, se lavaron las placas de cultivos con PBS frío y se rascaron las células con ayuda de un raspador con 300 μ L de buffer de lisis proteico, compuesto por Laemmly Buffer casero 1X sin azul de bromofenol ni DTT, 150 mM de NaCl y 1% de Tritón-X100 (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA). Los extractos obtenidos se hirvieron 5 min a 95°C y se centrifugaron 5 minutos a velocidad máxima. Se conservaron a -20°C hasta su uso.

5.2. Cuantificación de la concentración proteica

Todos los extractos obtenidos se cuantificaron con el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Este kit se basa en una reacción colorimétrica producida por la reducción del catión Cu^{+2} a Cu^{+1} . Este cambio de color se detectó mediante el espectrofotómetro Victor2 (PerkinElmer, MA, USA), midiendo la absorbancia a 562 nm.

Se prepararon diluciones 1:10 de las muestras obtenidas con PBS y se cargaron por duplicado en una placa de fondo plano (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) junto a la curva estándar de concentraciones conocidas de BSA, incluida en el kit de BCA Pierce. Se siguieron las instrucciones del fabricante del kit para la cuantificación proteica.

5.3. Western Blot

Las proteínas obtenidas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con porcentajes del 10% al 15%, lo que permite la separación por tamaño de las proteínas. Se empleó la cámara electroforética Mini-PROTEAN 2-D (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), con el tampón de electroforesis compuesto de 3 g/L de Tris base (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 14,4 g/L de glicina (VWR, PA, USA) y un 0,1% de SDS (VWR, PA, USA) y se utilizó el marcador de pesos moleculares PageRuler (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), que contiene un estándar de proteínas preteñidas de 10 kDa a 180 kDa.

Tras la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF Immun-Blot PVDF Membrane (0,45 μm) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). La transferencia se llevó a cabo en condiciones húmedas, utilizando el sistema "Mini Trans-Blot® Cell" (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). El tampón de transferencia empleado se compuso de 6 g/L de Tris base y 3,1 g/L de ácido bórico (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Previamente a la transferencia, la membrana de PVDF se activó con metanol 100% siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante 16 h a temperatura ambiente con un voltaje fijo de 12 V. El tampón de transferencia se agitó suavemente durante toda la transferencia con ayuda de un agitador magnético.

Tras la transferencia, se comprobó que ésta se había realizado satisfactoriamente tiñendo la membrana con Ponceau (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) al 0,1% en ácido acético (Merck, Darmstadt, DE) al 1%. Este colorante se une de manera reversible a las bandas de proteínas adheridas a la membrana de PVDF. La membrana teñida se escaneó y se eliminó el tinte con lavados sucesivos con agua.

Para la detección inmunológica de las proteínas de interés, las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (5% leche desnatada (Panreac, Barcelona, ES) en TBS/Tween (2,42 g/L de Tris base, 8,77 g/L de NaCl y 0,05% de Tween-20 (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA)) durante una hora a temperatura ambiente, en agitación. A continuación, se incubó la membrana con anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados, así como su dilución de uso se especifican en la Tabla 2. Todos se incubaron durante toda la noche en cámara fría y rotación. Tanto el secundario anti-conejo-HRP, como el anti-ratón-HRP (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) se emplearon en dilución 1:5.000 en TBS/Tween y se incubaron dos horas a temperatura ambiente y en rotación.

Finalmente se detectó la unión antígeno-anticuerpo mediante quimioluminiscencia, empleando un kit comercial de ECLs (Electroquimioluminiscencia). Para una detección normal, se empleó el kit Pierce (Pierce ECL Western Blotting Substrate, (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)), y cuando fue necesario, se empleó el kit de sustratos de máxima sensibilidad SuperSignal WestFemto (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Ambos kits contienen soluciones de peróxido de hidrógeno y luminol y se emplean en proporción 1:1. Para detectar la señal, se utilizó una reveladora automática de películas radiográficas (AGFA, Mortsel, BE) y películas Carestream Medical X-Ray Film (Kodak, Rochester, USA) o películas Cytiva Amersham Hyperfilm (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Finalmente, la cuantificación de los niveles de expresión se realizó normalizando la señal obtenida para cada proteína respecto al Ponceau de la membrana correspondiente y empleando el software ImageJ (NIH, USA).

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot y su uso.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia
Anti-E-cadherina	Policlonal de conejo	1:500	GeneTex, GTX100443
Anti-eIF5A2	Policlonal de conejo	1:1.000	Proteintech Group, 17069-1-AP
Anti-ezrina	Monoclonal de ratón	1:1.000	Thermo Fisher Scientific, MA5-13862
Anti-Flag	Monoclonal de ratón	1:1.000	Sigma-Aldrich Corporation, F3165
Anti-FHOD1	Policlonal de conejo	1:500	Merck Millipore, ABS53
Anti-fibronectina	Policlonal de conejo	1:500	GeneTex, GTX112794
Anti-GFP	Policlonal de conejo	1:1.000	Rockland Immunochemicals, 600-401-215
Anti-Hipusina	Policlonal de conejo	1:5.000	Merck Millipore, ABS1064
Anti-HSP90	Monoclonal de ratón	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology, sc-13119
Anti-MTA1	Policlonal de conejo	1:500	Bethyl Laboratories, A300-280A-M
Anti-N-cadherina	Policlonal de conejo	1:500	GeneTex, GTX127345
Anti-p85	Policlonal de conejo	1:500	Bethyl Laboratories, A302-593A-M
Anti-SNAI1	Policlonal de conejo	1:500	GeneTex, GTX125918
Anti-vimentina	Monoclonal de ratón	1:1.000	Abcam, ab8978

6. Análisis de la traducción celular

En este trabajo, se han llevado a cabo dos aproximaciones experimentales con el objetivo de relacionar de forma específica la maquinaria traduccional celular con la isoforma eIF5A2.

6.1. Perfiles polisomales

Varios ribosomas pueden unirse al mismo tiempo a un mismo ARNm y llevar a cabo su traducción, creando complejos que se pueden separar en gradientes lineales de sacarosa, ya que las ribonucleoproteínas unidas a mensajero (RNPM) que están siendo traducidas por polirribosomas sedimentan más que aquellas que no están siendo traducidas (Pringle, McCormick, and Cheng 2019).

Entre otros métodos para el estudio de los mRNA traducidos, como los perfiles ribosomales o la purificación de ribosomas traductores por afinidad, los perfiles polisomales son los más empleados, y además ofrecen ciertas ventajas como que gracias a ellos es posible acceder a la secuencia completa del ARNm, incluidas las regiones no codificantes, y que puede emplearse tanto para estudios posteriores de transcriptómica como de proteómica (Chassé *et al.* 2017).

En este trabajo, hemos llevado a cabo la recogida de extractos celulares sembrados en placa de 150 mm y su posterior lisis basándonos en el protocolo descrito por Gandin *et al.* (Gandin *et al.* 2014). Brevemente, las células se trataron con cicloheximida (CHX) (Merck, Darmstadt, DE) 100 µg/mL para detener la síntesis proteica y se levantaron las células con tripsina y tras centrifugar 5 min a 400 g a 4°C y retirar el medio con tripsina, se lavaron bien las células con PBS frío + CHX 100 µg/mL. Se centrifugó de nuevo y el pellet se resuspendió en el buffer de lisis hipotónico, compuesto por 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM MgCl₂, 1,5 mM KCl y el mix de proteasas PMSF 1 mM (Bio-Techne, Bristol, UK), aprotinina 1 µg/mL (Bio-Techne, Bristol, UK), leupeptina 1 µg/mL (Bio-Techne, Bristol, UK) y pepstatina 1 µg/mL (Bio-Techne, Bristol, UK). Posteriormente se añadió Tritón X-100 al 10% para tener una concentración final de 0,5% y deoxicolato (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) al 10% para alcanzar una concentración final de 0,5%. El extracto se centrifugó 7 min a 16.000 g a 4°C y se midió la OD a 260 nm del sobrenadante para cargar en todos los gradientes de sacarosa la misma cantidad de muestra.

Los gradientes lineales de sacarosa 10%-50% se realizaron en el *Gradient Master* (Biocomp, Fredericton, CA) y se conservaron en frío hasta su uso. Se depositó la muestra con cuidado en cada gradiente, y tras equilibrarlos con ayuda de una balanza, se cargaron en los soportes del rotor SW40Ti (Beckman Coulter, CA, USA). Se centrifugaron en la ultracentrífuga Beckman Optima XL-100 (Beckman Coulter, CA, USA) a 36.000 rpm durante 2 h a 4°C en aceleración y desaceleración lenta.

A continuación, se recogieron las fracciones del perfil polisomal. Para ello, se empleó el *Piston Gradient Fractionator* (Biocomp, Fredericton, CA), adaptado con un espectrofotómetro y dirigido por el software Triax (Biocomp, Fredericton, CA), que a medida que el pistón absorbía la muestra en el gradiente lineal de sacarosa, el espectrofotómetro medía su absorbancia a 254 nm y el software dibujaba el perfil polisomal.

Las fracciones recogidas se emplearon para precipitar proteína. Para ello, en función de los distintos picos de RNPm, monosomas, bisomas, etc. obtenidos en el perfil, se agrupó el volumen de varias fracciones. Se añadió ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) al 50% para llegar a una concentración final del 10% y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se precipitaron las proteínas centrifugando a 4°C a 16.000 g durante 10 min. Tras lavar el pellet con acetona a -20°C, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en Laemmly buffer completo 2X.

El extracto proteico se empleó para estudiar la expresión de diferentes proteínas mediante *Western Blot*, tal y como se describe en el apartado 5.3.

6.2. Ensayos de marcaje con puromicina

La puromicina es un antibiótico aminonucleósido, que es producido por la bacteria *Streptomyces alboniger*. Estructuralmente, es un análogo de una tirosina unida a un ARNt, y al tratar las células con puromicina, esta se incorpora a la cadena polipeptídica nascente y detiene la elongación (Nathans 1964).

La siembra, fijación celular y la inmunofluorescencia se realizó tal y como se describe en los distintos apartados del punto 7, con la diferencia en este experimento, de que previamente a la fijación celular, se trató el cultivo con 50 µg/mL de puromicina (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) durante 5 min a 37°C, para permitir su incorporación en las cadenas polipeptídicas.

7. Análisis de imagen

Todas las células que se utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia se sembraron sobre cubreobjetos redondos (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) que se habían depositado en el fondo del pocillo de la placa de cultivos, a la densidad necesaria para que el día en el que finalizaba el experimento, el cultivo estuviese aproximadamente a un 60% de la confluencia. Esta confluencia más baja es necesaria para poder tener zonas en el cubreobjetos con células individuales que observar al microscopio.

Las células se fijaron en el cubreobjetos incubándolas en la misma placa de cultivo 20 min con paraformaldehído (PFA) al 4% (ANAME, Madrid, ES). Tras varios lavados con PBS, se conservaron añadiendo a los pocillos PBS con azida sódica (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) al 0,05% y sellando la tapa de la placa con Parafilm. Se guardaron en cámara fría a 4°C hasta su uso.

7.1. Fijación del citoesqueleto

En los experimentos realizados para el estudio del citoesqueleto de actina, las células se sometieron a un protocolo específico para fijar el citoesqueleto.

Para ello se incubaron las células con 0,2 mg/mL de DSP (dithiobis (succinimidyl propionate)) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Se lavó el cultivo con una solución atemperada de glicina 0,1 M en medio de cultivo sin suplementar, para inactivar el DSP, y tras lavar con PBS, se incubaron las células con tampón Tsb pH 6,9 (1mM EGTA

(Sigma-Aldrich Corporation MO, USA), 4% de polietilenglicol 6.000 (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA), 100 mM PIPES (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) y 0,5% Tritón x-100 en agua destilada)). Tras esta incubación, se fijaron las células con PFA 4% y se lavaron con glicina 0,1 M disuelta en PBS. Como en el resto de los experimentos, las placas fijadas se conservaron en PBS con azida sódica al 0,05%, selladas con Parafilm y a 4°C hasta su uso.

7.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se llevó a cabo en cámara húmeda, en la cual se colocaron los cubreobjetos con las células fijadas sobre Parafilm. Las células se permeabilizaron con Tritón x-100 1% en PBS durante 10 min. A continuación, se incubaron a temperatura ambiente 1 hora con BSA al 5% en PBS para bloquear las posibles uniones inespecíficas. Tras retirar la solución de bloqueo, se añadió el anticuerpo primario, en las condiciones detalladas en la Tabla 3.

Tras retirar el anticuerpo primario y lavar con PBS, se añadió el anticuerpo secundario, en las condiciones especificadas en la Tabla 4. En los experimentos en los que se estudió la integridad del citoesqueleto de actina, las células se incubaron con faloidina conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA), durante 2 h a temperatura ambiente y concentración 1:800. La faloidina es una micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides*, que es capaz de unirse específicamente microfilamentos y de estabilizarlos, lo cual la faculta para ensayos de microscopía empleando una variante marcada fluorescentemente con un fluorocromo. La faloidina-TRITC también se incubó durante 2 h a temperatura ambiente.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia y su uso.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia
Anti-eIF5A2	Policlonal de conejo	1:250	Sigma-Aldrich Corporation, HPA029090
Anti-Flag	Policlonal de conejo	1:200	Cell Signaling, #2368T
Anti-Flag	Monoclonal de ratón	1:200	Sigma-Aldrich Corporation, F3165
Anti-Hipusina	Policlonal de conejo	1:1.000	Merck Millipore, ABS1064
Anti-Puromicina	Monoclonal de ratón	1:1.000	Merck Millipore, MABE343

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia y su uso.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial
Anti-ratón IgG Texas Red	Policlonal de cabra	1:600	Invitrogen, T862
Anti-ratón IgG Alexa Fluor 633	Policlonal de cabra	1:600	Invitrogen, A21053
Anti-conejo IgG Alexa Fluor 568	Policlonal de cabra	1:600	Invitrogen, A11036
Anti-conejo IgG Alexa Fluor 633	Policlonal de cabra	1:600	Invitrogen, A21072

Finalmente, tras realizar lavados con PBS, los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos con el medio acuoso permanente *Dako Ultramount* (Agilent Dako, CA, USA), que ya lleva incorporado el fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), para el marcaje de los ácidos nucleicos del núcleo.

Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal invertido Leica TSC SP2 (Leica Biosystems, Wetzlar, DE), en un microscopio confocal multifotón de alta resolución Leica TSC SP8 (Leica Biosystems, Wetzlar, DE) o en un microscopio óptico Apotome (Carl Zeiss AG, Jena, DE).

8. Análisis celular

8.1. Citometría de flujo

Para analizar el porcentaje de células del cultivo de H1395-EV y H1395-eIF5A2 que han incorporado el plásmido transfectado, se analizó la expresión de la GFP mediante citometría de flujo. Tras tripsinizar el cultivo, se recogieron 100.000 células en 350 μ L de PBS con 0,5 μ g/mL de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich Corporation MO, USA), y se analizaron por el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman-Coulter, CA, USA). El yoduro de propidio es un agente intercalante fluorescente que se une al material genético de las células muertas, ya que no es capaz de atravesar la membrana celular de las células vivas, por lo que se obtiene como resultado el número de células viables que expresan GFP.

8.2. Ensayos de proliferación

Se realizaron ensayos de proliferación celular tanto en células silenciadas de las líneas A549 y H1395, como en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. En el caso de los experimentos con células silenciadas, éstas se sembraron en placas de 6 pocillos y se silenciaron como se indica en el apartado 3.2. A las 24 h del silenciamiento, las células se levantaron y se resembraron las distintas condiciones del silenciamiento por triplicado en una placa de 96 pocillos (Corning, MA, USA) tratada para el cultivo en adherencia, a una densidad de 1.000 células por pocillo. Para los experimentos con las líneas estables, las células se sembraron directamente en la placa de 96 pocillos, a una densidad de 1.000 células por pocillo, y en esta misma placa se realizaron los distintos tratamientos con TGF β 1 y GC7.

Para cuantificar la proliferación celular, se empleó el kit CellTiter 96 (Promega Corporation, Madison, USA), que emplea un método colorimétrico para determinar el número de células viables en el cultivo. Este kit contiene una sal de tetrazolio (MTS) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), y un reactivo de acoplamiento de electrones, el PMS (metosulfato de fenazina). El MTS es reducido por las células viables gracias a las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas, y genera un compuesto de formazán que es soluble en el medio de cultivo de las células y le da color. Tras aplicar los reactivos del kit en proporción 1:20, se incubaron durante 3 horas y se midió la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro Victor2.

Con el fin de utilizar los ensayos MTS para estudiar la proliferación celular, se sembraron 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 8.000 y 10.000 células H1395-EV y H1395-eIF5A2 por pocillo P96 y por triplicado. 72 horas después de la siembra, se realizó el MTS y se verificó la linealidad entre la densidad celular y la absorbancia a 490 nm mediante un análisis de regresión lineal simple en Graphpad (Fig. S1). Por tanto, el valor de la absorbancia obtenida en los ensayos de MTS realizados en las distintas líneas celulares, es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo, lo que nos permite relacionar la viabilidad con la proliferación.

8.3. Ensayos de migración

Para el estudio de la migración celular se llevaron a cabo ensayos de herida, en los que se estudia la movilidad que tienen las células calculando el tiempo que tardan en cerrar una herida realizada sobre el cultivo en monocapa.

Se realizaron ensayos de migración en células silenciadas de las líneas A549 y H1395, y en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Previamente a la siembra, las células silenciadas se trataron en las mismas condiciones detalladas para los experimentos de proliferación. En la siembra en placa de 96 pocillos se sembraron 50.000 células por pocillo en el caso de las células H1395, y las líneas H1395-EV y H1395-eIF5A2 y se sembraron 30.000 células por pocillo en el caso de la línea A549.

La herida sobre la monocapa en adherencia se realizó de forma automática con el equipo *AutoScratch* (BioTek, VT, USA). Posteriormente, se lavaron bien las placas con PBS y se añadió en cada pocillo el medio de crecimiento en adherencia suplementado con TGFβ1 o GC7 en las condiciones necesarias. La placa se colocó en el sistema *BioSpa 8* (BioTek, VT, USA), que mantiene la temperatura a 37°C y la concentración de CO₂ al 5% y lleva acoplado el sistema *Cyation 5* (BioTek, VT, USA), que realiza fotos en contraste de fases de cada pocillo cada hora durante un máximo de 96h. Posteriormente, estas imágenes se analizaron con el software *Gene 5* (BioTek, VT, USA), que permitió calcular el ancho de la herida a lo largo del tiempo y así observar su cierre.

9. Modelos experimentales *in vivo*

9.1. Animales de experimentación

El manejo de los animales y procedimientos experimentales se realizaron según los requisitos estipulados en el Real Decreto 53/2013 sobre la protección de los animales de experimentación y otros fines científicos. El procedimiento (2019 / VSC / PEA /0156) fue aprobado por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (Comunidad Valenciana, España). Se siguieron en todo momento las normas y recomendaciones del Comité de Ética para el Bienestar Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Un total de 24 ratones NSG (JAX® Mice Strain, NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*, Charles River Laboratories, MA, USA) se incluyeron sin distinción por sexo, en los distintos estudios llevados a cabo en este proyecto de tesis doctoral, y que son detallados a continuación. De ellos, 3 fallecieron antes del fin del experimento y la recogida de muestras y no se incluyeron en los análisis posteriores.

9.2. Inyección subcutánea de células

Previamente a la inyección, las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 se prepararon en un volumen final de 200 μ L de medio sin suero y Matrigel (Falcon Corning, Glendale, USA) en proporción 1:1. Se realizaron cuatro tandas de inyecciones, una con 1.000.000 de células por inyección, dos con 50.000 células por inyección y otra con 500 células por inyección.

Ratones con 5-6 semanas de edad se anestesiaron con Isoflurano (B. Braun VetCare, Barcelona, ES), con una dosis inicial al 5% y dosis de mantenimiento al 2,5%. Se colocaron los ratones en posición supina y se inyectaron las células, de forma subcutánea, en el lado derecho del abdomen. Tras esto, se esperó a la recuperación del ratón de la anestesia antes de devolverlo a su jaula.

Se observó el comportamiento de los ratones y el crecimiento tumoral durante las semanas posteriores, midiendo el tumor creciente con el pie de rey dos veces por semana. Según los criterios de fin de experimento, los ratones podían mantenerse en crecimiento hasta que el tumor alcanzase un volumen de 1200 mm³, aunque en todos los casos los experimentos se detuvieron antes de acuerdo con otros criterios de bienestar animal como cambios en el comportamiento o la pérdida de peso de los animales. Se realizó la eutanasia de los ratones con CO₂. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula $VT \text{ (mm}^3\text{)} = d^2 \times D/2$, donde D es el diámetro mayor y d es el diámetro menor del tumor (Tomayko and Reynolds 1989).

9.3. Obtención de muestras

Al fin de cada experimento, se realizó la eutanasia de los ratones mediante sobredosis de CO₂, tras lo cual, se procedió a la disección de cada animal, recogiendo para su procesado posterior el tumor, los pulmones y el hígado de cada ratón.

10. Análisis histológico de las muestras de modelo animal

10.1. Fijación en PFA

El tumor, los pulmones y el hígado recogidos de los ratones se fijaron sumergiéndolos en PFA al 4% durante toda la noche en agitación y a 4°C. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PBS para retirar los restos de PFA y la muestra se almacenó en PBS + azida sódica 0,05% hasta su análisis posterior.

10.2. Inclusión en parafina y criopreservación

Los tejidos preservados en PFA se deshidrataron previamente a la inclusión con lavados de etanol al 70% a 45°C, seguidos de lavados de etanol al 95% a 45°C, lavados de etanol 100% a 45°C y por último, lavados de xileno a 45°C. El tejido se incluyó en parafina en el procesador de tejidos Leica ASP300S (Leica Biosystems, Wetzlar, DE), realizando varios lavados de parafina a 64°C. Por último, se crearon los bloques parafinados con la estación de inclusión EC350 (Leica Biosystems, Wetzlar, DE).

El hígado y los pulmones obtenidos de los ratones se observaron en la lupa de fluorescencia con el filtro de GFP, con la finalidad de observar si las células inyectadas, que son GFP+, podrían haber migrado a estos órganos y haber generado posibles puntos de metástasis. Al encontrar zonas positivas en los pulmones, se decidió crioproteger los tejidos mediante la incubación durante 16 h en sacarosa al 30% en PBS. A continuación, las muestras se encastraron en OCT (VWR, PA, USA) para su corte con el criotomo.

10.3. Obtención de cortes

Los cortes de los bloques de parafina se realizaron en el micrótopo giratorio electrónico de parafina Microm HM 340E (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), obteniendo cortes de 7 µm de grosor.

Los cortes de los pulmones conservados en OCT se realizaron en el Criostato Leica LC1900 (Leica Biosystems, Wetzlar, DE), obteniendo cortes de 7 µm de grosor.

10.4. Inmunofluorescencia

Los cortes de los pulmones se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje acuoso Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Finalmente, se realizaron fotografías en un microscopio óptico Apotome de zonas aleatorias en cada corte de tejido.

11. Análisis histológico de las muestras de biopsias de pacientes

11.1. Micromatrices de tejido (TMA) y técnicas de marcaje inmunohistoquímico

Se recibieron muestras de tejido tumoral y tejido sano adyacente de pacientes intervenidos en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, ES). Los criterios para incluir a los pacientes en el estudio fueron que el tumor fuese extirpable, que no hubiese penetrado, y que fuese de cáncer de pulmón primario. Los pacientes incluidos en este estudio y sus características clínicas se detallan en la Tabla 5.

En el momento de la extracción, las muestras fueron revisadas por un patólogo y posteriormente se enviaron en medio DMEM/F-12 + GlutaMAX (Gibco, Paisley, UK) a nuestro laboratorio en el CIPF.

Los TMA (del inglés *Tissue microarrays*, micromatrices de tejido) son bloques parafinados que se formaron con cilindros tisulares extraídos de los bloques de parafina donde se habían incluido originariamente el tejido tumoral y sano de las muestras de pacientes. Estos cilindros son reembebidos en un único bloque de parafina, lo que permite tener hasta 100 muestras distintas en un único bloque.

La construcción del TMA se realizó con la ayuda del Dr. Cremades (Hospital Universitario de la Ribera, Alzira, España), quien nos indicó la zona que era representativa de cada tejido en los bloques iniciales. Se incluyeron dos cilindros por muestra. Una vez construido el TMA se realizaron cortes de 7 μ m con el micrótopo de parafina.

Estos TMA se emplearon para realizar tinciones inmunohistoquímicas con las que describir las características del tejido gracias a la hematoxilina-eosina (H&E) y observar la expresión de los marcadores Ki67 (marcador de proliferación) y eIF5A2.

La tinción con H&E se llevó a cabo con el preparador de muestras Dako CoverStainer (Agilent, Santa Clara, USA), que realiza de forma automatizada la rehidratación, tinción, deshidratación y montaje de las preparaciones. La inmunohistoquímica con los marcadores Ki67 y eIF5A2 se realizó con el Autostainer Link48 (Agilent, Santa Clara, USA). El anticuerpo para Ki67 (IR626, Agilent, Santa Clara, USA), se utilizó sin diluir y el anticuerpo para eIF5A2 (HPA029090, Sigma-Aldrich Corporation MO, USA) se utilizó a una dilución 1:150.

Finalmente, los TMA se fotografiaron utilizando el escáner PANNORAMIC 250 Flash III Scanner (3DHISTECH, Budapest, HU) y el software Panoramic Viewer/Case Viewer (3DHISTECH, Budapest, HU).

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los pacientes.

Muestra	Género	Edad	Estadio	Estadio TNM	Histología	Fumador	Progresión / Exitus	Estatus mutacional	SLE (meses)
LF01	Masculino	57	IIb	T2aN1MX	ADC predominantemente acinar	Sí	No	EGFR WT	31,53
LF05	Femenino	67	IVa	T3N1M1b	ADC predominantemente sólido	Sí	No	EGFR WT / ALK WT	29,23
LF09	Masculino	75	Ib	T2aN0MX	ADC mucinoso predominantemente lepidico	Sí	No	EGFR WT	27,57
LF15	Masculino	54	IIb	T3N0M0	ADC predominantemente sólido	Sí	Sí	EGFR WT	14,23
LF19	Masculino	76	Ia3	T1cN0M0	ADC acinar	Sí	No	EGFR WT	24,30
LF20	Masculino	61	IIIa	T2bN2M0	ADC acinar	Sí	Sí	EGFR WT	12,10
LF21	Masculino	79	Ia3	T1cN0M0	Carcinoma Escamoso	Sí	No	EGFR WT	22,10
LF29	Masculino	52	IVb	T2bN0M1b	ADC sólido escasamente diferenciado	Sí	Sí	EGFR WT / ALK WT	15,90

12. Análisis estadísticos

Todos los experimentos mostrados en este trabajo de tesis doctoral se realizaron por triplicado. El análisis bioinformático de los datos obtenidos se realizó empleando el software de gráficos y estadísticas científicas GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA). Se empleó la prueba T de Student, el test ANOVA de dos vías con el

test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras o el test ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras, en función del experimento a analizar. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un intervalo de confianza del 95% y un p-valor menor de 0,05.

RESULTADOS

La proteína eIF5A mejor estudiada es, con diferencia, eIF5A1. Esta proteína es muy abundante y su expresión es ubicua. Su función biológica, además de con la traducción, se ha relacionado con la transcripción, la renovación del ARNm y el transporte nucleocitoplasmático. Según el contexto celular, eIF5A1 es un supresor de tumores u oncogén (Ning *et al.* 2020; Wu, Xu, and Lau 2020).

eIF5A2 sin embargo no se expresa en tejido normal, a excepción de cerebro y testículos, y su sobreexpresión se asocia con cáncer (Ning *et al.* 2020; Wu, Xu, and Lau 2020), por ello se ha postulado como un marcador potencial de mal pronóstico y etapa más agresiva de la enfermedad. Sin embargo, la regulación y la función de eIF5A2 en las células cancerosas, incluido el CPNM, todavía no están bien definidas. El hecho de que los ratones knock-out para eIF-5A2 son viables y tienen un desarrollo normal (Pällmann *et al.* 2015) y su sobreexpresión en el cáncer, hacen de eIF5A2 una diana terapéutica muy atractiva en el cáncer. Sin embargo, la regulación de eIF5A2, su modificación por hipusinación y su papel funcional como factor de traducción en células de NSCLC que experimentan migración e invasión aún está mal definida.

En este proyecto de investigación hemos analizado la expresión y función de eIF5A2 en células de CPNM.

1. Clasificación fenotípica de las líneas celulares A549, H1395, PC9 y H441

En primer lugar, se ha analizado la expresión basal a nivel de ARNm y proteína de marcadores de fenotipo epitelial (E-cadherina) y mesenquimal (vimentina) en las diferentes líneas celulares de CPNM disponibles en el laboratorio, para poder clasificarlas como líneas celulares epiteliales o mesenquimales. Los resultados muestran que las células con mayor nivel de ARNm y de proteína de E-cadherina son las H441, seguidas de las H1395 y las PC9. Estas líneas celulares no expresan vimentina, y por tanto las podemos clasificar como epiteliales. Las A549 apenas expresan E-cadherina, pero expresan elevados niveles de vimentina, y por tanto las podemos clasificar como una línea celular mesenquimal (Fig. 10).

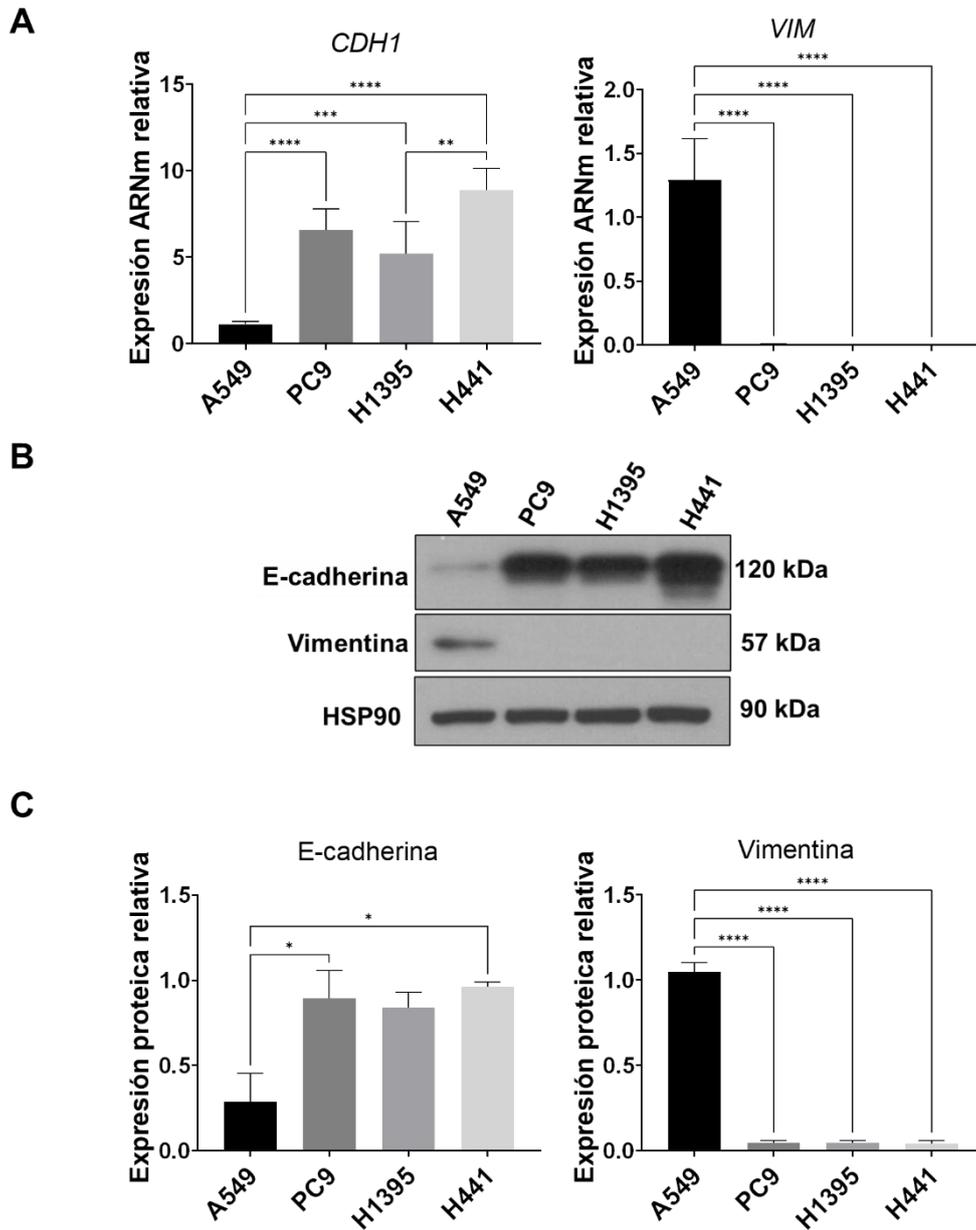
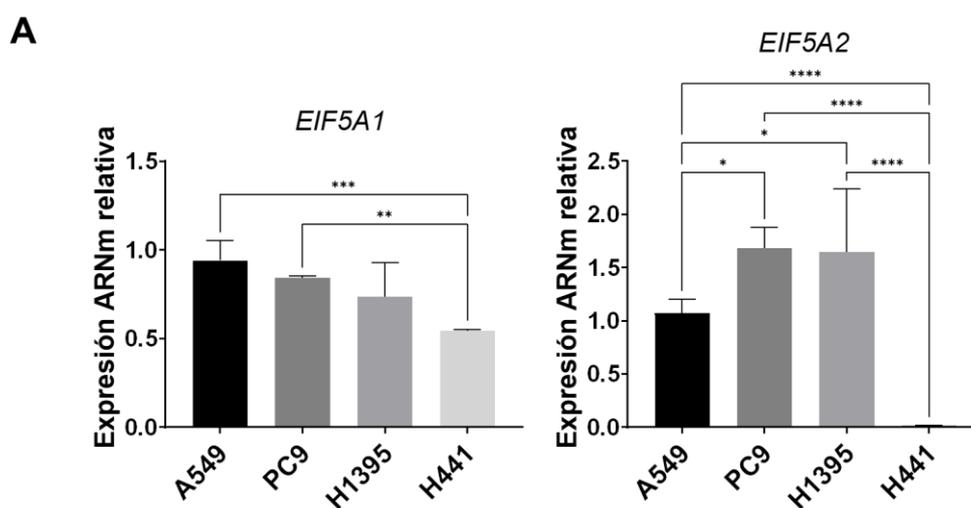


Figura 10. Expresión basal de E-cadherina y vimentina en las líneas celulares de CPNM A549, PC9, H1395 y H441. A. Expresión de ARNm de CDH1 y VIM. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR a las 72 h de la siembra. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). **B.** Expresión de los niveles proteicos de E-cadherina y vimentina. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3) **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas E-cadherina y vimentina. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

A continuación se analizaron los niveles de ARNm y proteína de eIF5A1 y eIF5A2 (Fig. 11A), además de los niveles proteicos de la forma hipusitada de eIF5A1 y eIF5A2 (Fig. 11B y C).

Todas las líneas celulares analizadas expresan eIF5A1. Las A549 son las que mayor niveles de ARNm de *EIF5A1* expresan, mientras que las H441 son las que menos *EIF5A1* expresan. Sin embargo, esto no coincide con los niveles proteicos observados, ya que las líneas PC9 y H1395 expresan más proteína eIF5A1 que las A549. Los análisis de la forma hipusitada de eIF5A1, muestran que sus niveles de expresión son muy similares en estas tres líneas celulares, mientras que H441 es la línea que menos eIF5A1 hipusitado expresa.

En cuanto a los niveles de ARNm de *EIF5A2*, las líneas PC9 y H1395 expresan niveles similares de *EIF5A2*, siendo estos niveles 0,5 veces mayores que en la línea A549. Las células H441 apenas lo expresan. Esta tendencia coincide con los niveles de proteína de eIF5A2 y eIF5A2 hipusitado observados, siendo las células H1395 y PC9 la que mayores niveles expresan. En las células A549 también se observó la expresión de eIF5A2 y eIF5A2 hipusitado al realizar mayor exposición del *Western Blot*, por lo que se muestra un panel con este resultado separado para esta línea celular (Figura 11B, panel derecho).



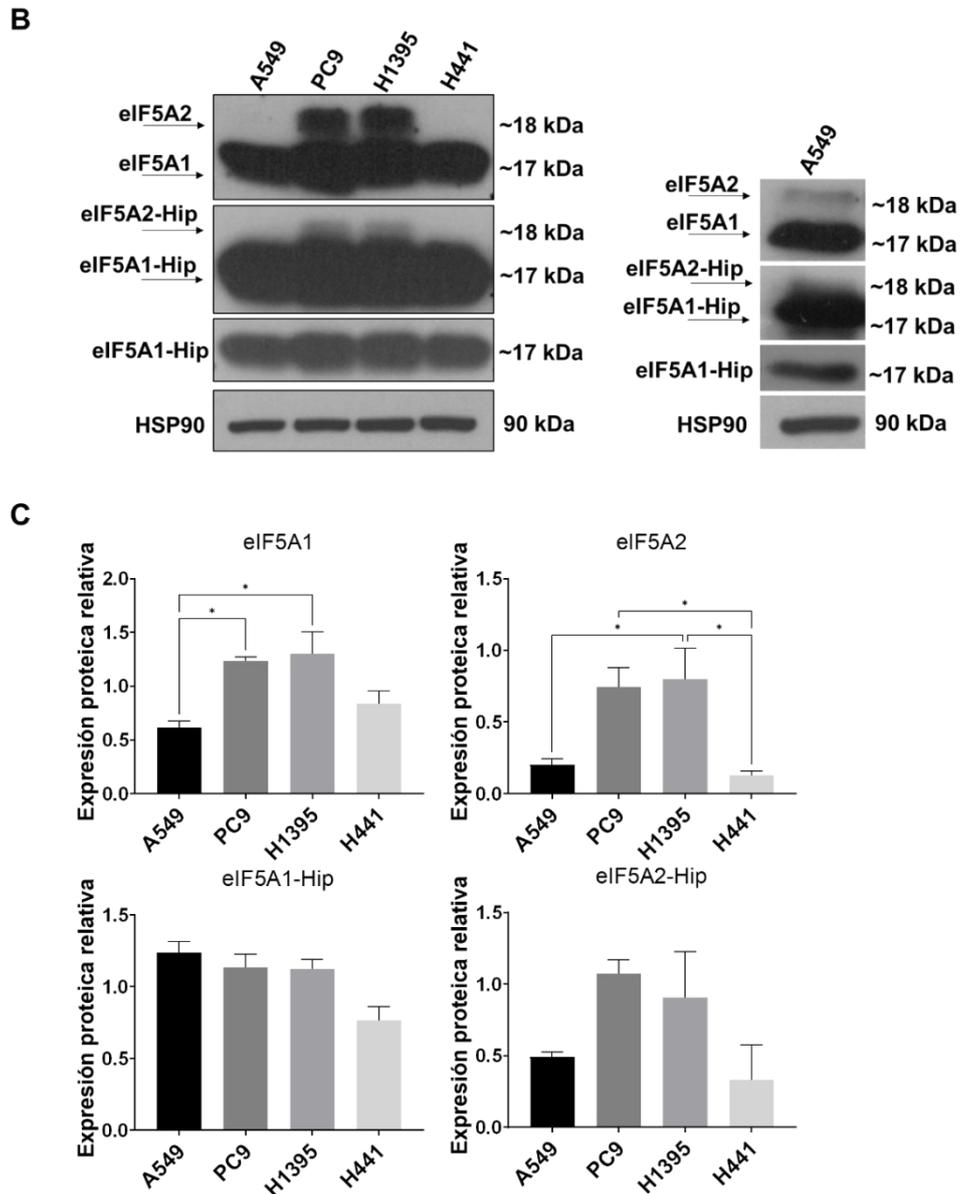


Figura 11. Expresión basal de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en las líneas celulares de CPNM A549, PC9, H1395 y H441. A. Expresión de ARNm de EIF5A1 y EIF5A2. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR a las 72 h de la siembra. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (****p<0,0001). **B.** Expresión de los niveles proteicos de eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. En el panel de la derecha se muestra una imagen de mayor exposición de Western Blot para visualizar la expresión de eIF5A2 hipusinado en la línea A549. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3).

(Continuación Fig. 11) **C. Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado.** Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05).

2. Estudio de la inhibición génica de eIF5A1 y eIF5A2

A continuación se analizó el fenotipo producido por la pérdida de función de eIF5A1 y eIF5A2 mediante silenciamiento génico con ARN pequeño de interferencia (ARNpi) en las líneas A549 y H1395. Para ello se diseñaron oligonucleótidos para silenciar de manera específica eIF5A1 y eIF5A2 a pesar de la gran homología en su secuencia génica (Fig. 12).

HumanEIF5A2.seq	ATGGCAGACGAAATTGATTTCACTACTGGAGATGCCGGGGCTTCCAGCACTTACCCATGCAAGTGTCTGGCCTTGGCAA	80
HumanEIF5A1.seq	ATGGCAGATGACTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCTCAGCCACCTTCCAATGCAAGTGTCTCAGCATTACGTAA	80
HumanEIF5A2.seq	AAACGGCTTCGTGGTGTCTCAAAGGACGACCATGCAAAATAGTGGAGATGTCAACTTCCAAAAGTGGAAAGCATGGTCATG	160
HumanEIF5A1.seq	GAATGGCTTTGTGGTGTCTCAAAGGCCGGCCATGTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCACGGCCACG	160
HumanEIF5A2.seq	CCAAGGTTACCTTGTGGAATTGATATTTTACGGGCAAAAATATGAAGATATTTGTCTTCTACTCACAACATGGAT	240
HumanEIF5A1.seq	CCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGACATCTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCAACTCATAATATGGAT	240
HumanEIF5A2.seq	GTTCCAAATATTAAGAGAAATGATTATCAACTGATATGCATTCAAGATGGTTACCTTCCCTGCTGACAGAACTGGTGA	320
HumanEIF5A1.seq	GTCCCCAACATCAAAGGAATGACTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCACTGCTCCAGGACAGCGGGGA	320
HumanEIF5A2.seq	AGTTCGTGAGGATCTTAAACTGCCAGAAGGTGAAGTGAAGAAATAGAGGGAAAATACAATGCAGGTGAAGATGTAC	400
HumanEIF5A1.seq	GGTACGAGAGGACCTTCGTCTCCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTACGACTGTGGAGAAGATCC	400
HumanEIF5A2.seq	AGGTGTCTGTCATGTGTGCAATGAGTGAAGAATATGCTGTAGCCAT-AAAACCCTGC-AAATAAACGGAAAC	462
HumanEIF5A1.seq	TGATCACGGTGTCTGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAAATAACTGGCTCC	465

GTACGACTGTGGAGAAGAG oligonucleótidos para silenciar EIF5A1
 GACAGAACTGGTGAAGTT oligonucleótidos para silenciar EIF5A2

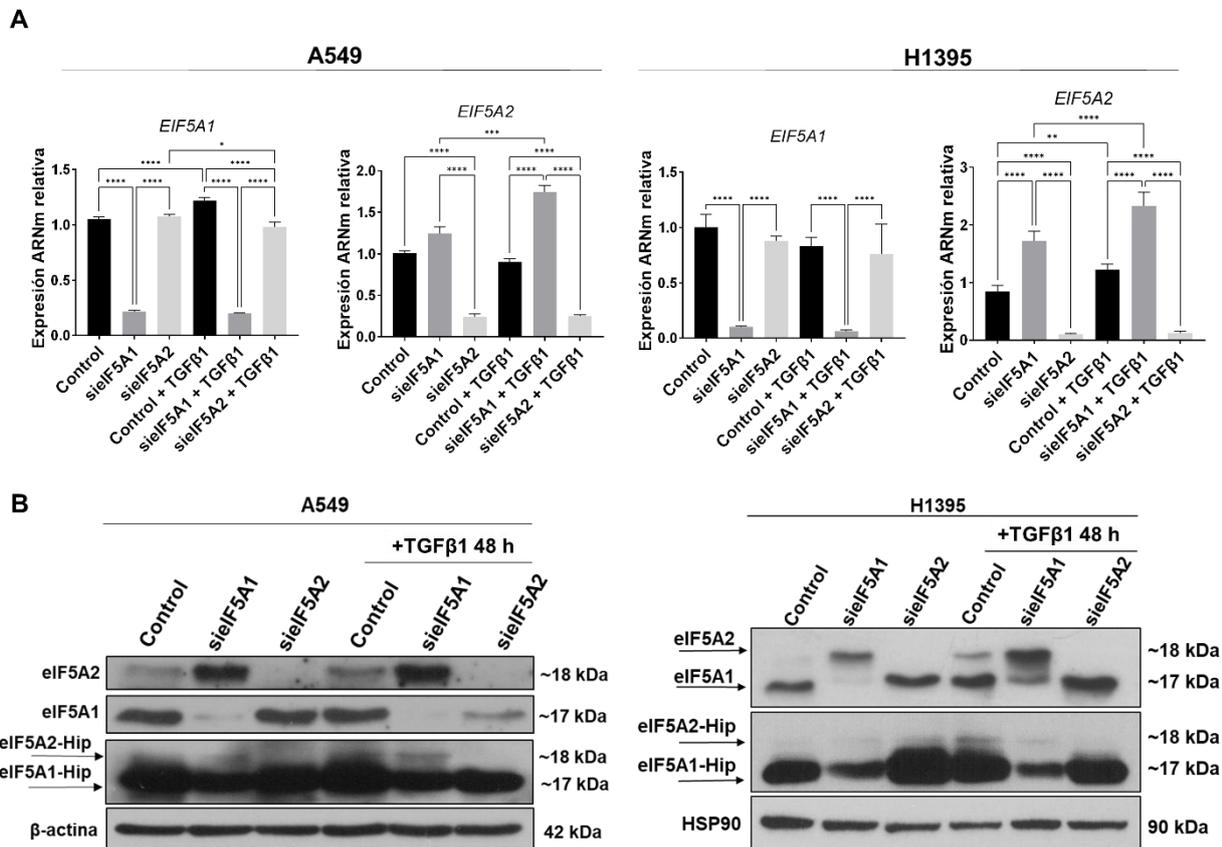
Figura 12. Secuencia de oligonucleótidos específicos para el silenciamiento por ARNpi contra eIF5A1 y eIF5A2. La imagen muestra las secuencias de eIF5A1 y eIF5A2. En azul de destaca la secuencia de oligonucleótidos utilizada para silenciar eIF5A1 y en verde destaca la secuencia de oligonucleótidos utilizada para silenciar eIF5A2.

2.1. El silenciamiento génico de eIF5A es específico de cada isoforma y existe una regulación entre ambas

Se ha comprobado que el silenciamiento de eIF5A1 y eIF5A2 es específico mediante el análisis de su expresión génica por qPCR, en el que se observa el descenso de los niveles de mensajero de cada gen en la muestra en la que se silencia (Fig. 13A).

Además, observamos, tanto mediante qPCR como por *Western Blot*, que al silenciar *EIF5A1*, los niveles de eIF5A2 aumentan, lo que sugiere que podría haber una compensación entre ambas isoformas (Fig. 13). Como se ha comentado en la introducción, eIF5A2 promueve la EMT en distintos tipos de cáncer (Tang *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2012; Meng *et al.* 2015), y una citoquina clave en la inducción de la EMT es TGFβ1 (J. Xu, Lamouille, and Derynck 2009; Hao, Baker, and Dijke 2019). Para examinar una posible co-regulación entre eIF5A2 y TGFβ1 en células de cáncer de pulmón, las células silenciadas con *EIF5A1pi* o *EIF5A2pi* se trataron con 10 ng/ml de TGFβ durante 48 h. En estas condiciones de cultivo, se observó que el incremento de los niveles de eIF5A2 es mayor en las células silenciadas con *EIF5A1pi* tratadas con TGFβ1, por lo que esta citoquina estaría induciendo la expresión de eIF5A2 (Fig. 13).

Respecto a los niveles proteicos de la proteína hipusinada, y por tanto, la forma activa, la expresión de eIF5A2 hipusinado aumenta en las células silenciadas con *EIF5A1pi* presencia de TGFβ1 casi un 50%, y la inhibición de la forma hipusinada al silenciar *EIF5A2* es mayor en presencia de TGFβ1, lo que corrobora la posible regulación de la expresión de eIF5A2 mediante TGFβ1. Respecto a eIF5A1 hipusinado, en ambas líneas se observa un descenso de aproximadamente 0,8 veces al silenciar *EIF5A1*, pero no se observa aumento de los niveles de eIF5A1 hipusinado al tratar las células con TGFβ1 (Fig. 13B y C).



C

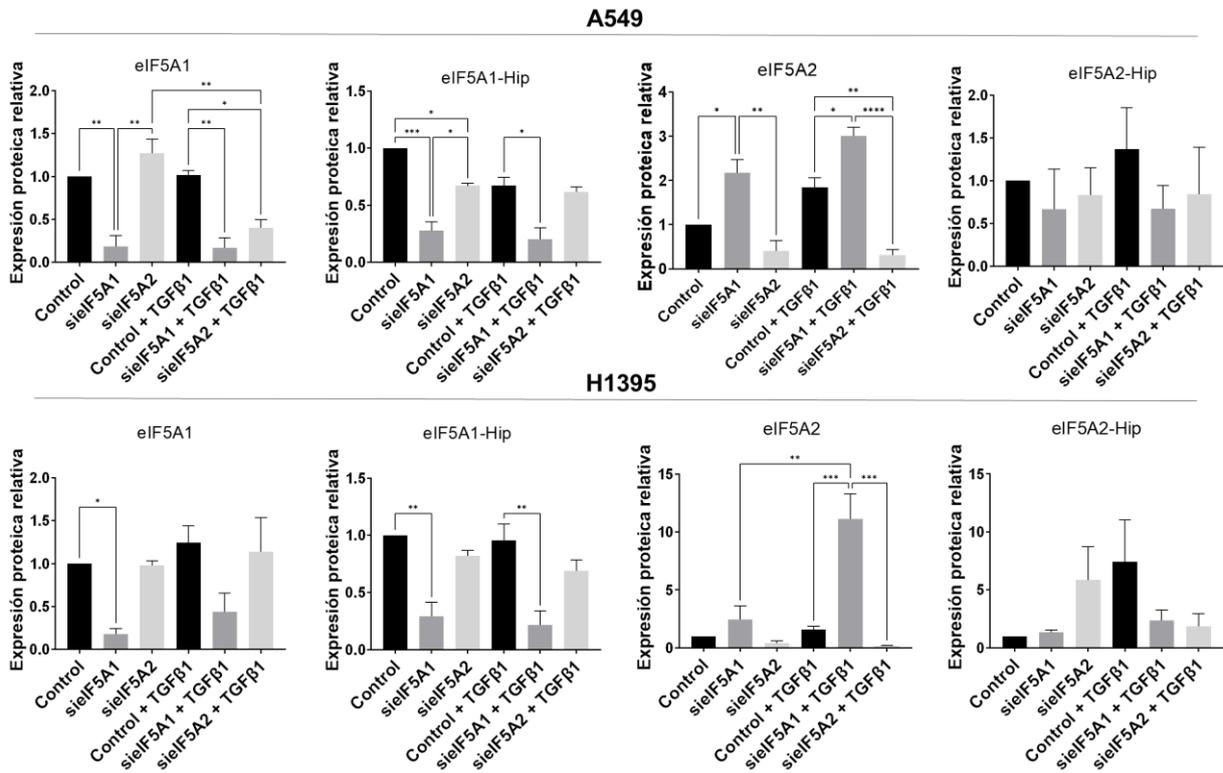


Figura 13. Expresión de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en las líneas de CPNM A549 y H1395. Las células se transfectaron con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y se trataron con TGFβ1 durante 48 h. **A.** Expresión de ARNm de EIF5A1 y EIF5A2. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

2.2. El silenciamiento génico de *EIF5A2* disminuye la proliferación celular

Se analizó la proliferación celular al silenciar eIF5A1 y eIF5A2 con los ARNpi específicos en células A549 y H1395 mediante ensayo de viabilidad con MTS. Los resultados obtenidos en ambas líneas indican una disminución de la proliferación celular al inactivar genéticamente eIF5A2. Esta disminución de la proliferación se incrementa al añadir TGFβ1 en el cultivo celular. De hecho, en presencia de TGFβ1, se observa una disminución de la proliferación celular en todas las muestras en comparación con las muestras sin tratar con TGFβ1.

Al silenciar *EIF5A1* se observa un ligero aumento de la proliferación celular respecto a sus controles. Además, este incremento es más pronunciado en las células tratadas con TGFβ1 en comparación con las células sin tratar (Fig. 14).

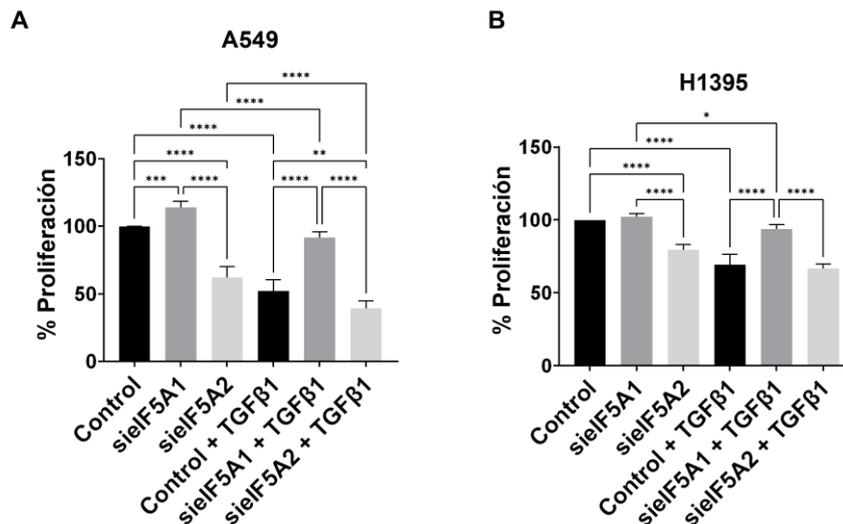


Figura 14. Ensayos de viabilidad por MTS en las líneas de CPNM A549 y H1395. Las células se transfectaron con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y se trataron con TGFβ1 durante 48 h. El MTS se realizó a las 96 h de la siembra. **A.** Viabilidad en las células A549. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad de las medias de los experimentos (N=6 con triplicados experimentales), que se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (**p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). **B.** Viabilidad en las células H1395. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad de las medias de los experimentos (N=6 con triplicados experimentales), que se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, ****p<0,0001).

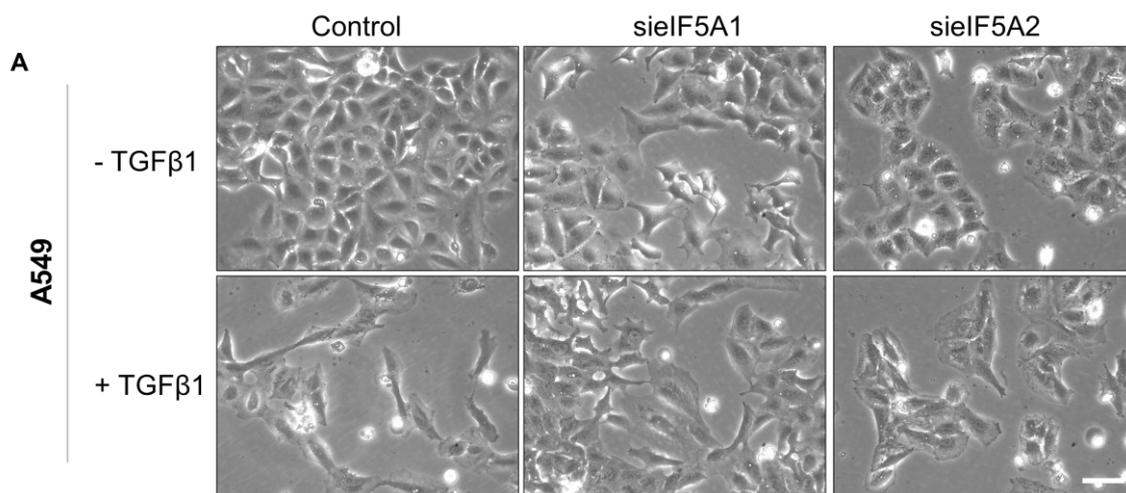
2.3. El silenciamiento génico de *EIF5A2* inhibe el cambio de la morfología celular en la EMT inducida por TGFβ1

Para determinar si *EIF5A2* contribuye al cambio fenotípico de las células durante la EMT inducida por TGFβ1 se silenció *EIF5A1* y *EIF5A2* en células tratadas o no con TGFβ1 durante 48 horas y se analizó la morfología de las células mediante microscopia de contraste de fases.

Al tratar las células A549 con TGFβ1 las células adquieren un fenotipo mesenquimal. Son más alargadas, desarrollan largos filopodios y además las células pierden las conexiones célula-célula, apareciendo como células más individualizadas. Sin embargo, se observa que al silenciar *EIF5A2*, las células permanecen más pequeñas y redondeadas. La inhibición de esta morfología de célula mesenquimal no fue tan marcada al silenciar *EIF5A1*, ya que en esta condición las células, aunque menos individualizadas que en la condición control, sí son más alargadas y tienen más filopodios al ser tratadas con TGFβ1 (Fig. 15A).

En las células H1395 la inhibición de la morfología mesenquimal en las células con *EIF5A1* y *EIF5A2* silenciado también se aprecia pero el cambio es menos visible si lo comparamos con las células A549. Esto podría deberse a que, al ser células con fenotipo epitelial (Fig. 10), necesitarían más tiempo de tratamiento con TGFβ1 para poder desarrollar una EMT completa, y no una EMT parcial como podría ser en este caso (Fig. 15B).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el apartado 2.2 (Fig. 14) donde se aprecia un menor número de células al inhibir genéticamente la expresión de *EIF5A*, especialmente en el caso de *EIF5A2*, lo que sugiere que el silenciamiento también afectaría a la proliferación celular.



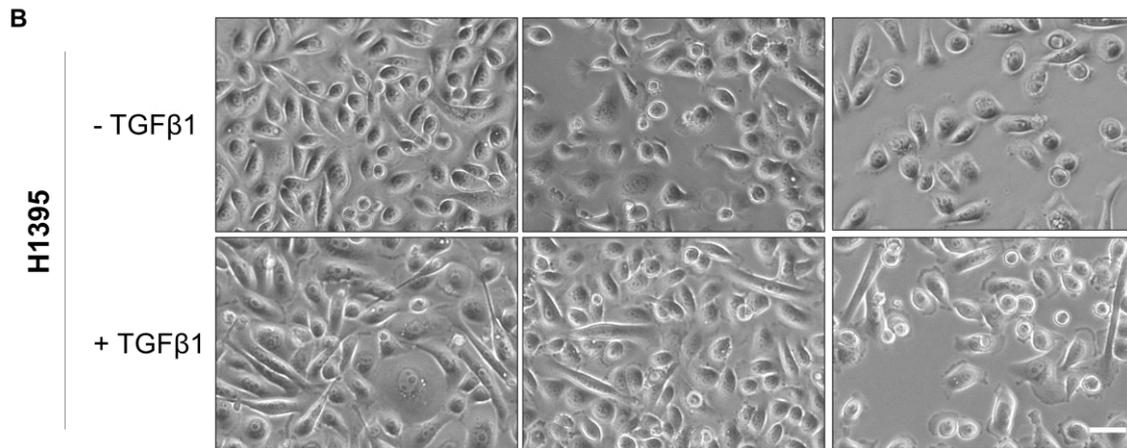
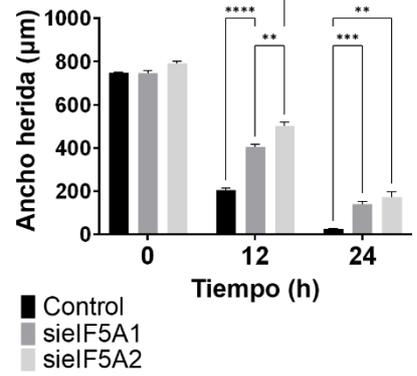
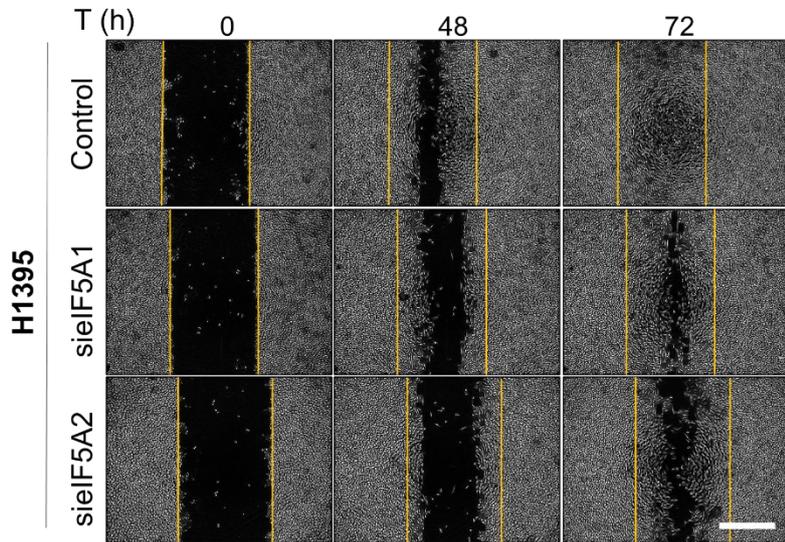
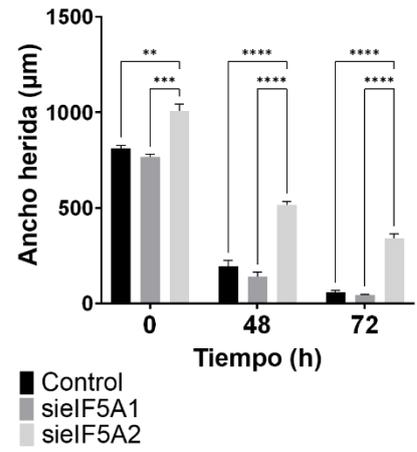
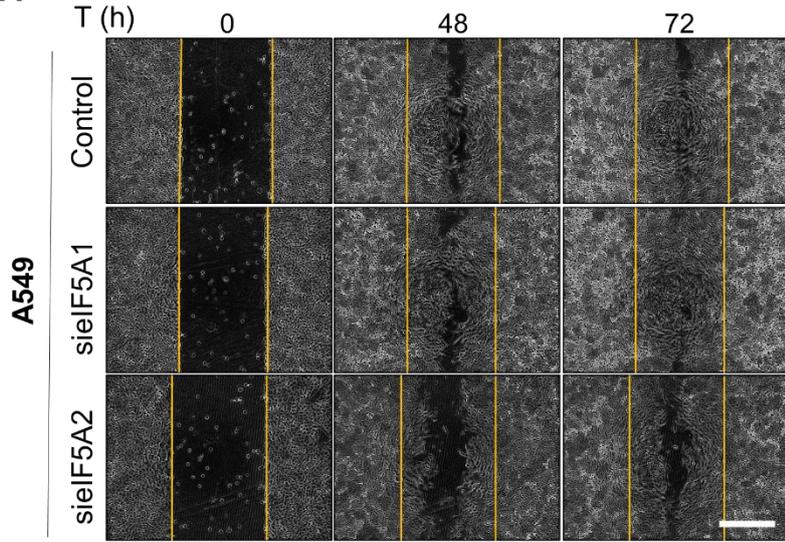


Figura 15. Imágenes de contraste de fases en las líneas de CPNM A549 y H1395. Las células se transfectaron con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y se trataron con TGFβ1 durante 48 h. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados (N=3). **A.** Imágenes de contraste de fases de células A549 (barra de escala 100 μm). **B.** Imágenes de contraste de fases de células H1395 (barra de escala 100 μm).

2.4. El silenciamiento génico de EIF5A2 inhibe la migración celular

También se ha estudiado el efecto sobre la migración celular mediante un ensayo de herida. El cierre de la herida se monitorizó mediante microscopia de contraste de fases a tiempo real (*time lapse*). Los resultados mostraron que el silenciamiento de *EIF5A2* induce una disminución de la migración celular tanto en las células A549 como H1395 (Fig. 16). La inhibición de la migración celular al silenciar *EIF5A2* es mayor en la línea celular A549, cuyas células son incapaces de cerrar la herida tras 72 h en cultivo (Fig. 16A).

Al añadir TGFβ1 en el cultivo, también se observa una disminución de la migración en las células A549 y H1395 (Fig. 16B) transfectadas con *EIF5A2pi* respecto a las células control y las transfectadas con *EIF5A1pi*.

A

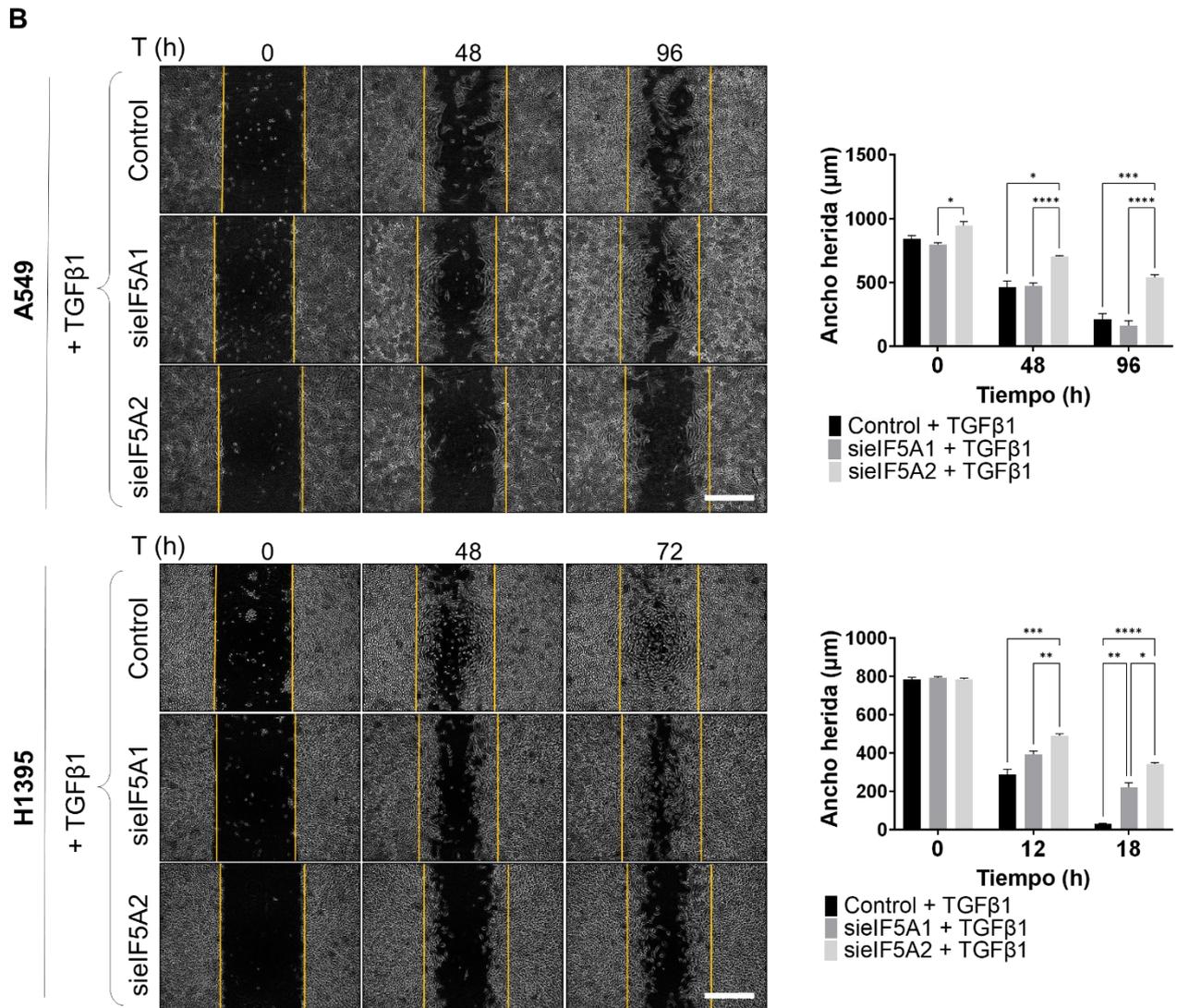


Figura 16. Análisis de la migración celular mediante ensayos de herida en las líneas de CPNM A549 y H1395. La herida se realizó a las 96 h de la siembra sobre el cultivo confluyente en monocapa, y se monitorizó el cierre de la herida mediante microscopía de contraste de fases. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados (N=3) (barra de escala 500 μm) (paneles izquierdos). Se analizó el ancho de la herida calculando las micras que habían recorrido las células en cada foto tomada respecto a la foto tomada en tiempo 0. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001) (paneles derechos) **A.** Análisis de la migración celular en células transfectadas con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h. **B.** Análisis de la migración celular en células se transfectadas con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y tratadas con TGFβ1 durante 48 h.

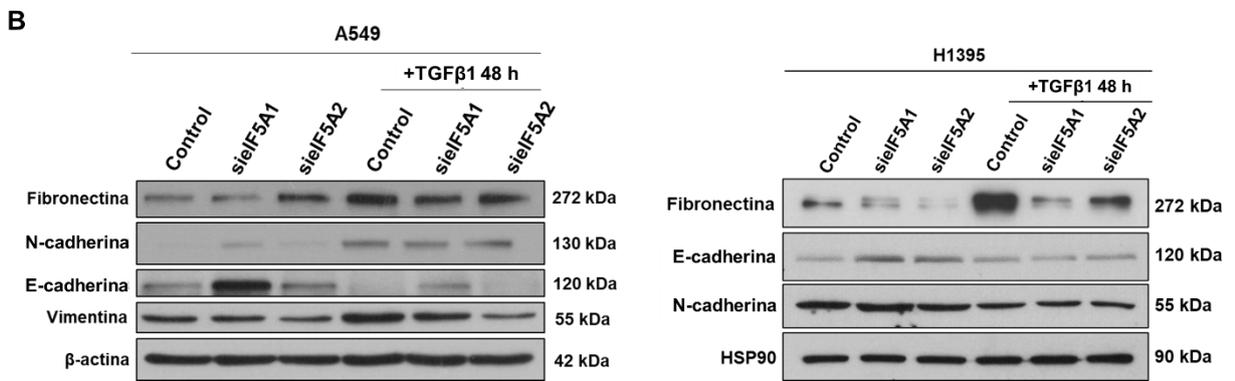
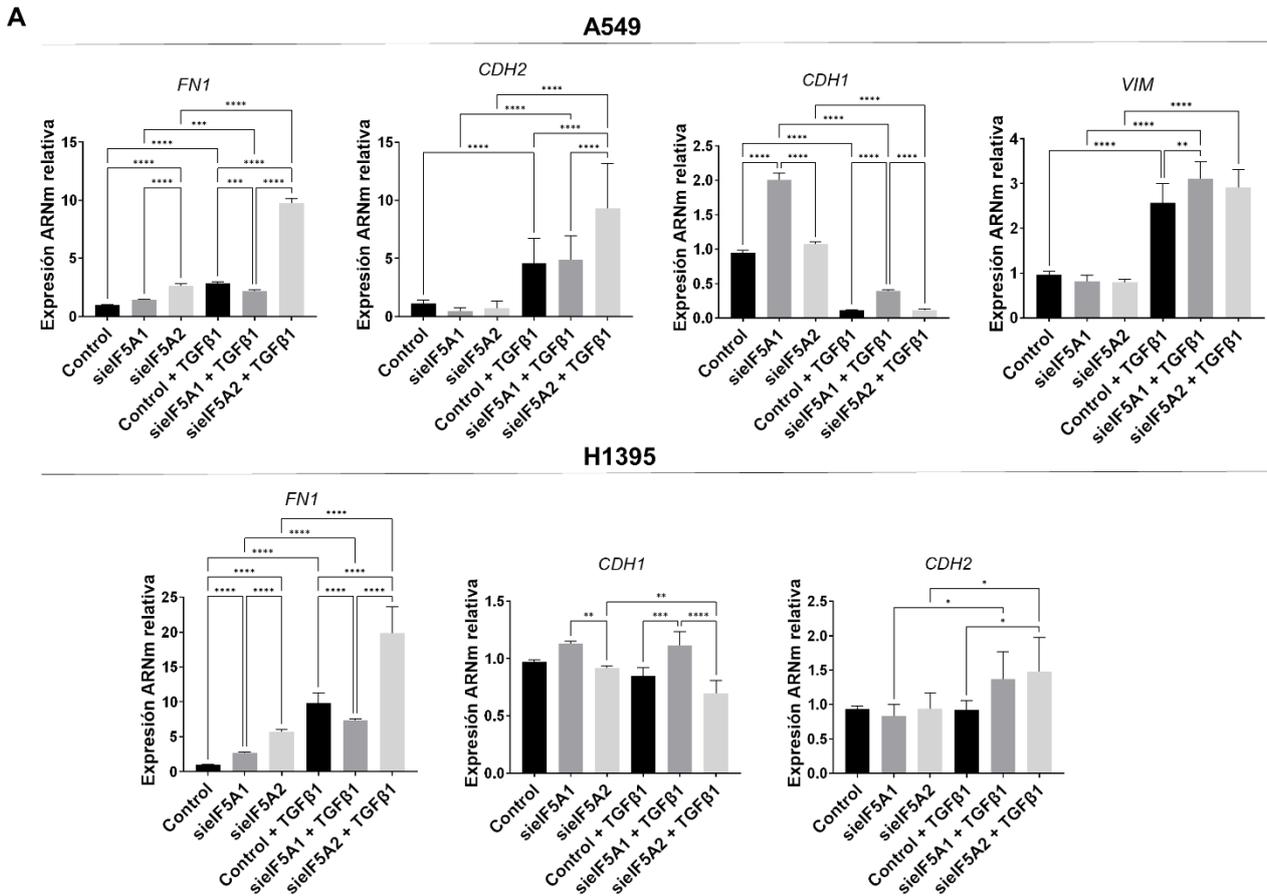
2.5. El silenciamiento génico de *EIF5A2* en presencia de TGFβ1 disminuye la expresión de marcadores de tipo mesenquimal

Se ha analizado la expresión de distintas proteínas implicadas en el proceso de la EMT en células transfectadas con *EIF5A1pi* y *EIF5A2pi* con el fin de elucidar el papel de eIF5A2 en la adquisición del fenotipo mesenquimal característico de una EMT avanzada (Fig. 17). En concreto, se ha analizado la expresión de fibronectina, N-cadherina y vimentina como marcadores de fenotipo mesenquimal y E-cadherina como marcador de fenotipo epitelial. Cabe destacar que todas estas proteínas, con la excepción de vimentina, contienen motivos de prolina consecutivas, como se muestra en sus secuencias proteicas incluidas en el Anexo (Fig. S2).

En las células A549, mientras que los niveles de ARN mensajero de *FN1* y *VIM* aumentan, el nivel de expresión proteica desciende al inhibir eIF5A2 en presencia de TGFβ1. Respecto a la N-cadherina, se observa un aumento de su expresión en presencia de TGFβ1 en comparación con las células control. Aunque no se observa un descenso de la expresión proteica al silenciar *EIF5A2*, sí se observa un aumento en los niveles de ARNm al silenciar *EIF5A2* y en presencia de TGFβ1. Por último, se ha analizado la expresión de E-cadherina. Se observa un aumento de los niveles del ARNm de *CDH1* al inhibir eIF5A1, y también una disminución en todas las condiciones al añadir TGFβ1. El aumento de ARNm no se aprecia al inhibir eIF5A2, ya sea en presencia o ausencia de TGFβ1. Por otro lado, la expresión proteica de E-cadherina aumenta al inhibir tanto eIF5A1 como eIF5A2, lo que estaría indicando un fenotipo más epitelial de estas células.

En la línea H1395 no se ha podido de detectar la vimentina ni a nivel de mensajero ni a nivel proteico, al ser esta una línea celular muy epitelial. También observamos en esta línea un descenso en la expresión proteica de la fibronectina al silenciar *EIF5A1* y *EIF5A2*, coincidiendo también con un aumento de la expresión de ARNm de *FN1* en comparación con las células control, especialmente en las células transfectadas con *EIF5A2pi* y tratadas con TGFβ1. Al inhibir eIF5A1 y eIF5A2, la expresión proteica de E-cadherina aumenta, mientras que a nivel de ARNm, sólo se observa un aumento de *CDH1* al inhibir eIF5A1. Por último, al analizar la expresión proteica de la N-cadherina en la línea H1395 se observa una banda de aproximadamente 55 kDa que no corresponde con el peso molecular de 130 kDa esperado para esta proteína. La banda observada podría corresponder al dominio citoplasmático intracelular de la N-cadherina, tal y como se detectó por Tanaka *et al.* (H. Tanaka *et al.* 2000). Al contrario de lo observado en la línea A549, la N-cadherina no aumenta su expresión proteica al añadir TGFβ1, lo que refuerza nuestra hipótesis de que el tratamiento con TGFβ1 durante los

tiempos indicados en esta línea celular produce una EMT parcial y por ello solo se observa el aumento de expresión de algunos marcadores de EMT. Al silenciar ambas isoformas de eIF5A se observa un descenso leve de los niveles proteicos de N-cadherina, especialmente en las células tratadas con TGFβ1 en contraste con el aumento de ARNm de *CDH2* observado.



C

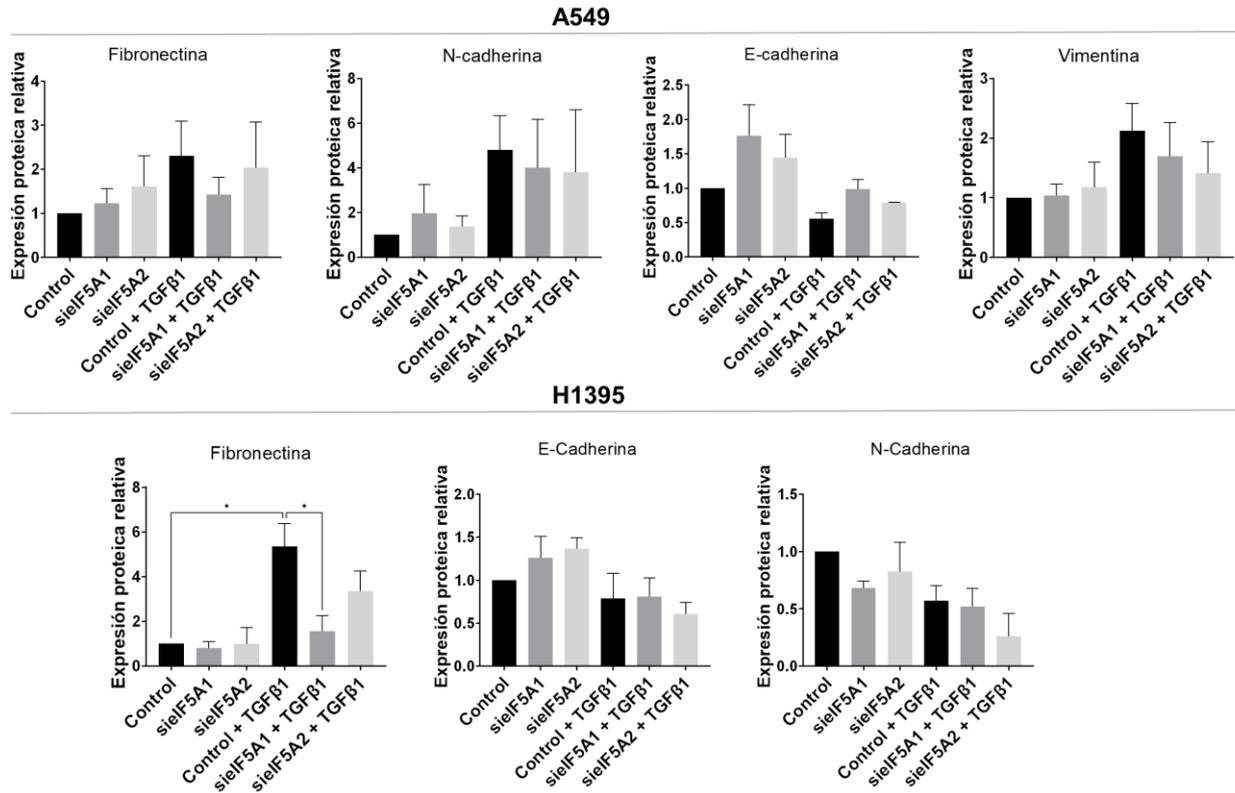


Figura 17. Expresión de fibronectina, E-cadherina, N-cadherina y vimentina en las líneas de CPNM A549 y H1395. Las células se transfectaron con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y se trataron con TGFβ1 durante 48 h. **A.** Expresión de ARNm de FN1, CDH1, CDH2 y VIM. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de fibronectina, E-cadherina, N-cadherina y vimentina. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas fibronectina, E-cadherina, N-cadherina y vimentina. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05).

2.6. El silenciamiento génico de EIF5A2 en presencia de TGFβ1 disminuye la expresión de proteínas implicadas en la EMT

A continuación se analizó la expresión de proteínas que tienen un papel en la organización del citoesqueleto y el desarrollo de la EMT como son FHOD1 y ezrina, la

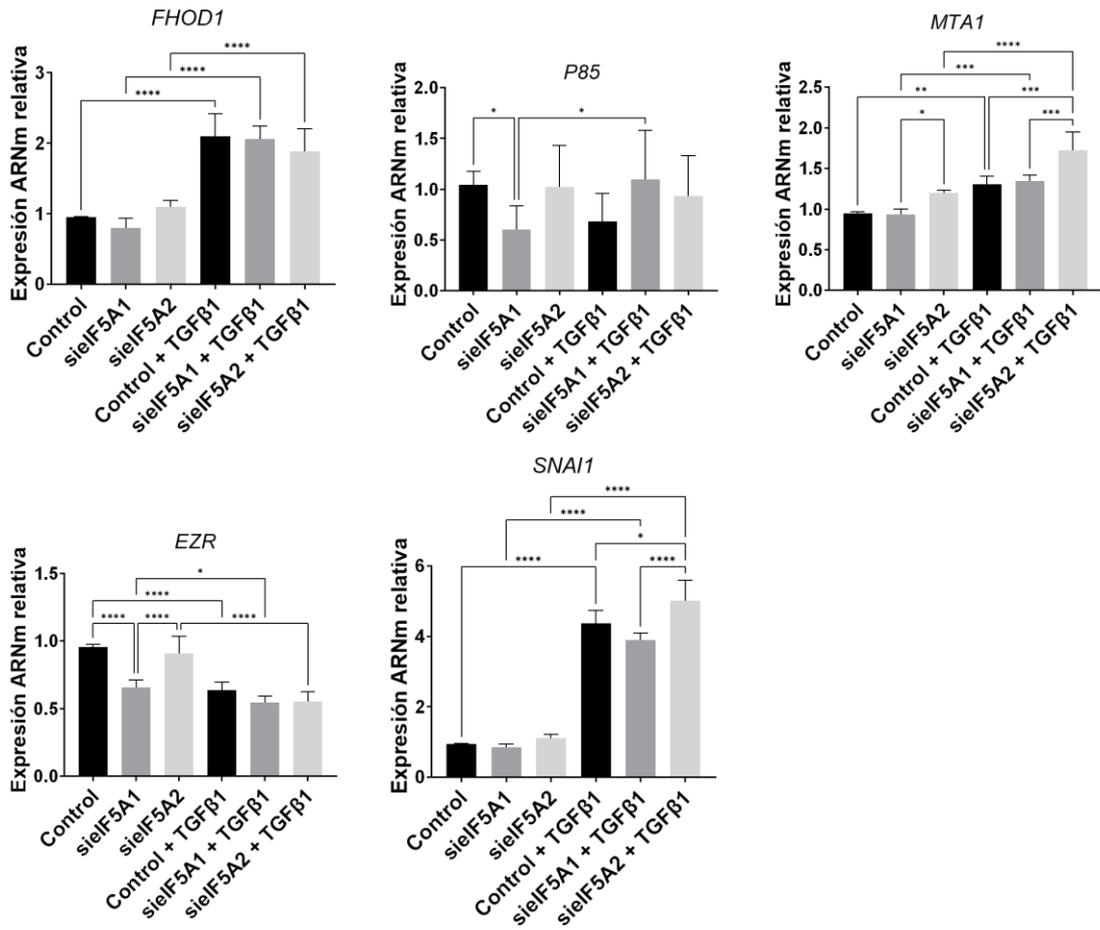
subunidad reguladora p85 de la PI3-quinasa, MTA1 y SNAI1 en células A549 y H1395 transfectadas con *EIF5A1pi* o *EIF5A2pi*, tratadas o no con TGF β 1 (Fig. 18). Estas proteínas también contienen en su secuencia motivos de prolina consecutivas, como se indica en sus secuencias, incluidas en el Anexo (Fig. S1). Por tanto, estas proteínas podrían ser potenciales dianas traduccionales de eIF5A2.

En el caso de las células A549, se observa a nivel de ARNm que los niveles de los genes *FHOD1*, *P85*, *MTA1*, *EZR* y *SNAI1* apenas varían o incluso aumentan al silenciar *EIF5A2*, tanto en las células tratadas como sin tratar con TGF β 1 en comparación con las células control (Fig. 17A). Sin embargo, sí que disminuye su expresión proteica, más notablemente al inhibir eIF5A2 y tratar las células con TGF β 1 (Fig. 17B y C). Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de estas proteínas podría ser dependiente de eIF5A2. Resultados similares se observaron al analizar la expresión de N-cadherina y fibronectina en la Figura 17. Por otro lado, cuando se silencia *EIF5A1*, la expresión de ARNm de *FHOD1*, *p85*, *MTA1*, *EZR* y *SNAI1* desciende ligeramente o no varía. El descenso es más notable en el caso de *P85* y *EZR* en las células sin tratar con TGF β 1. Respecto a la expresión de la proteína MTA1, se observa una mayor inhibición de su expresión al silenciar *EIF5A1* en comparación con las células con *EIF5A2* silenciado, mientras que la expresión de FHOD1 y ezrina aumenta respecto a las células control al tratarlas con TGF β 1. Este efecto podría deberse a que, como se ha mostrado en la figura 13, la expresión de eIF5A2 aumenta al inhibir eIF5A1, y por tanto, podría promover el aumento de la expresión proteica de estas dos proteínas.

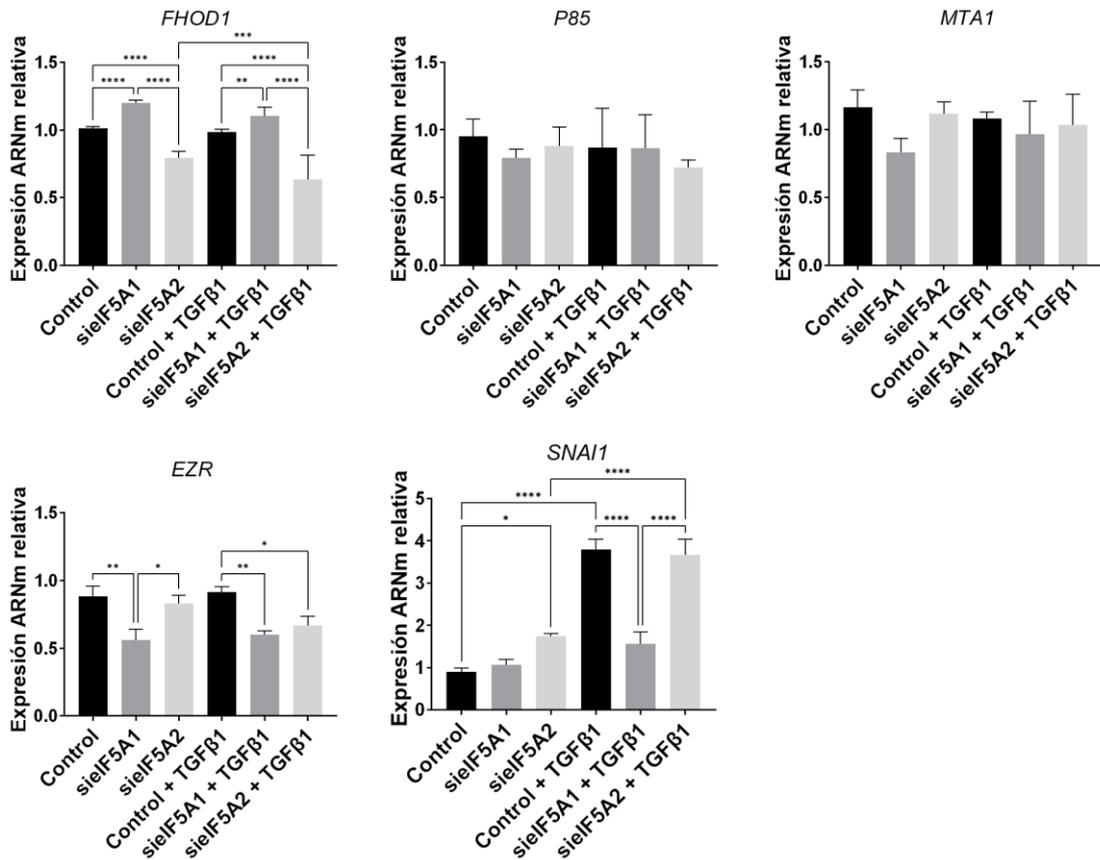
Por otro lado, en la línea H1395 se observa mayor disminución de los niveles de mensajero de *FHOD1* y *EZR* al silenciar *EIF5A2*, solo o en presencia de TGF β 1, mientras que los niveles de *SNAI1* aumentan al silenciar eIF5A2 en ausencia de TGF β 1 y los de *MTA1* y *P85* apenas varían (Fig. 17A). A nivel proteico se observa una disminución de los niveles de las proteínas FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 al silenciar *EIF5A2* en presencia de TGF β 1. Además, como ocurría en las células A549, el descenso de la expresión en MTA1 es mayor al silenciar eIF5A1, por lo que en la regulación de esta proteína estaría implicado eIF5A1, y no eIF5A2. También observamos un aumento de la expresión proteica de FHOD1 y SNAI1 al silenciar eIF5A1 en presencia de TGF β 1.

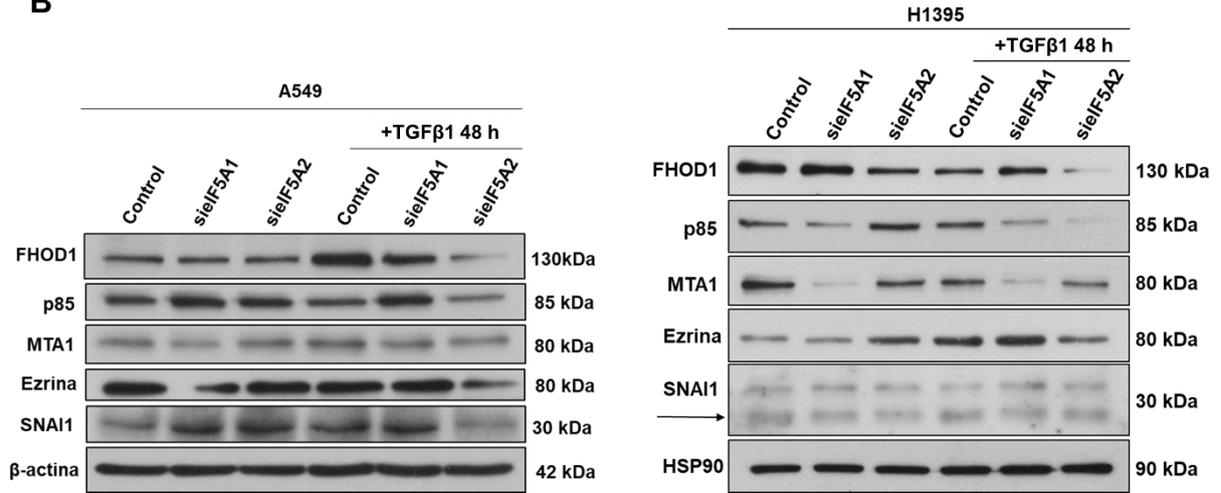
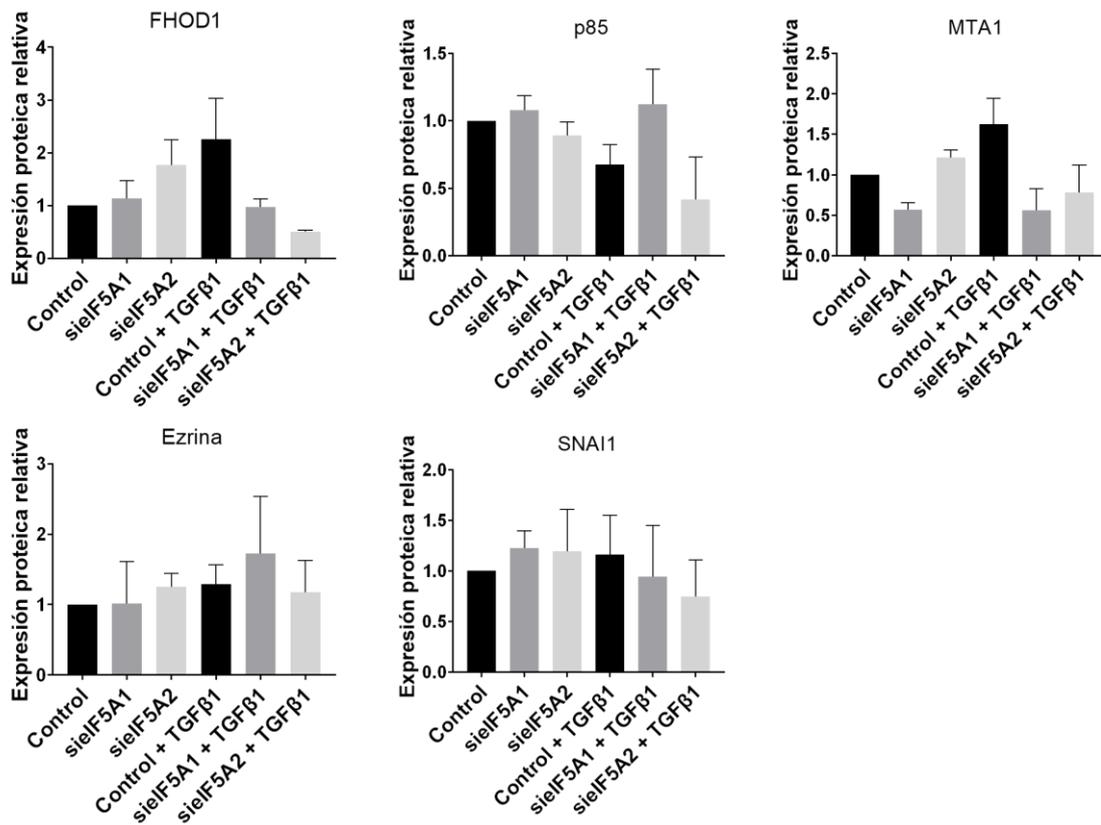
A

A549



H1395



B**C****A549**

H1395

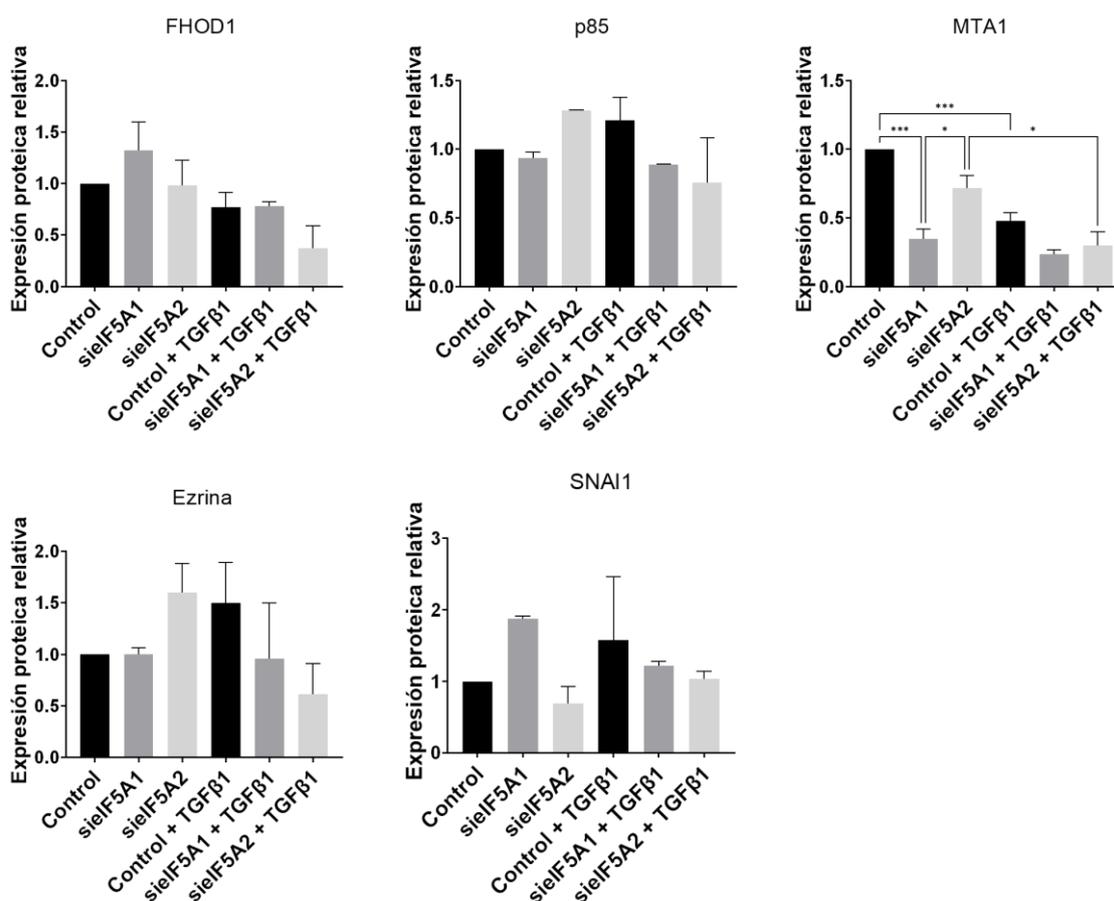


Figura 18. Expresión de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 en las líneas de CPNM A549 y H1395. Las células se transfectaron con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y se trataron con TGFβ1 durante 48 h **A.** Expresión de ARNm de FHOD1, P85, MTA1, EZR y SNAI1. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

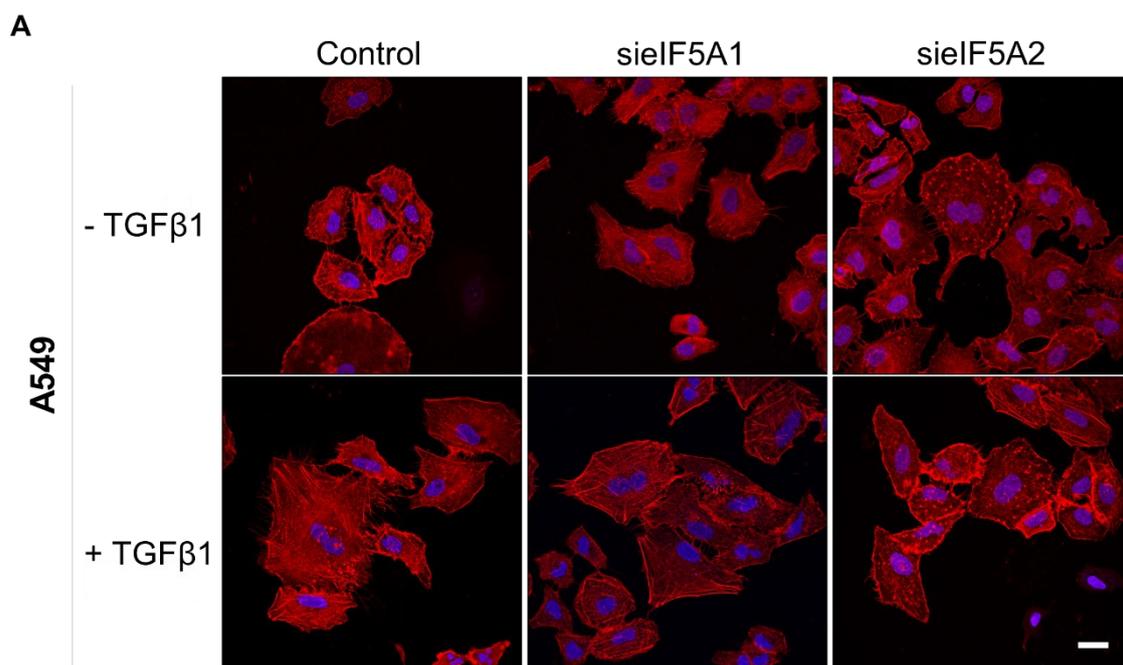
2.7. El silenciamiento génico de eIF5A2 provoca la rotura de los filamentos de actina y su acumulación en nudos

Como se ha indicado en la introducción, estudios de ontología génica han demostrado el enriquecimiento de proteínas con secuencias consecutivas de Pro en proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina como las forminas y ezrina, con funciones directas en morfología celular, migración y adhesión. Por ello, hemos analizado si el silenciamiento de *EIF5A2* en células A549 y H1395 tratadas o no con TGF β 1 produce alteraciones en el citoesqueleto de actina, mediante microscopía de fluorescencia, en células marcadas con Faloidina-Rodamina para visualizar los filamentos de actina.

En la figura 19 se observa en las células control de las líneas A549 y H1395, que las fibras y filamentos de actina del citoesqueleto están ordenadas, mientras que estas fibras aparecen desorganizadas y rotas, y la actina se acumula en nudos al inhibir eIF5A2.

Además, al añadir TGF β 1 en las células control, se observa un aumento de las fibras de actina y un mayor número de filopodios, mientras que en las células silenciadas con *EIF5A2*pi esto no ocurre y se sigue observando la desaparición de las fibras de estrés y la acumulación en nudos de los filamentos de actina.

En el caso de las células con *EIF5A1* silenciado, el citoesqueleto es similar al observado en las células control, con fibras ordenadas a lo largo de todo el citoesqueleto y un gran número de filopodios, que además, aumentan su cantidad al tratar las células con TGF β 1.



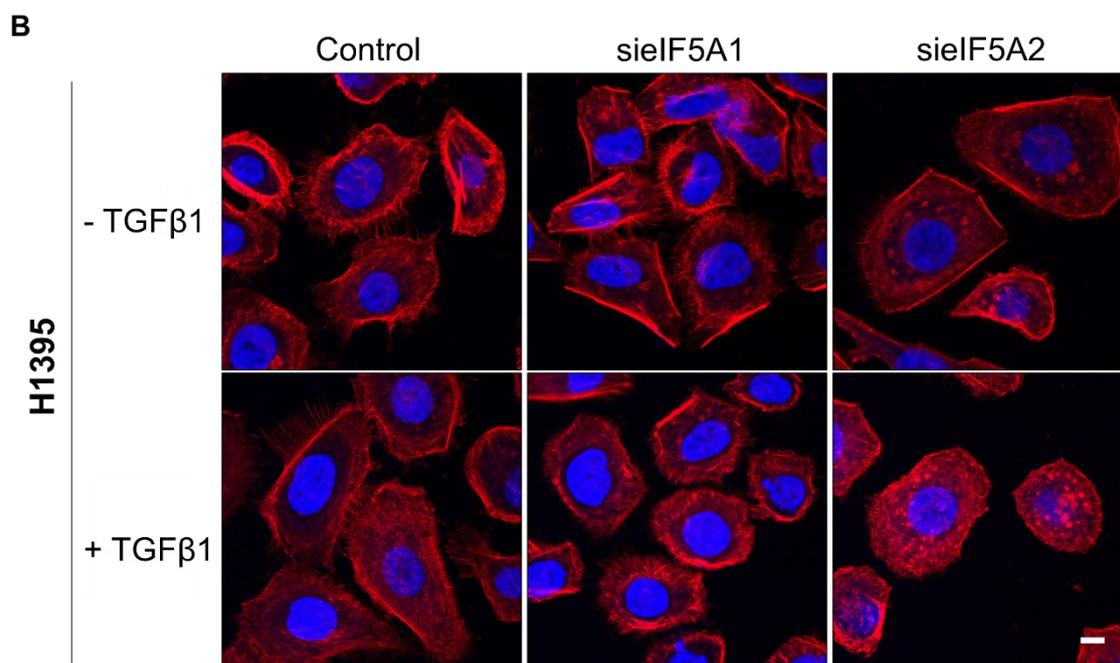


Figura 19. Imágenes de microscopía de fluorescencia en las líneas de CPNM A549 y H1395. Las células se transfectaron con ARNpi EIF5A1 o ARNpi EIF5A2 durante 72 h y se trataron con TGFβ1 durante 48 h. Las células se tiñeron con faloidina rodamina (rojo) para observar la conformación del citoesqueleto de actina y con DAPI (azul) para observar los núcleos. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados (N=3). **A.** Microscopía confocal de fluorescencia en células A549 (barra de escala 25 μm). **B.** Microscopía confocal de fluorescencia en células H1395 (barra de escala 10 μm).

En conjunto, todos los resultados presentados a lo largo del apartado 2, sugieren que eIF5A2 podría estar regulando la organización del citoesqueleto de actina mediante la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la organización de citoesqueleto y la EMT, como fibronectina, ezrina y FHOD1 y esto podría explicar el efecto que observamos sobre la alteración en la migración y la viabilidad celular o al silenciar eIF5A2.

3. Estudio de la sobreexpresión constitutiva de eIF5A

Con el fin de mimetizar lo que ocurre en los tumores de CPNM en los que eIF5A2 está sobreexpresado, hemos analizado los efectos a nivel fenotípico y molecular de la ganancia de función de eIF5A2. Para ello, hemos generado poblaciones celulares que

sobreexpresan de manera estable un plásmido que codifica eIF5A2 y su correspondiente población control que expresa el plásmido vacío.

3.1. Generación de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2

Las líneas estables se han generado tal y como se ha descrito en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos transfectando la línea H1395, por un lado, con un plásmido que codifica Flag-eIF5A2 junto a GFP (pCIG-Flag-eIF5A2-IRES-GFP) y por otro, con el plásmido control vacío (pCIG-IRES-GFP, llamado EV por *Empty Vector*) que sólo expresa GFP. Las células transfectadas se seleccionaron con el antibiótico G418.

Tras una primera selección de las células que habían incorporado el plásmido mediante resistencia al antibiótico G418, las células GFP positivas (GFP+) se separaron mediante *Cell Sorting*. Como se puede observar en la Figura 20A, mientras que las células H1395 parentales no expresan GFP, se seleccionaron un 95.34% de células GFP positivas en la línea H1395-EV y un 88.26% de células GFP positivas en la línea H1395-eIF5A2. A partir de este punto, se trabajó con las células H1395-eIF5A2 y su control H1395-EV.

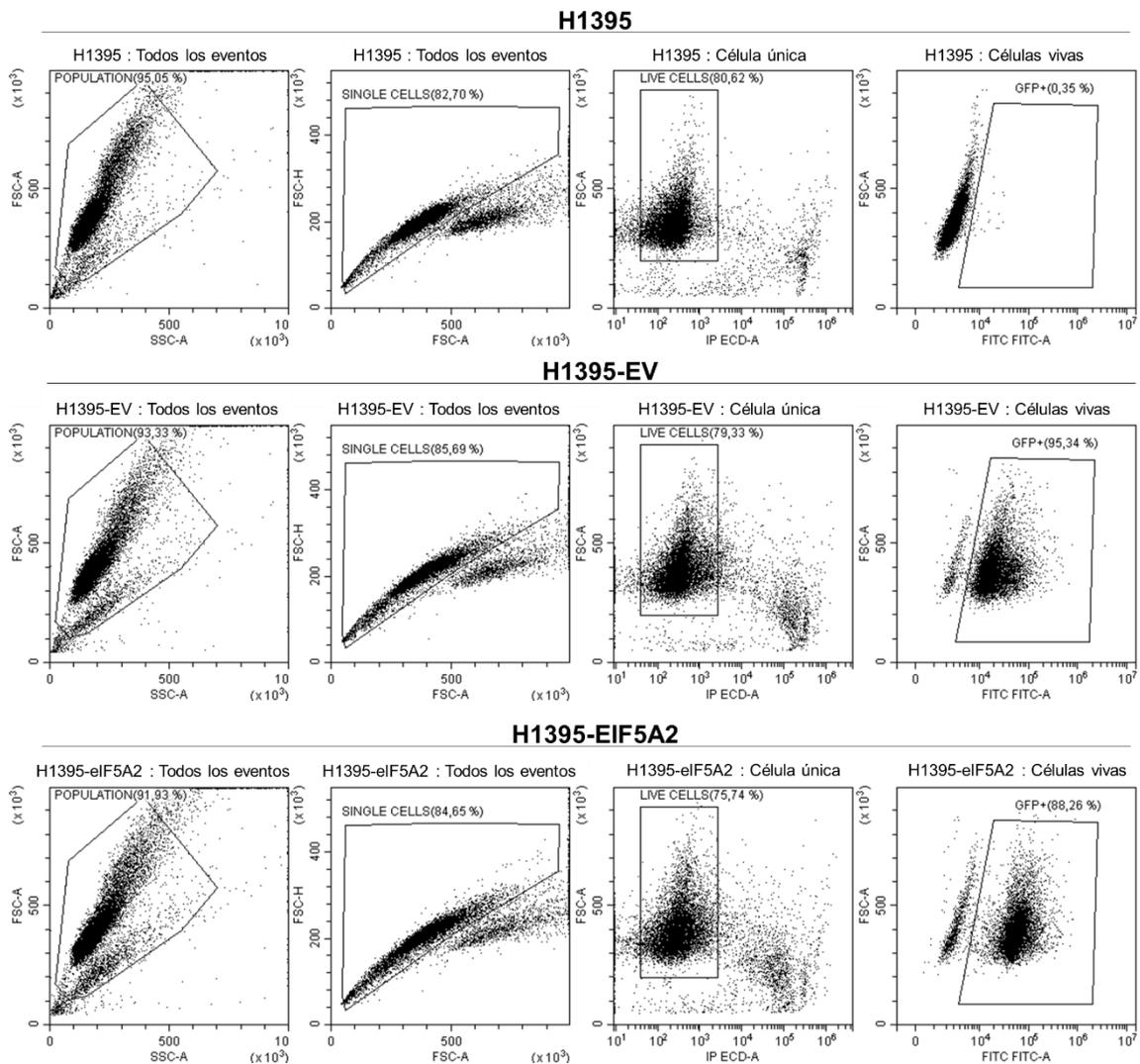
Se analizó el tiempo de duplicación de las líneas establecidas para comprobar que la capacidad proliferativa no se veía afectada al introducir de manera estable los plásmidos en las células. Para ello, se mantuvieron las células H1395-eIF5A2 y H1395-EV en cultivo durante 21 pases seriados (5 meses y una semana), y en cada pase, se contaron las células en cultivo. Como muestra la Figura 20B, se comprobó que el tiempo de duplicación de las H1395-eIF5A2 es ligeramente menor que el de las H1395-EV, pero no existen diferencias significativas entre ambas líneas celulares. Además, el aumento progresivo de los doblajes acumulativos a lo largo de los pases seriados, indica que el crecimiento de estas líneas se mantiene a lo largo de todos estos pases, sin estancarse el crecimiento a causa de llevar demasiado tiempo en cultivo.

La expresión ectópica de eIF5A2 se confirmó mediante *Western Blot* con anticuerpos contra eIF5A2 y contra el epítipo Flag (Fig. 20C). Este epítipo coincide en tamaño con la banda superior de las dos observadas para eIF5A2 en las células H1395-eIF5A2. La banda inferior corresponde a la proteína eIF5A2 que ha sufrido una escisión en N-terminal perdiéndose el epítipo Flag. Los niveles proteicos de eIF5A1 y GFP expresados por esta línea celular también son similares a los expresados por la línea H1395-EV.

Además, se analizó la morfología celular de las células H1395-eIF5A2 y H1395-EV mediante microscopía de contraste de fases en el equipo *InCell Analyzer 2200* que

permite el análisis de células en cultivo *in vivo*. Se realizaron fotografías en contraste de fase de 5 campos distintos en cuatro pocillos de la placa de cultivo, y mediante el software del equipo se midió la longitud del eje más corto que cruza el núcleo de la célula (MI de *Minor axis length*) y la longitud del eje más largo que cruza el núcleo de la célula (MA de *Major axis length*). La división de ambos da un ratio, que indica la esfericidad de las células, ya que si el ratio es 1 las células son redondas y cuanto mayor de 1 sea el valor de este ratio, más alargadas son las células. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20D y muestran que las células H1395-eIF5A2 son ligeramente más alargadas que las células H1395-EV, aunque la diferencia no es significativa.

A



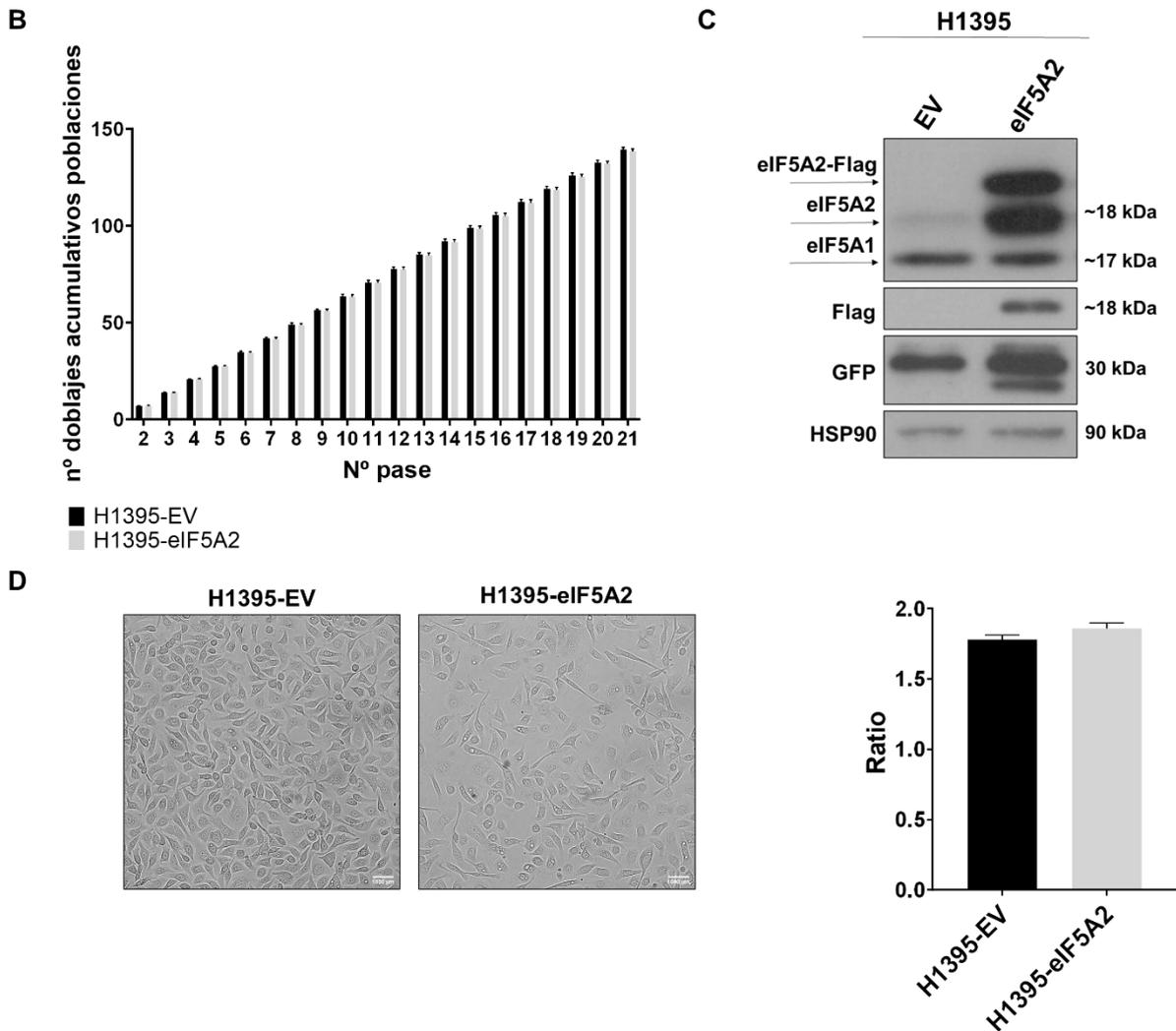
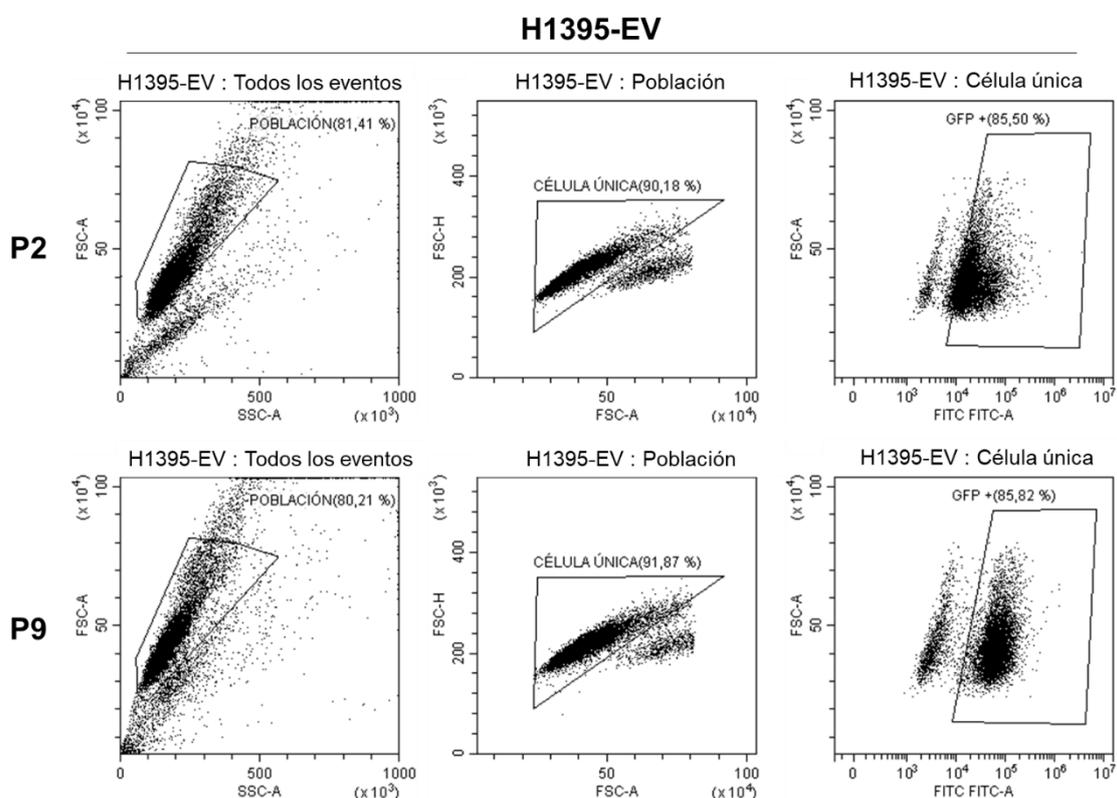


Figura 20. Generación de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. **A.** Análisis de las poblaciones celulares GFP positivas separadas mediante Cell Sorting. De izquierda a derecha, en el primer histograma, sobre todos los eventos detectados por el Cell Sorter, se selecciona la población celular (population). En el segundo histograma, sobre todos los eventos detectados por el Cell Sorter, se seleccionan los eventos únicos (single cell, célula única) para eliminar agregados. En el tercer histograma, sobre la población de células únicas se seleccionan las células vivas (live cells) gracias al marcaje con yoduro de propidio. En el cuarto histograma, sobre la población de células vivas se seleccionan las células GFP+, que son las que se recogen y resiembran. **B.** Comparación de la capacidad proliferativa entre las células H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se sembraron a 1.500 células/cm² y se les renovó el medio cada 3-4 días. Siete días después de la siembra, se levantaron y se procedió al conteo celular. Los doblajes poblacionales (DP) se calcularon mediante la fórmula $DP = [(\log_{10} (NH) - \log_{10} (NI)) / \log_{10} (2)]$, donde NH el número de células recogidas y NI es el número de células sembradas inicialmente.

(Continuación Fig. 20) Las medias de los experimentos (N=6) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (ns). **C.** Análisis de la expresión proteica de eIF5A1, eIF5A2, Flag y GFP en células H1395-EV y H1395-eIF5A2 mediante Western Blot. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **D.** Análisis de la morfología celular mediante microscopia de contraste de fases. En el panel de la izquierda se muestran imágenes representativas del cultivo de las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 tomadas 7 días después de la siembra. El panel de la derecha muestra el ratio de esfericidad de las células. La media de los experimentos (N=4 con cinco campos fotografiados por experimento) se compararon mediante análisis T de Student no pareado (ns).

Por último, para verificar que el plásmido de expresión se había insertado y no se perdía con los pases sucesivos, se analizó la expresión de GFP en el pase 2 (P2), después de haber separado las células GFP positivas mediante *Cell Sorting* y en el pase 9 (P9), con 7 semanas de diferencia entre ellos (Fig. 21). Se confirmó que los niveles de expresión de GFP no solo permanecían estables, si no que se el porcentaje de células GFP positivas en el cultivo era mayor, y que por tanto, no se pierde la expresión del plásmido al mantener las células en cultivo durante varias semanas consecutivas.



H1395-eIF5A2

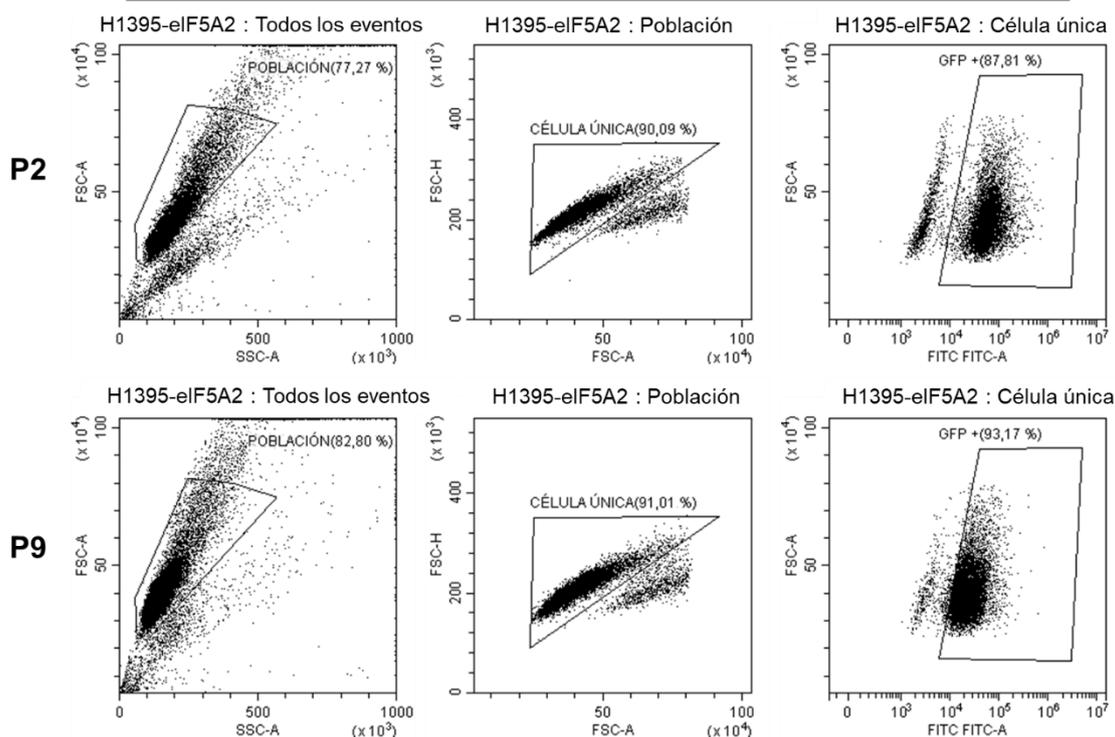


Figura 21. Citometría de flujo en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2 para analizar las poblaciones de células GFP positivas en distintos pases del cultivo celular. De izquierda a derecha, en el primer histograma, sobre todos los eventos detectados por el citómetro, se selecciona la población celular. En el segundo histograma, sobre la población celular se seleccionan los eventos únicos (célula única) para eliminar agregados. En el tercer histograma, sobre la población de células únicas se seleccionan las células GFP+.

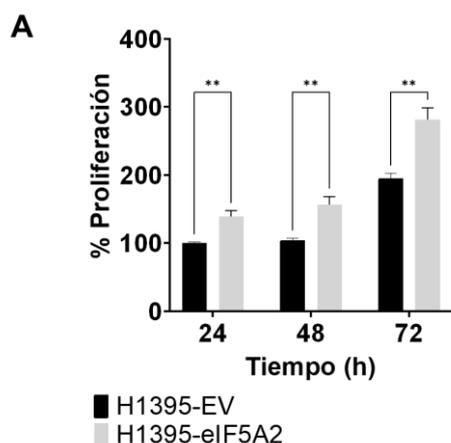
3.2. La sobreexpresión de eIF5A2 aumenta la proliferación celular

Mediante ensayo de MTS se comprobó que la sobreexpresión de eIF5A2 aumenta la proliferación de las células H1395-eIF5A2 más de un 38% respecto a las células H1395-EV tras 24 h en cultivo, llegando a incrementarse en más de un 85% tras 72 h en cultivo (Fig. 22A).

En la figura 22B se analiza el efecto que tiene distintos tiempos de tratamiento con TGF β 1 y GC7 sobre cada una de las líneas celulares, individualmente. Para ello, se compara el efecto de cada tratamiento respecto a las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 sin tratar. Al añadir TGF β 1, a las 24 h de cultivo no se aprecian cambios en la proliferación celular, mientras que a las 48 h y 72 h de cultivo la proliferación disminuye ligeramente en ambas líneas celulares respecto a sus controles (Fig. 22B).

Para analizar el efecto del inhibidor de la hipusinación GC7 en la proliferación celular de las líneas establecidas, en primer lugar se determinó la dosis letal media (DL50) en las líneas H1395-EV y H1395-eIF5A2, con el fin de establecer la concentración adecuada para tratar a estas células. Para ello, se trataron las células con distintas concentraciones de GC7, comprendidas entre 0 μ M y 68,12 μ M. Los resultados indicaron que la DL50 en el caso de la línea H1395-EV era de 16,53 μ M y en el caso de las células H1395-eIF5A2, era de 17,04 μ M (Fig. 23). Se utilizó esta última concentración del fármaco para todos los experimentos en los que se utiliza el inhibidor GC7.

Al tratar las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 con 17.04 μ M de GC7, la proliferación celular es similar tras 24 h y 72 h de tratamiento en ambas líneas, ya que la proliferación celular disminuye alrededor de un 40% a las 24 h de tratamiento y un 80% a las 72 h de tratamiento. Sin embargo, a las 48 h de tratamiento con GC7 se inhibe la proliferación celular cerca de un 70% en la línea H1395-eIF5A2 mientras que en la línea H1395-EV solo un 50% (Fig. 22B). En base a estos resultados, en experimentos posteriores se trataron las células con GC7 durante 24 h, ya que en este tiempo el efecto de la inhibición observado era suficiente y se evitaba comprometer el cultivo celular con un tratamiento más largo.



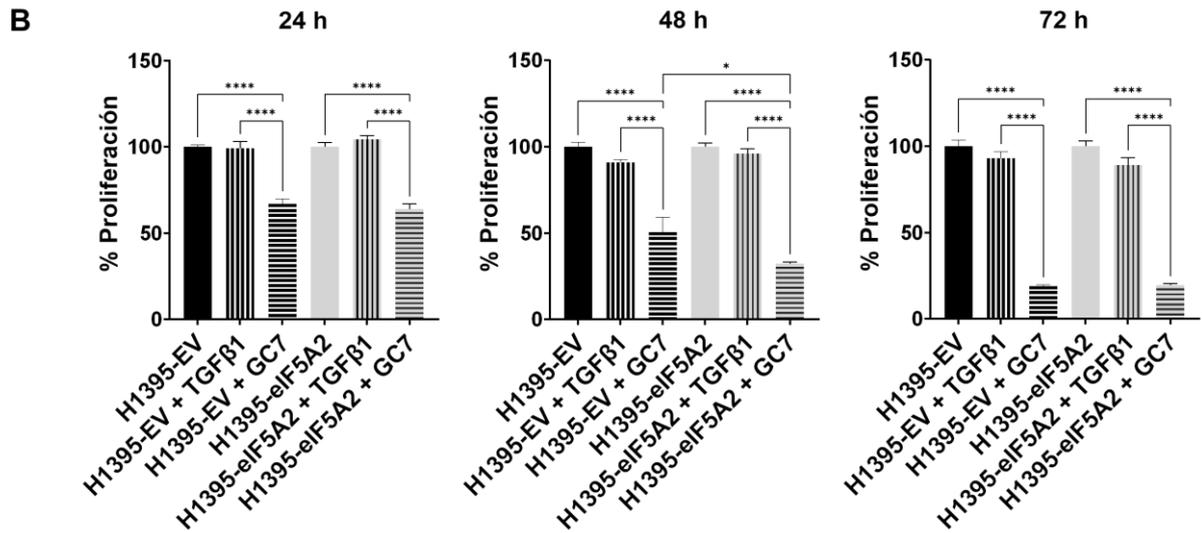


Figura 22. Ensayos de viabilidad por MTS en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. **A.** Viabilidad en las células H1395-EV y H1395-eIF5A2. El MTS se realizó a las 24 h, 48 h y 72 h de la siembra. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad de las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) que se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (** $p < 0,01$). **B.** Viabilidad en las células H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 24 h, 48 h y 72 h con TGF β 1 o GC7. El MTS se realizó a las 24 h, 48 h y 72 h de la siembra. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad de las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) que se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

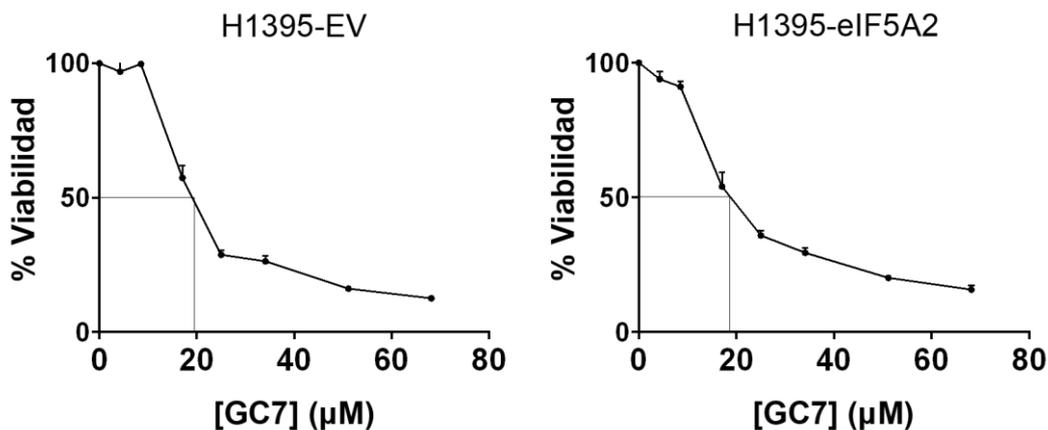


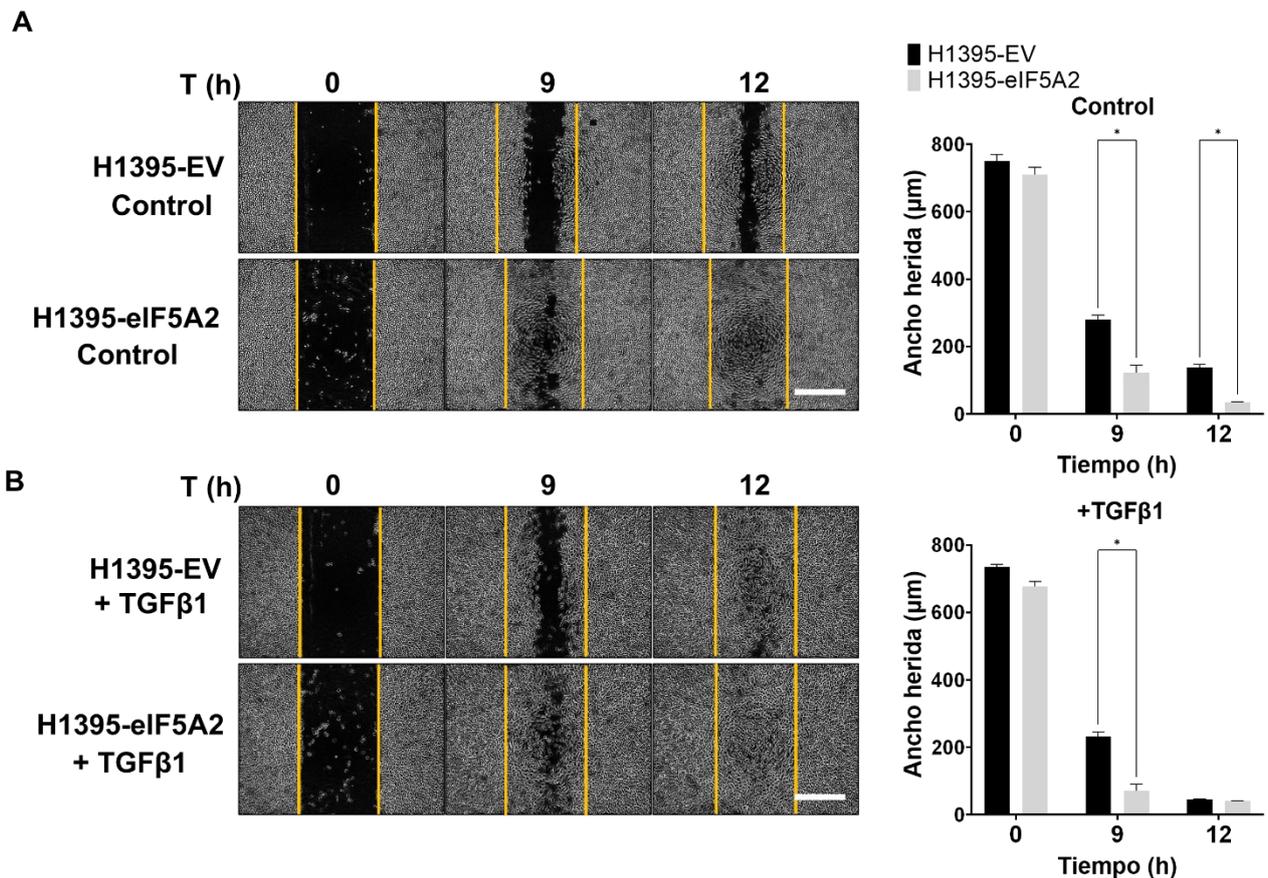
Figura 23. Curvas de dosis letal media en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se trataron con distintas concentraciones de GC7 comprendidas entre 0 μ M y 68,12 μ M.

3.3. La sobreexpresión de eIF5A2 induce la migración celular

Para comprobar si la sobreexpresión de eIF5A2 promueve la migración celular se realizaron ensayos de cierre de herida en las células H1395-eIF5A2 y H1395-EV. Los resultados mostraron un aumento de la migración celular en las células H1395-eIF5A2, que son capaces de cerrar la herida a las 12 h, mientras que en las células H1395-EV la herida permanece abierta (Fig. 24).

En las células tratadas con TGF β 1 durante 72 h, la migración celular aumenta en ambas líneas celulares. A las 9 h tras realizar la herida, la herida está casi cerrada en las células H1395-EV y en las H1395-eIF5A2 está completamente cerrada.

Por último, tras tratar las células con el inhibidor GC7 durante 24 h, se inhibe la migración en ambas líneas celulares, siendo mayor el efecto sobre las H1395-EV.



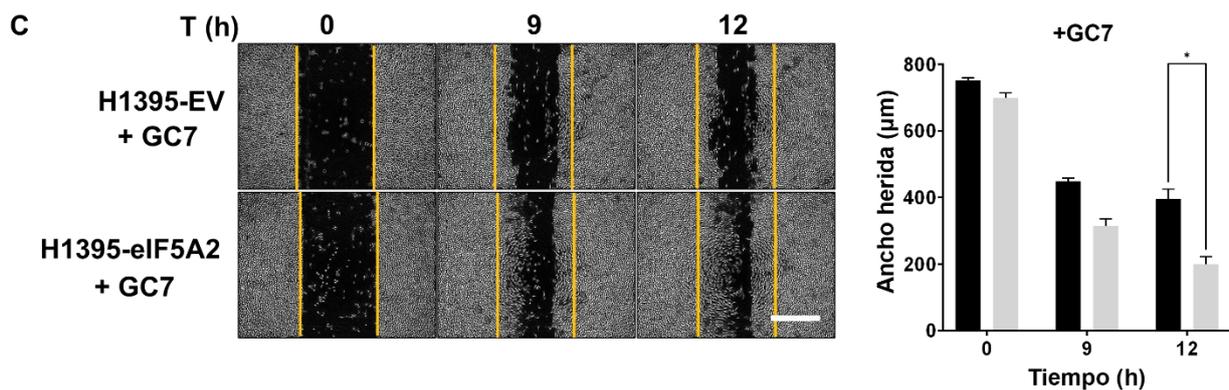


Figura 24. Análisis de la migración celular mediante ensayos de herida en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. La herida se realizó a las 96 h de la siembra sobre el cultivo confluyente en monocapa, y se monitorizó el cierre de la herida mediante microscopía de contraste de fases. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados (N=3) (barra de escala 500 µm) (panel izquierdo). Se analizó el ancho de la herida calculando las micras que habían recorrido las células en cada foto tomada respecto a la foto tomada en tiempo 0. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (* $p < 0,05$) (paneles derechos). **A.** Ensayo de herida en células H1395-EV y H1395-eIF5A2 control. **B.** Ensayo de herida en células H1395-EV y H1395-eIF5A2 tratadas durante 72 h con TGFβ1. **C.** Ensayo de herida en células H1395-EV y H1395-eIF5A2 tratadas durante 24 h con GC7.

3.4. Efecto del tratamiento con TGFβ1

Además de observar el efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre la migración y la proliferación celular, se estudió la implicación que la señalización por TGFβ1 podría tener sobre la expresión de eIF5A2 y el resto de las proteínas relacionadas con la EMT y la organización del citoesqueleto estudiadas. Para ello, se trataron las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 con TGFβ1 a distintos tiempos.

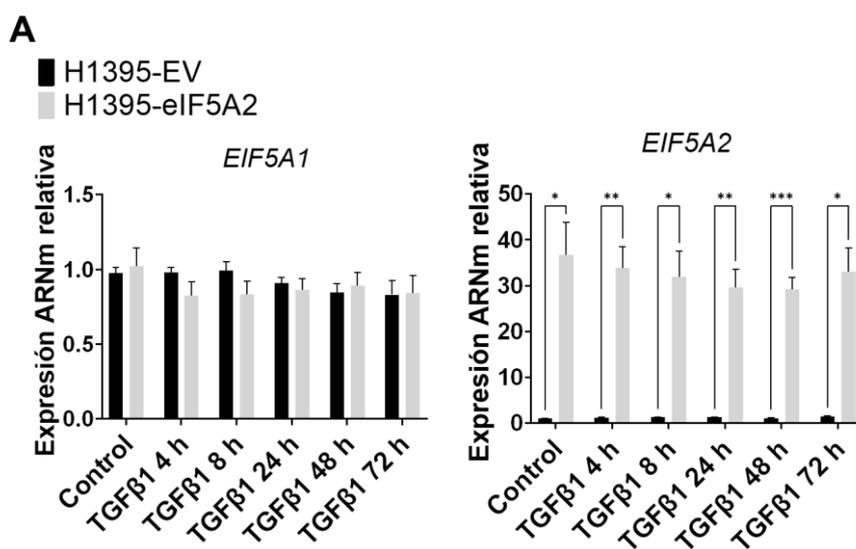
3.4.1. El tratamiento con TGFβ1 induce la expresión de eIF5A2 y eIF5A2 hipusinado

Se analizó el ARNm de las células tratadas con TGFβ1 y se observó, como era de esperar, que las células H1395-eIF5A2 expresan niveles más elevados de *EIF5A2* que

las células H1395-EV, y que no hay cambios en la expresión al tratar las células con TGFβ1 a diferentes tiempos, al igual que tampoco se observan diferencias en la expresión de *EIF5A1* entre ambas líneas celulares (Fig. 25A).

Al tratar las líneas con TGFβ1 se observa un aumento progresivo de la expresión proteica de eIF5A2 en las células H1395-eIF5A2, con un pico de expresión a las 72 h de tratamiento. En las células H1395-EV no se observa la expresión de eIF5A2, aunque esta línea también lo expresa ligeramente, como se puede observar en la en la Figura 20C. Tampoco se aprecian cambios significativos en la expresión de eIF5A1 en ninguna de las líneas. Sin embargo, sí se han detectado diferencias entre los patrones de hipusinación de eIF5A1 y eIF5A2 después del tratamiento con TGFβ1. Aunque en el perfil de hipusinación de eIF5A1 no se aprecia ninguna variación, el patrón de hipusinación de eIF5A2 aumenta con el tratamiento con TGFβ1 y se observa un pico de expresión alrededor de las 24-48 h (Fig. 25B y C).

Estos resultados sugieren que TGFβ1 induce la expresión y actividad de eIF5A2 y que eIF5A2 podría promover la señalización por TGFβ1 en el desarrollo de la EMT, lo que se estudiará en los siguientes apartados.



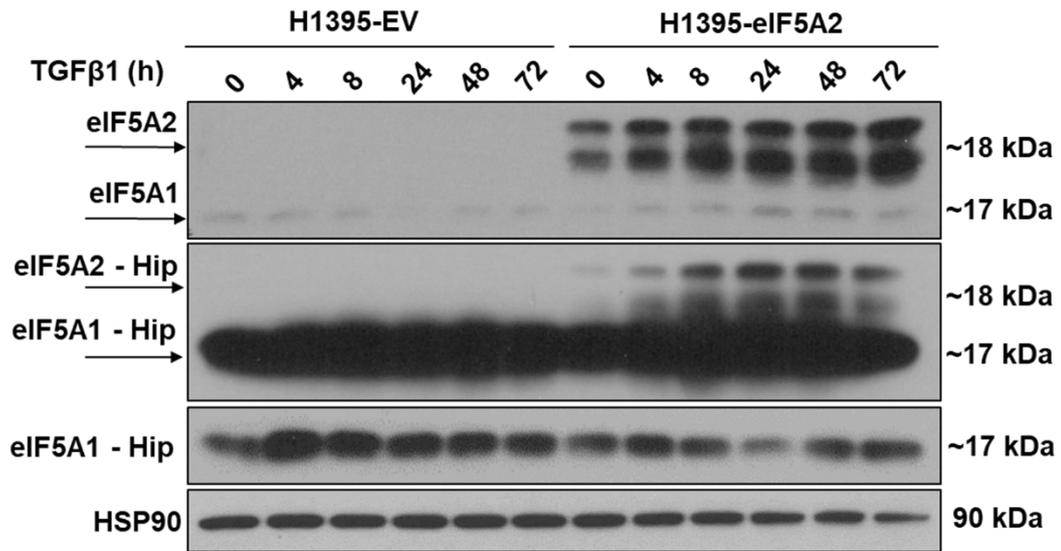
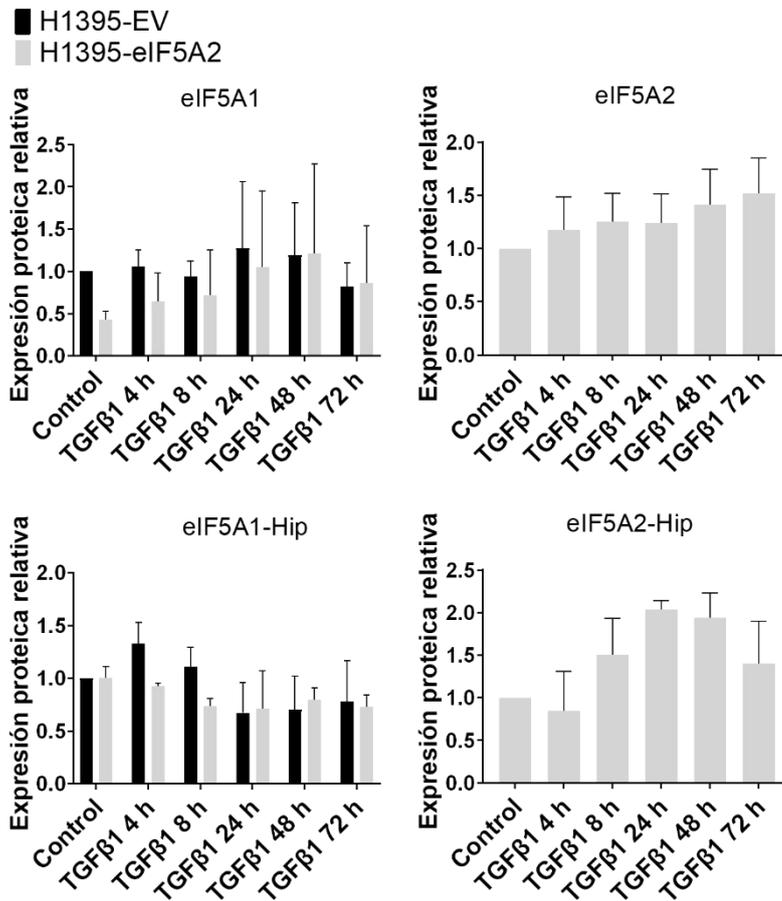
B**C**

Figura 25. Expresión de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 4 h, 8 h, 24 h, 48 h o 72 h con TGFβ1.

(Continuación Fig. 25) **A.** Expresión de ARNm de EIF5A1 y EIF5A2. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. Las medias de los experimentos (N=3) de eIF5A1 y eIF5A1 hipusinado se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (ns). Las medias de los experimentos (N=3) de eIF5A2 y eIF5A2 hipusinado se compararon mediante análisis ANOVA de una vía con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (ns).

3.4.2. El tratamiento con TGF β 1 aumenta la expresión de algunos marcadores de fenotipo mesenquimal en las células H1395-eIF5A2

Se analizó la expresión de fibronectina, E-cadherina y N-cadherina, tanto a nivel de ARNm como proteico, en las líneas celulares H1395-EV y H1395-eIF5A2 (Fig. 26).

Respecto a los niveles de expresión de fibronectina, mediante qPCR observamos un aumento de sus niveles, coincidiendo con el aumento de su expresión proteica a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con TGF β 1, siendo este efecto más notable en las células que sobreexpresan eIF5A2.

Los niveles de *CDH1* prácticamente no varían y tienen una tendencia a la baja a las 48 h y 72 h de tratamiento con TGF β 1, especialmente en las células H1395-eIF5A2. A nivel proteico, excepto en las células control, la expresión de E-cadherina es menor en las células H1395-eIF5A2 respecto a las H1395-EV, y su expresión apenas varía con el tratamiento con TGF β 1.

Por último, mientras que no se observa un aumento del mensajero de *CDH2* en las células H1395-eIF5A2 hasta las 72 h de tratamiento con TGF β 1, a nivel proteico las células H1395-eIF5A2 expresan más la proteína detectada de 55 kDa con el anticuerpo contra N-cadherina desde tiempos cortos de tratamiento con TGF β 1 (4 h y 8 h), respecto a las células H1395-EV.

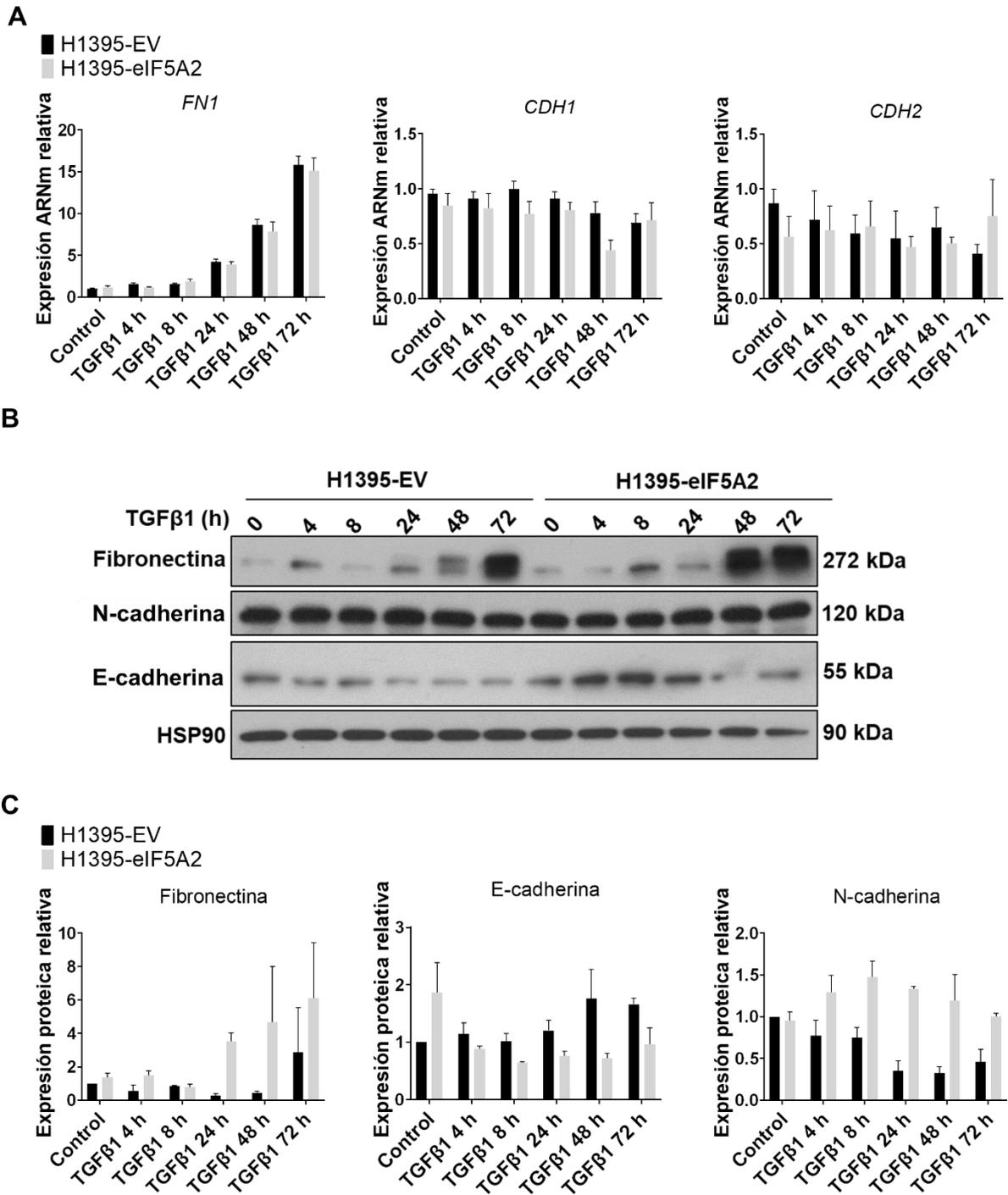


Figura 26. Expresión de fibronectina, E-cadherina y N-cadherina en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 4 h, 8 h, 24 h, 48 h o 72 h con TGF β 1. **A.** Expresión de ARNm de FN1, CDH1, CDH2 y VIM. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (ns).

(Continuación Fig. 26) **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos fibronectina, E-cadherina y N-cadherina. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas fibronectina, E-cadherina y N-cadherina. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (ns).

3.4.3. El tratamiento con TGF β 1 aumenta la expresión de proteínas involucradas en la EMT en las células H1395-eIF5A2

Por último, hemos analizado la expresión de proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina y la EMT en las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 tratadas con TGF β 1 (Fig. 27).

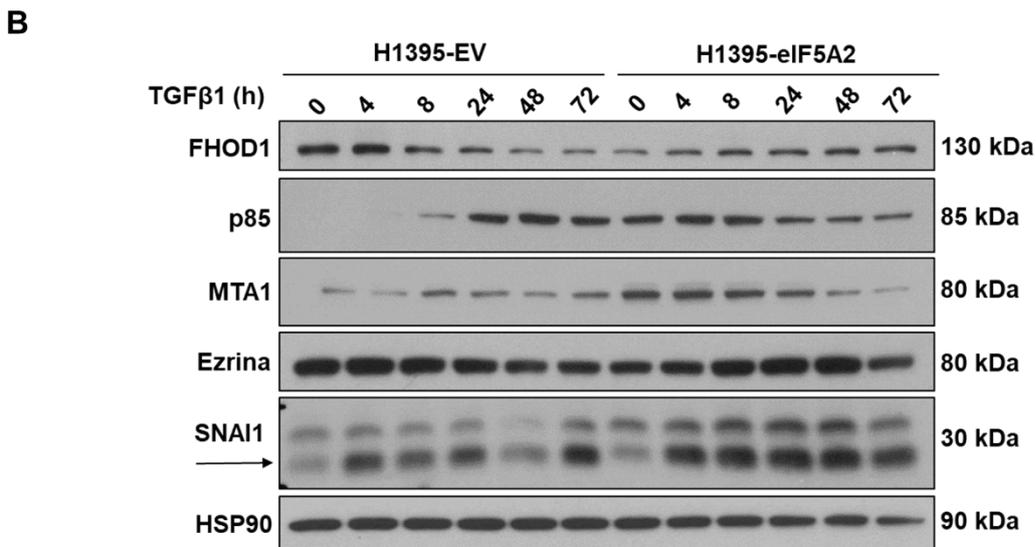
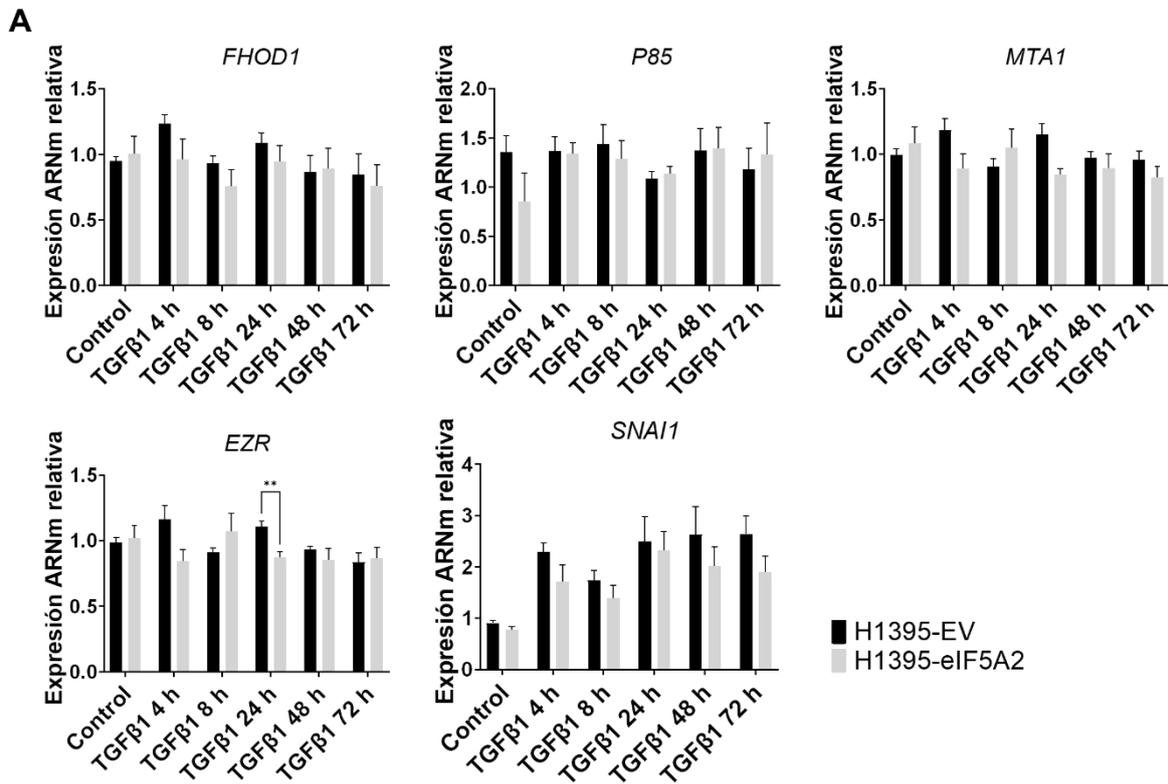
Los resultados muestran que no hay cambios significativos en el ARNm *FHOD1*, siendo su expresión ligeramente mayor en las células H1395-EV en comparación con las células que sobreexpresan eIF5A2. En las células H1395-EV, la expresión proteica de FHOD1 de las células sin tratar o a tiempos cortos de tratamiento con TGF β 1 (4 h y 8 h) es mayor que en las células H1395-eIF5A2. Sin embargo, a tiempos largos de tratamiento (48 h y 72 h), la expresión es mayor en las células que sobreexpresan eIF5A2.

Los niveles de ARNm de *P85* tampoco varían al tratar las células con TGF β 1. La expresión proteica de p85 sí varía con el tratamiento, siendo mayor en las células H1395-EV en los tiempos largos de tratamiento con TGF β 1, mientras que en las células H1395-eIF5A2 la expresión aumentan a las 4 h y 8 h y después disminuye.

Los niveles de *MTA1* son similares entre las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 y no varían con el tratamiento con TGF β 1. No obstante, los niveles de expresión de la proteína MTA1, son mayores en las células que sobreexpresan eIF5A2, teniendo un pico de expresión a las 8 h y 24 h, para después descender a medida que continúa el tratamiento con TGF β 1.

Los niveles de ARNm de *EZR* aumentan en las células H1395-eIF5A2 respecto a las H1395-EV a las 8 h de tratamiento con TGF β 1. Por el contrario, en el resto de tiempos la expresión en H1395-EV es superior, siendo esta diferencia significativa a las 24 h de tratamiento. Sin embargo, los niveles de proteína de ezrina también son ligeramente mayores a tiempos largos de tratamiento con TGF β 1 (24 h, 48 h y 72 h) en las células H1395-eIF5A2.

Por último, los niveles de expresión del factor de transcripción *SNAI1* aumentan al tratar las células con TGFβ1. Su expresión es ligeramente superior en las células H1395-EV, aunque la diferencia no es significativa. Al contrario, el incremento de los niveles de la proteína SNAI1 es mayor en las células H1395-eIF5A2 en comparación con las células H1395-EV.



C

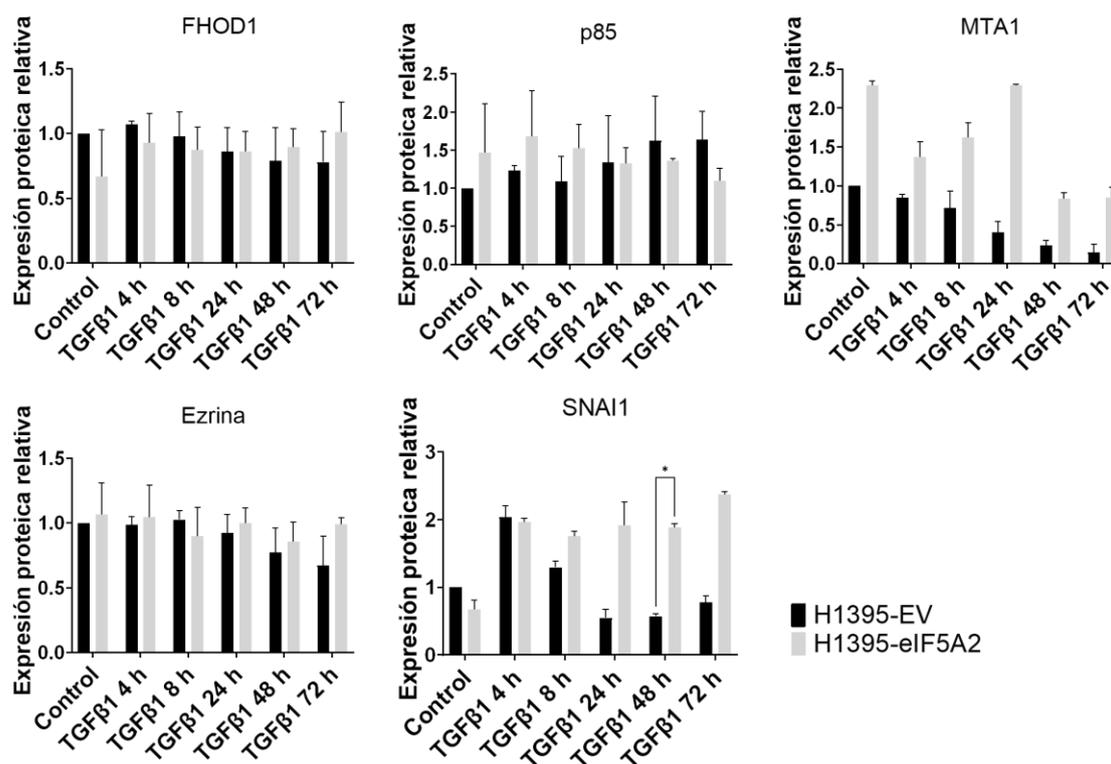


Figura 27. Expresión de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 4 h, 8 h, 24 h, 48 h o 72 h con TGFβ1. **A.** Expresión de ARNm de FHOD1, P85, MTA1, EZR y SNAI1. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (ns). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05).

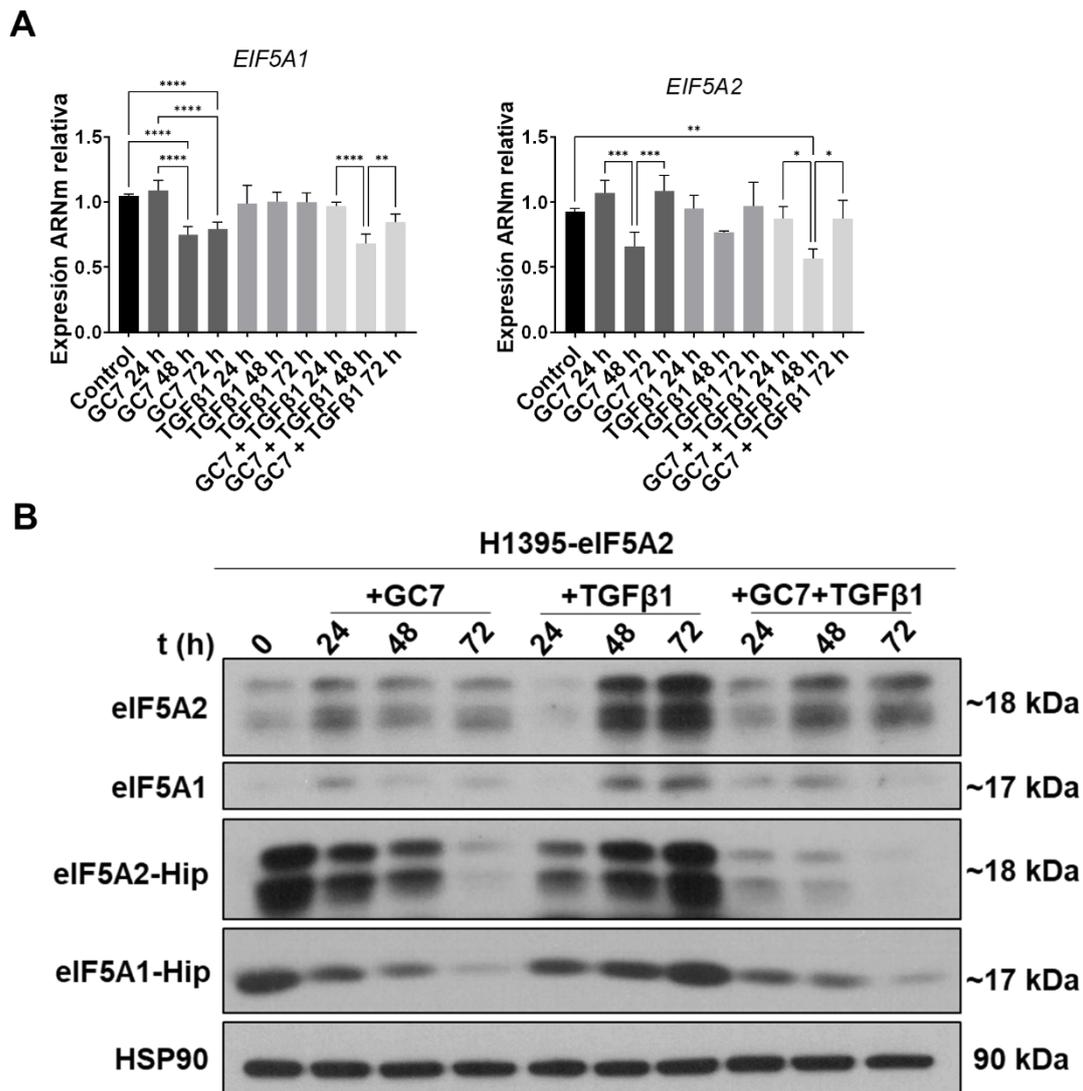
3.5. Efecto de la inhibición farmacológica con GC7, solo o en combinación con TGFβ1

Se ha examinado el efecto del inhibidor de la enzima DHS, GC7, en las células H1395-eIF5A2 a diferentes tiempos de tratamiento, solo o en combinación con TGFβ1.

3.5.1. La inhibición farmacológica con GC7 inhibe la expresión de eIF5A y eIF5A-Hip

Al tratar las células H1395-eIF5A2 con GC7, sólo o en combinación con TGFβ1, observamos un aumento de la expresión de *EIF5A2* a las 24 y 72 h, mientras que los niveles de ARNm de *EIF5A1* disminuyen (Figura 28A).

Los resultados de *Western Blot* (Fig. 28B y C) muestran una disminución proteica de eIF5A2 y de eIF5A2 hipusinado con el tiempo de exposición al inhibidor. Los niveles de ambas proteínas se recuperan, e incluso aumentan, con el tratamiento solo con TGFβ1, como se ha mostrado también en la Figura 24. Combinando ambos tratamientos, disminuye el efecto de la adición de TGFβ1 sobre la expresión proteica, siendo más leve el incremento de eIF5A2. En el caso de la forma hipusinada, su expresión es menor que en las células sin tratamientos, y además disminuye con el tiempo de tratamiento, confirmando así el papel de GC7 como inhibidor de la hipusinación, mientras que TGFβ1 promovería la expresión global de eIF5A2. Este mismo patrón de expresión se observa en la expresión de eIF5A1 y eIF5A1 hipusinado.



C

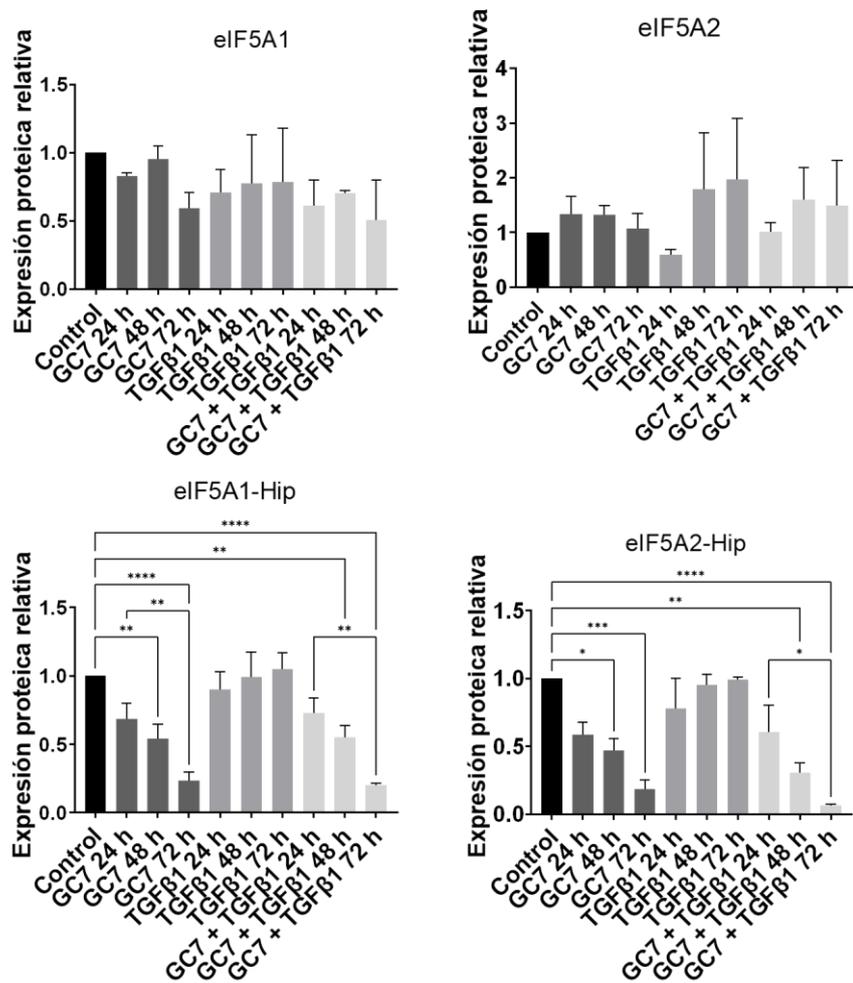


Figura 28. Expresión de eIF5A1 y eIF5A2 y sus respectivas formas hipusinadas en la línea estable H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 24 h, 48 h o 72 h con TGFβ1, GC7 o la combinación de ambos. **A.** Expresión de ARNm de EIF5A1 y EIF5A2. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0.00001). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas eIF5A1, eIF5A2, eIF5A1 hipusinado y eIF5A2 hipusinado. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0.00001).

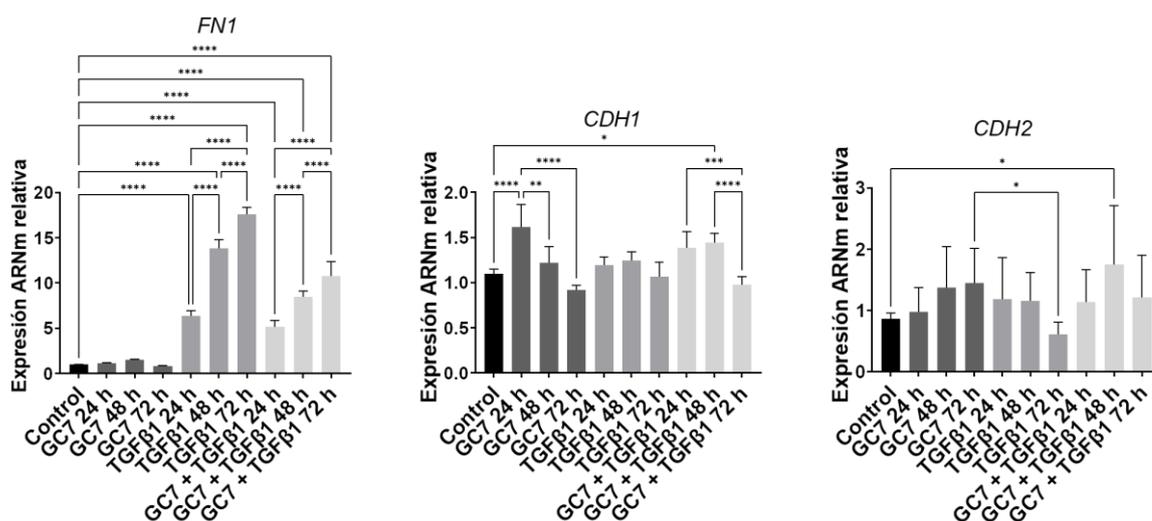
3.5.2. El tratamiento con GC7 inhibe la expresión de marcadores de fenotipo mesenquimal en las células H1395-eIF5A2

Al tratar las células con GC7 disminuyen los niveles de mensajero de *CDH1*, mientras que los niveles de *FN1* no varían y los niveles de *CDH2* aumentan ligeramente con el tratamiento con GC7, tanto solo como en combinación con TGFβ1. Al tratar solo con TGFβ1, el ARNm de *FN1* aumenta su expresión, y también aumenta aunque en menor medida, con el doble tratamiento. En el caso de *CDH1* no se aprecian diferencias al tratar las células con TGFβ1 en la expresión de mensajero. En *CDH2*, se observa una disminución del ARNm al tratar con TGFβ1 (Fig. 29A).

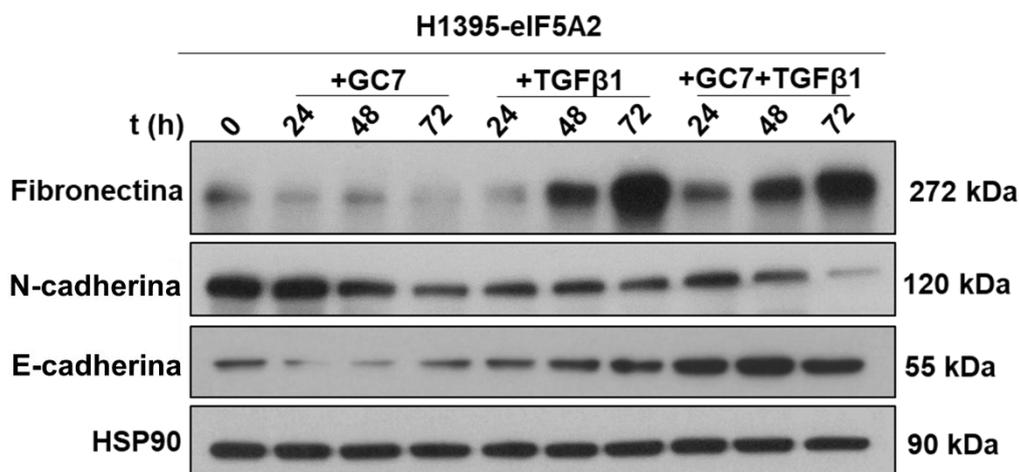
En concordancia a esto, en la Figura 29B y C también se observa un descenso de los niveles de las proteínas fibronectina, E-cadherina y N-cadherina al tratar las células con GC7 durante 72 h, siendo mayor la disminución de los niveles de E-cadherina cuando se combina los tratamientos con GC7 y TGFβ1.

En presencia de solo TGFβ1, se observa un aumento de la expresión de fibronectina y N-cadherina, coincidiendo con los resultados mostrados en la Figura 25; y mientras que este aumento de la fibronectina es menor al tratar las células en combinación con el GC7, en el caso de la N-cadherina se observa una mayor expresión proteica con el doble tratamiento, con un pico de expresión a las 48 h.

A



B



C

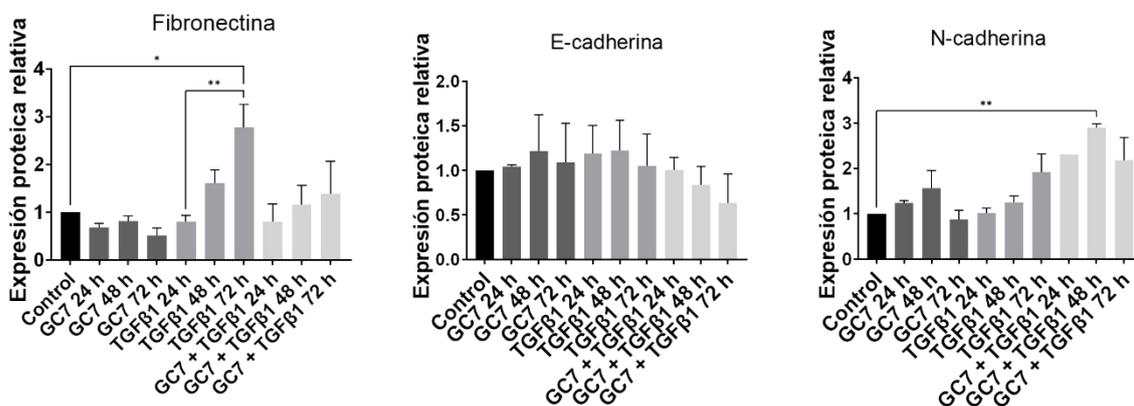


Figura 29. Expresión de fibronectina, E-cadherina y N-cadherina en la línea estable H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 24 h, 48 h o 72 h con TGFβ1, GC7 o la combinación de ambos. **A.** Expresión de ARNm de FN1, CDH1, CDH2 y VIM. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos fibronectina, E-cadherina y N-cadherina. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas fibronectina, E-cadherina y N-cadherina. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01).

3.5.3. El tratamiento con GC7 inhibe la expresión de proteínas involucradas en la EMT en las células H1395-eIF5A2

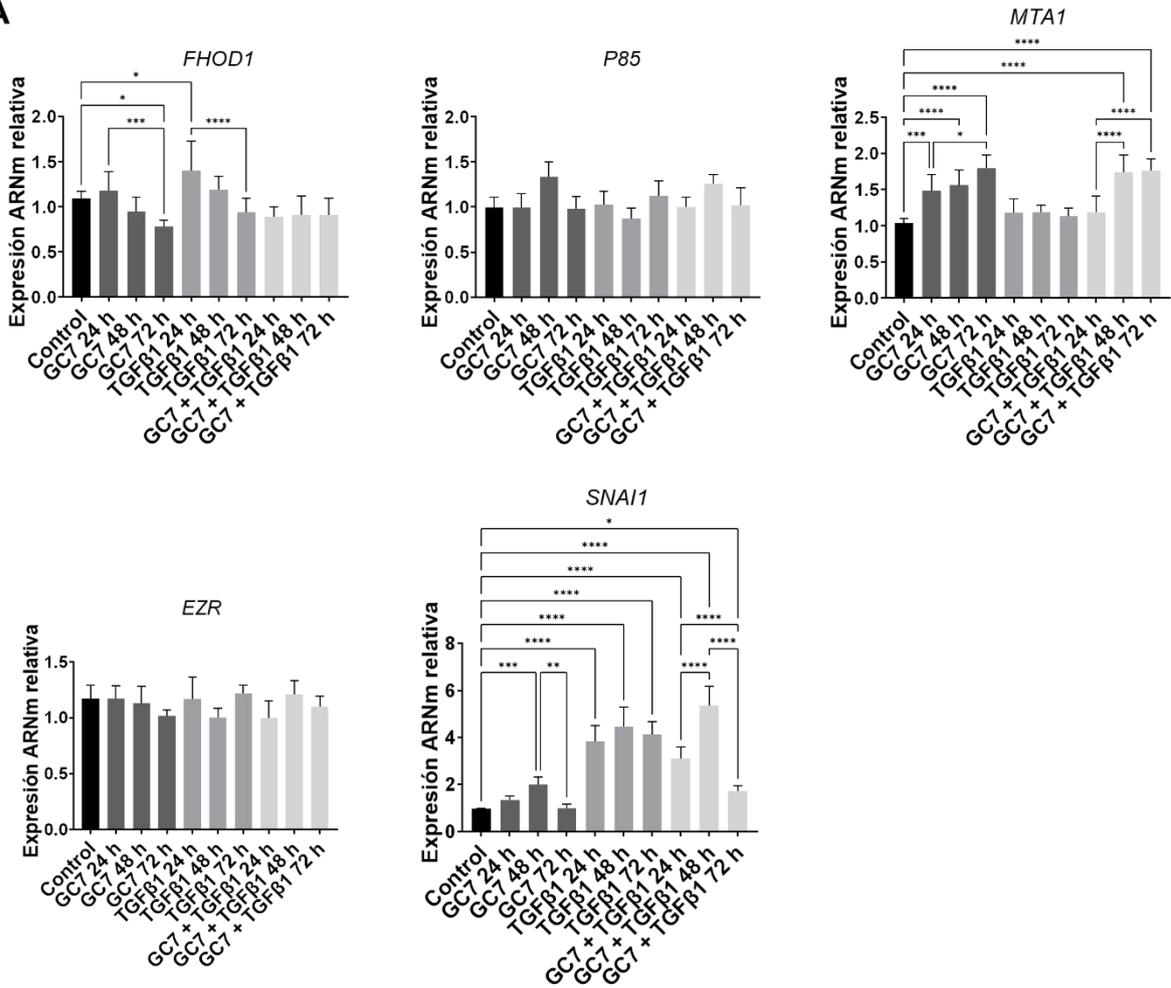
Se analizaron mediante qPCR los niveles de ARNm de *FHOD1*, *P85*, *MTA1*, *EZR* y *SNAI1*, cuyos resultados se muestran en la Figura 30A.

En el caso de *FHOD1* se observa una disminución de sus niveles al tratar las células con GC7, y al añadir TGF β 1 se aprecia un aumento general del ARNm, que disminuye con el tiempo de tratamiento. Con el tratamiento combinado la expresión de ARNm apenas varía. Los niveles de ARNm de *P85* aumentan al tratar las células con GC7 a las 48 h, y en el caso de *MTA1* además del aumento al añadir GC7, se observa también un aumento con la adición combinada de GC7 y TGF β 1. Los niveles de ARNm de *EZR* se mantienen similares con los diferentes tratamientos. Por último, se observa un aumento de la expresión de ARNm de *SNAI1* a las 48 h de tratamiento tanto en presencia de GC7, como con TGF β 1 y GC7; así como en todos los tiempos con TGF β 1.

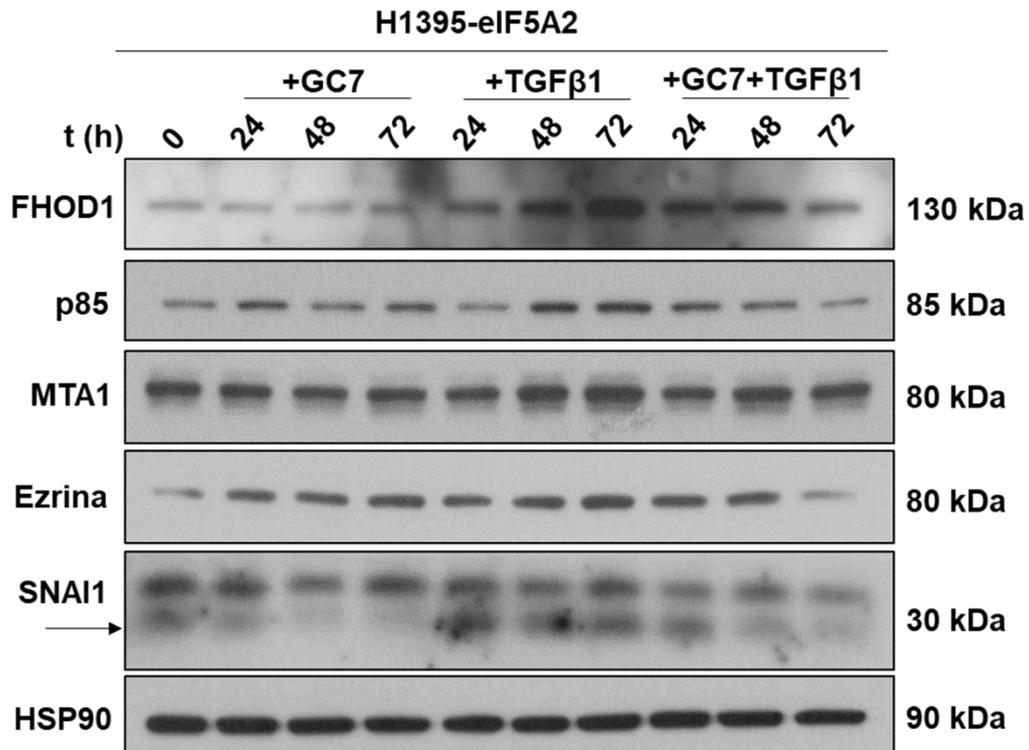
Al analizar la expresión proteica de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 también se observó un aumento de sus niveles en presencia de TGF β 1. Al tratar con GC7, se produce una disminución de los niveles proteicos de FHOD1 y SNAI1 respecto a su control, mientras que no se apreciaron cambios en MTA1, y los niveles de p85 y ezrina aumentaron. Respecto a estas dos últimas proteínas, la disminución de los niveles proteicos se produce con el doble tratamiento de GC7 y TGF β 1 (Fig. 30B y C).

El aumento observado en la expresión de mRNA y proteína de SNAI1 con el tratamiento con TGF β 1, unido a los resultados expuestos en la Figura 26, en la que los niveles de *SNAI1* aumentaban en las células H1395-eIF5A2 respecto a H1395-EV a las 24, 48 y 72 h de tratamiento con TGF β 1, es acorde al papel de SNAI1 como factor de transcripción promotor de la EMT, ya que al añadir TGF β 1 sus niveles aumentan tanto a nivel proteico como de ARN mensajero.

A



B



C

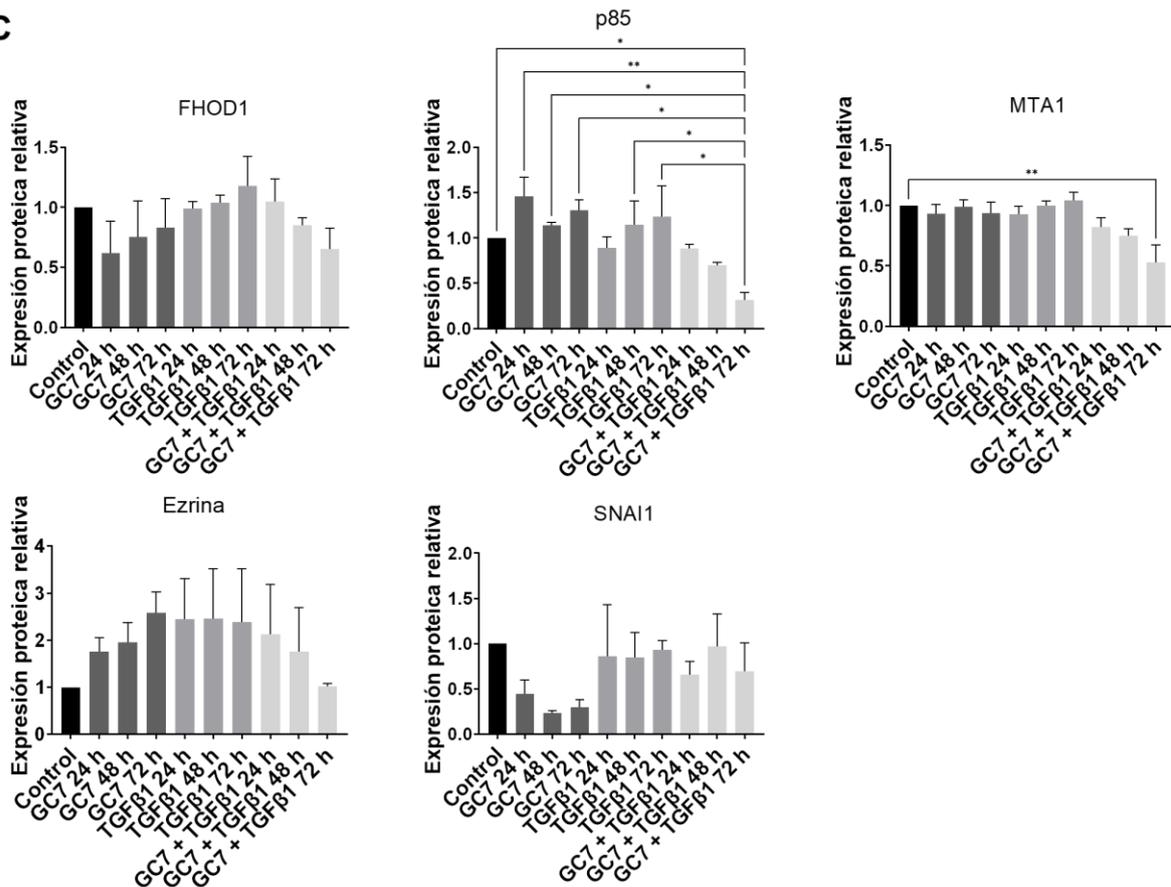


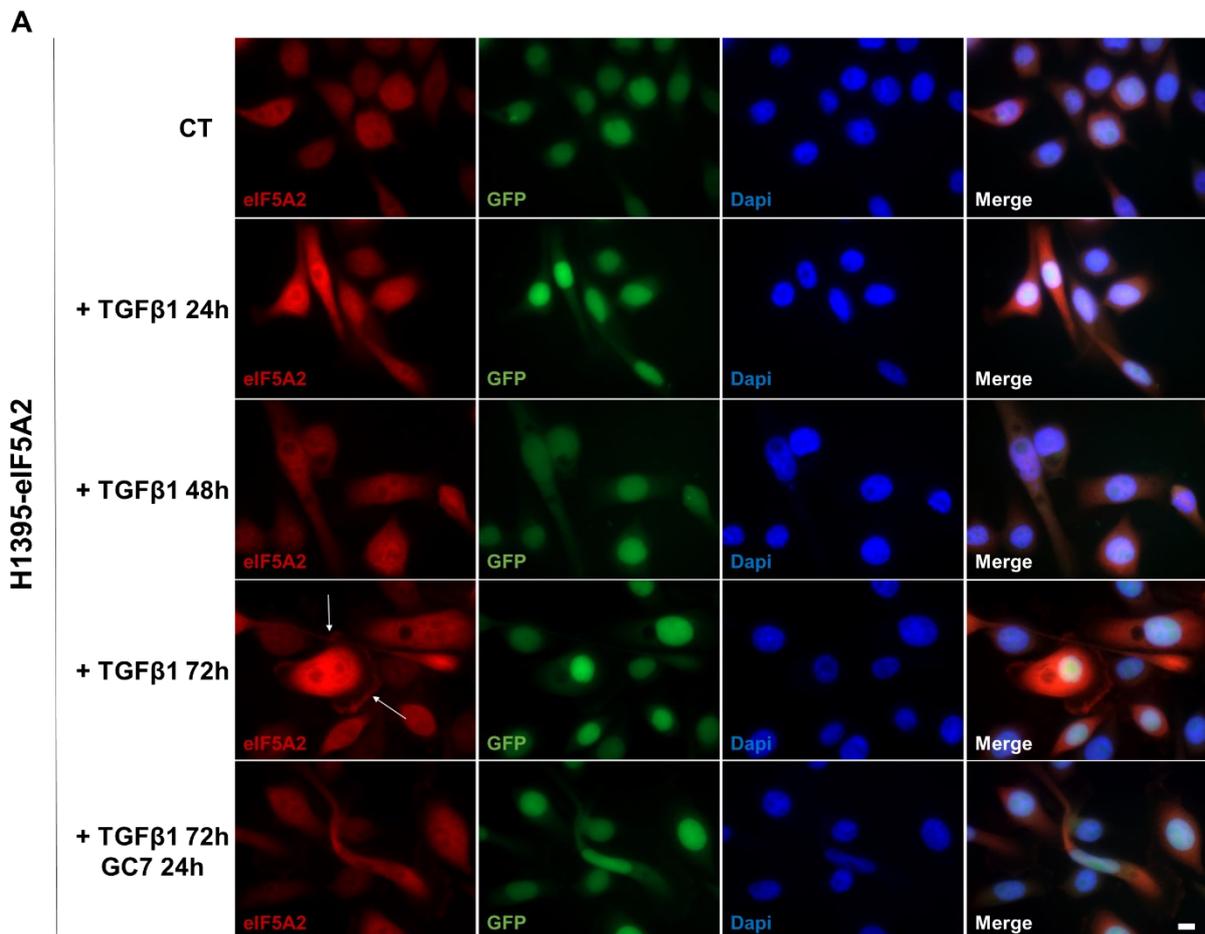
Figura 30. Expresión de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 en la línea estable H1395-eIF5A2. Las células se trataron durante 24 h, 48 h o 72 h con TGFβ1, GC7 o la combinación de ambos. **A.** Expresión de ARNm de FHOD1, P85, MTA1, EZR y SNAI1. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron por RT-qPCR. Las medias de los experimentos (N=3 con triplicados experimentales) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). **B.** Extractos proteicos de las células se utilizaron para analizar la expresión de los niveles proteicos de FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=3). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de las proteínas FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1. Las medias de los experimentos (N=3) se compararon mediante análisis ANOVA de dos vías con el test de Tukey para la comparación múltiple de las muestras (*p<0,05, **p<0,01).

3.6. El tratamiento con TGFβ1 induce la localización en la membrana plasmática de eIF5A2-Hip

Se ha estudiado la localización de eIF5A2 en las células H1395-eIF5A2 a distintos tiempos de tratamiento con TGFβ1 y también en presencia del inhibidor GC7 (Fig. 31).

En las células no tratadas, eIF5A2 se encuentra principalmente en el núcleo celular, pero a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con TGFβ1, la expresión de eIF5A2 aumenta en el citoplasma y a las 72 h de tratamiento con TGFβ1 se observa su localización también en la membrana plasmática y los lamelipodios, como se señala con las flechas en la imagen. Este fenotipo se observa mejor al realizar la inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Flag (Fig. 31B), que reconoce específicamente a Flag-eIF5A2, es decir, detecta únicamente eIF5A2 sobreexpresado, mientras que la inmunofluorescencia con anticuerpo contra eIF5A2 (Fig. 31A) detecta a tanto eIF5A2 endógeno como sobreexpresado, además de detectar, probablemente, también a eIF5A1.

Al añadir GC7 durante 24 h, la expresión de eIF5A2 disminuye y ya no aparece tan intensa en la membrana citoplasmática.



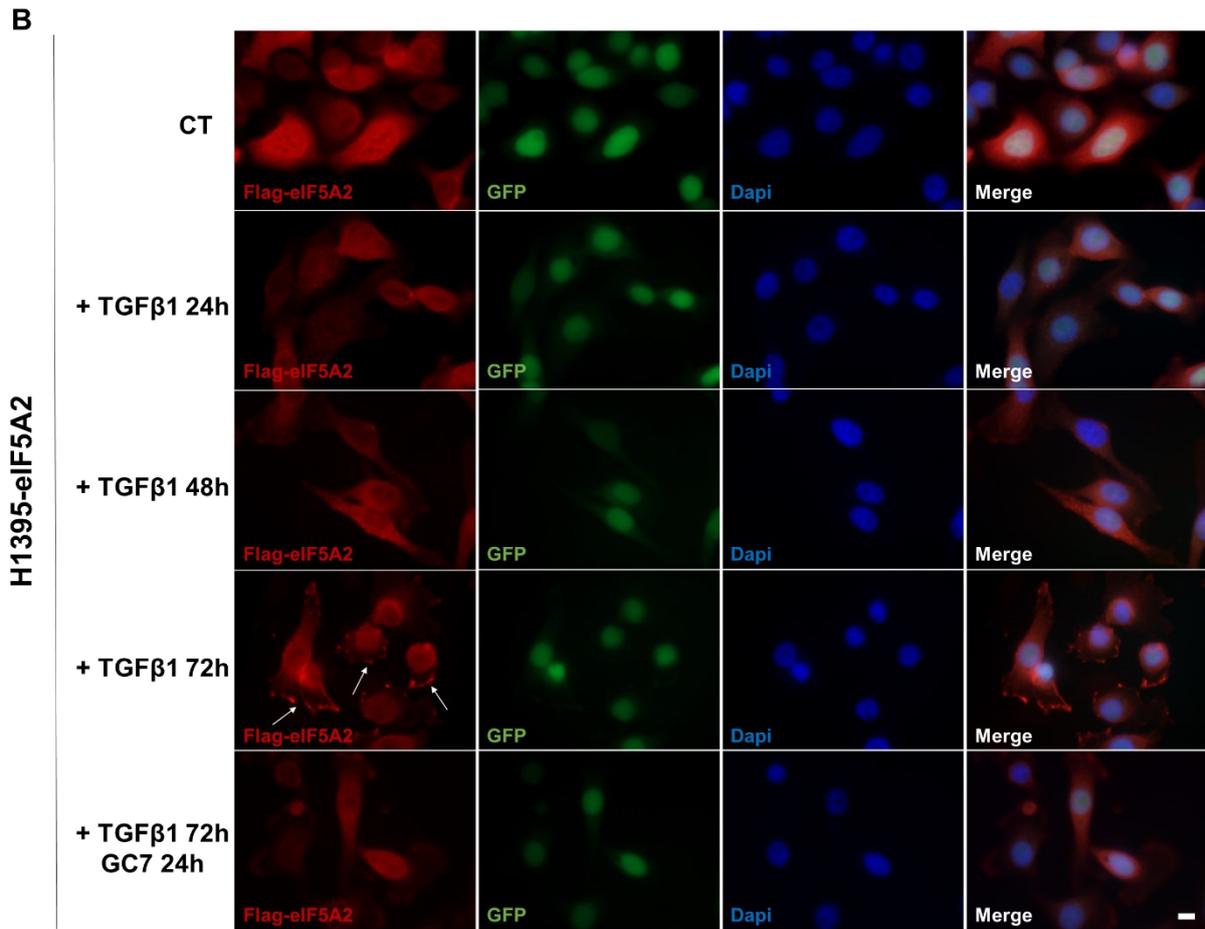


Figura 31. Imágenes de microscopía de fluorescencia en la línea estable H1395-eIF5A2. Las células se trataron con TGFβ1 durante 24 h, 48 h y 72 h y con la combinación de TGFβ1 72 h y GC7 24 h. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados (N=3). **A.** Las células se tiñeron con anticuerpo anti-eIF5A (rojo) y con DAPI (azul) para observar los núcleos. En verde se observa la GFP endógena que expresan las células estables. Barra de escala 10 μm. **B.** Las células se tiñeron con anticuerpo anti-Flag (rojo) y con DAPI (azul) para observar los núcleos. En verde se observa la GFP endógena que expresan las células estables. Barra de escala 10 μm.

4. Papel de eIF5A2 en la traducción de proteínas

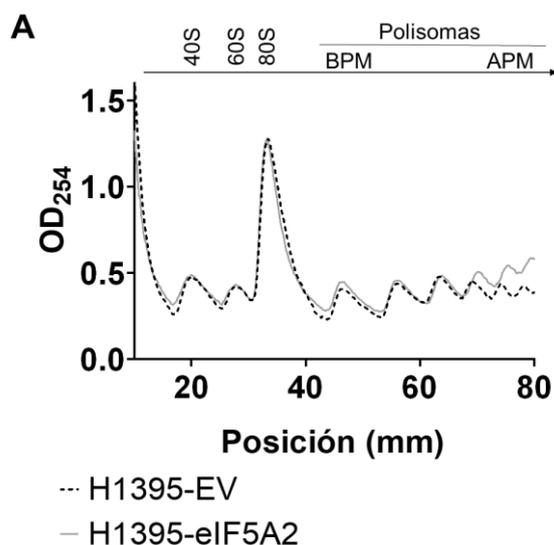
A continuación, se realizaron varias aproximaciones experimentales para analizar si eIF5A2 es un regulador de la maquinaria de traducción proteica.

4.1. La sobreexpresión de eIF5A2 aumenta la cantidad de polisomas en las células

Una de las aproximaciones que se han llevado a cabo ha sido el análisis del perfil de ribosomas en las líneas celulares que expresan eIF5A2 o el vector vacío generadas en el laboratorio. Con estos experimentos, se puede estudiar el perfil traduccional de las células, ya que permite separar en un gradiente de densidad continuo el ARNm libre o asociado a monosomas, bisomas y polisomas de distinto tamaño.

Los resultados muestran que al comparar los perfiles polisomales obtenidos de las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 hay un aumento del número de polisomas pesados en las células que sobreexpresan eIF5A2, lo que sugiere un aumento del ratio de traducción de proteínas en estas células (Fig. 32A).

Además, comprobando mediante *Western Blot* la expresión de eIF5A2 en las distintas fracciones polisomales recogidas (Fig. 32B), observamos un aumento de la asociación de eIF5A2 en las fracciones de polisomas (Fracciones 12-21), por lo que eIF5A2 estaría implicado en el aumento de la tasa traduccional observado en estas células respecto a las células H1395-EV. Como controles se han empleado las proteínas RPL4, que forma parte de la subunidad pesada del ribosoma (60S) y la proteína rpS6, que forma parte de la subunidad ligera del ribosoma (40S). En ambas líneas celulares, estas proteínas mostraban un patrón de expresión similar.



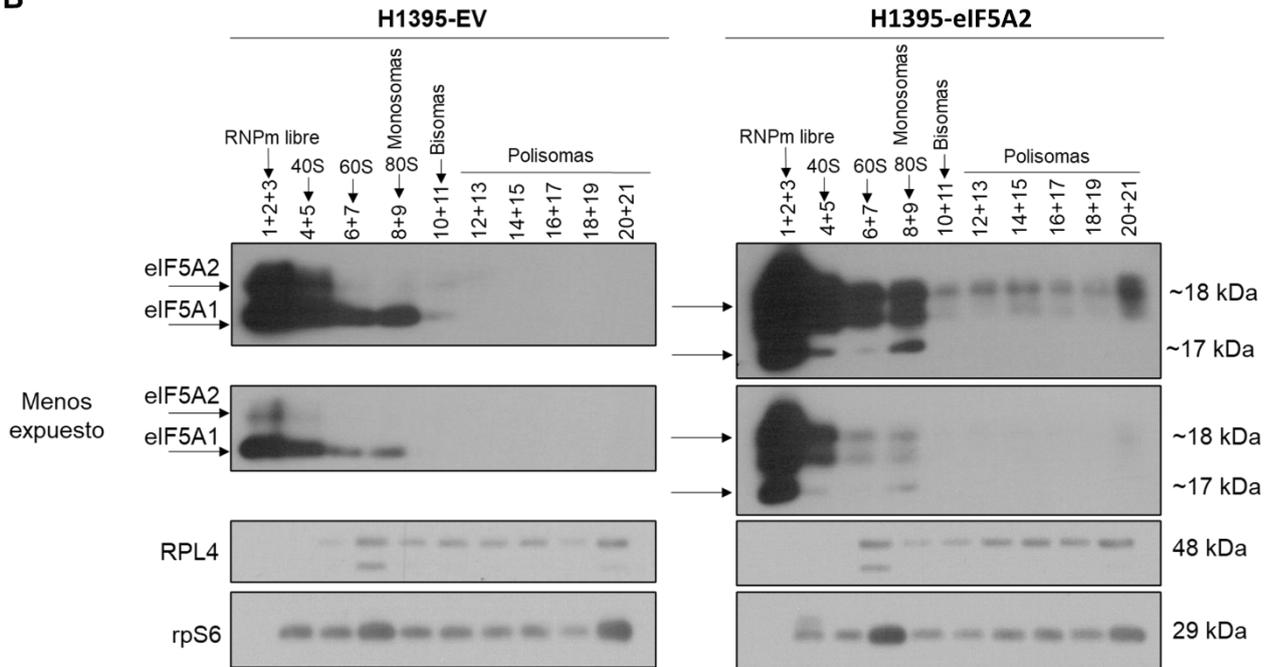
B

Figura 32. Perfil polisomal de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Los extractos celulares se separaron en un gradiente continuo de sacarosa y se midió la OD a 254nm en el fraccionador. **A.** Perfil del fraccionamiento de las células H1395-EV y H1395-eIF5A2. De izquierda a derecha, cada pico representa: la subunidad 40S, la subunidad 60S, monosomas (80S) y polisomas de bajo peso molecular (BPM) y alto peso molecular (APM). Se muestra una gráfica representativa de los experimentos realizados (N=3). **B.** Las distintas fracciones recogidas se emplearon para extraer proteína mediante TCA y analizar la expresión de los niveles proteicos de eIF5A1, eIF5A2, RPL4 y rpS6. Se muestra una imagen representativa de los experimentos realizados (N=2).

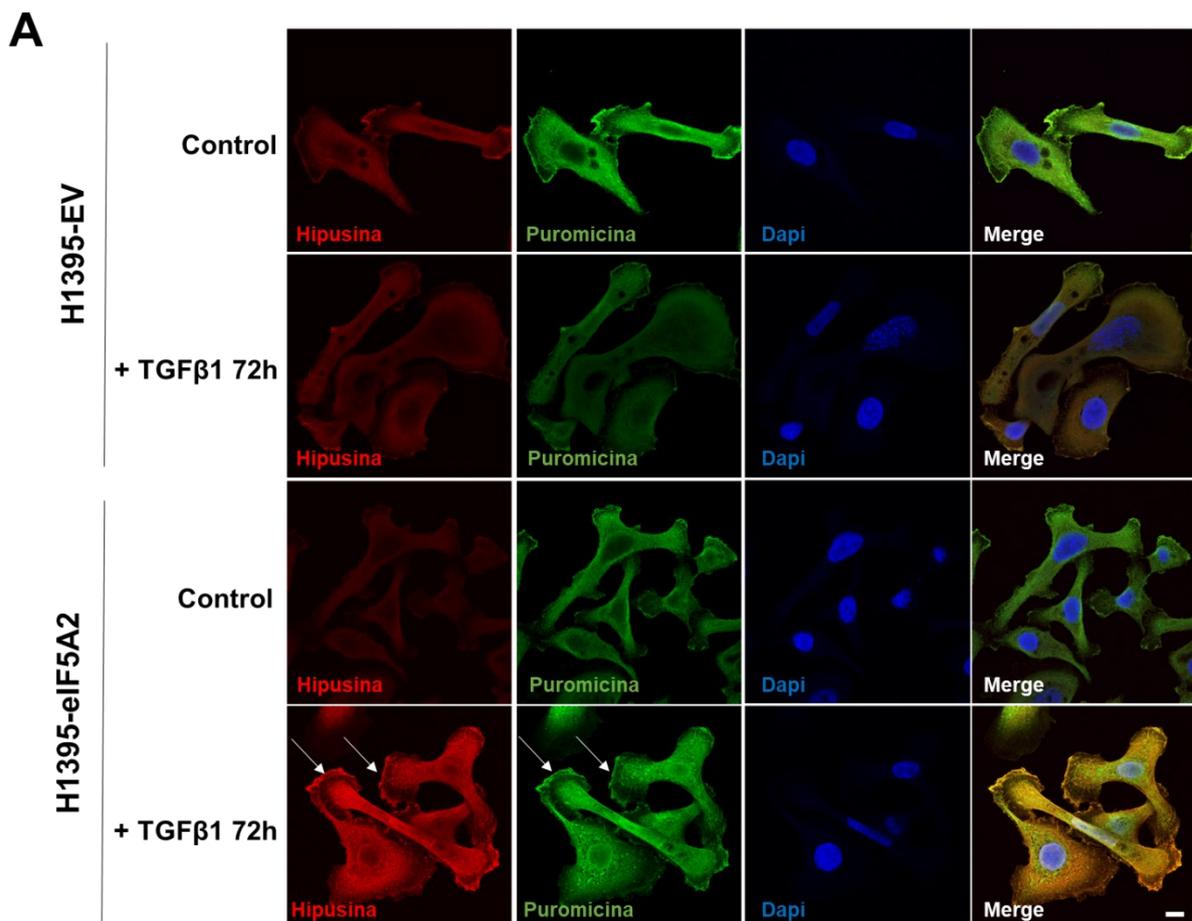
4.2. eIF5A2-Hip colocaliza con puromicina en puntos de traducción activos

La segunda aproximación llevada a cabo en el laboratorio para relacionar eIF5A2 con la maquinaria de síntesis de proteínas, ha consistido en realizar microscopía de fluorescencia en células marcadas con puromicina. La puromicina es un análogo estructural de una tirosina unida a un ARNt y, al tratar las células con ella, la síntesis celular se detiene. Al realizar inmunofluorescencia con anticuerpos contra puromicina, podemos detectar puntos en los que tiene lugar una traducción activa (Starck *et al.* 2004).

Los resultados obtenidos muestran que en las células que sobreexpresan eIF5A2 tratadas con TGF β 1, aumentan los niveles de puromicina (Fig. 33A y B), lo que indicaría una mayor actividad traduccional respecto a las células EV, coincidiendo con lo observado en el perfil polisomal en la Figura 32A. Este aumento no se observa al añadir GC7 en las células durante 24 h (Fig. 33B).

Además, Flag e hipusina colocalizan con la puromicina, con lo que podemos observar puntos de traducción activos en los que está implicado eIF5A2 hipusinado (Fig. 33A y B). Al tratar las células H1395-eIF5A2 con TGF β 1, estos puntos localizan en la membrana celular y los lamelipodios.

Cabe destacar que la expresión de Hipusina también aumenta al tratar las células H1395-eIF5A2 con TGF β 1 (Fig. 33A). Esto coincide con los resultados de *Western Blot* mostrados en las Figuras 25 y 28. Además, al tratar las células H1395-eIF5A2 con GC7, también se observa una menor expresión de Flag-eIF5A2, lo que también concuerda con los resultados mostrados en la Figura 28.



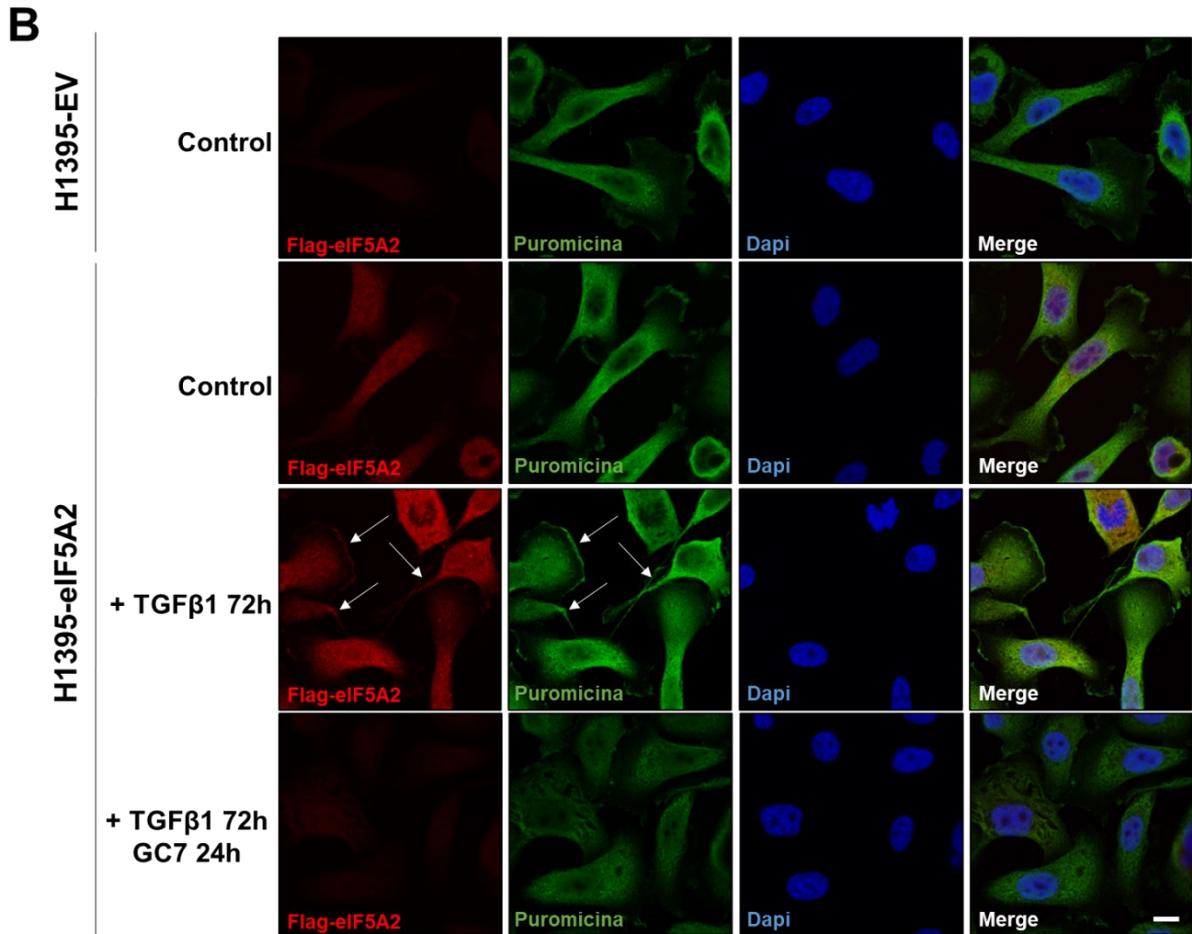


Figura 33. Imágenes de microscopía de fluorescencia en las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2. Las células se trataron con TGFβ1 durante 24 h, 48 h y 72 h y con la combinación de TGFβ1 72 h y GC7 24 h. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados (N=3). **A.** Las células se tiñeron con anticuerpo anti-hipusina (rojo), con anticuerpo anti-puromicina (verde) y con DAPI (azul) para observar los núcleos. Barra de escala 10 μm. **B.** Las células se tiñeron con anticuerpo anti-Flag (rojo), con anticuerpo anti-puromicina (verde) y con DAPI (azul) para observar los núcleos. Barra de escala 10 μm.

5. Estudio de eIF5A2 *in vivo* en modelos de xenotrasplante en ratón

5.1. La sobreexpresión de eIF5A2 promueve la formación de masas de células metastásicas

Las líneas celulares H1395-EV y H1395-eIF5A2 generadas en el laboratorio también se han empleado para xenotrasplantarlas de manera subcutánea en ratón NSG para analizar su capacidad en la formación de tumores.

Se inyectaron células H1395-eIF5A2 o H1395-EV de forma subdérmica en tres grupos de ratones inmunodeprimidos, cada vez con un distinto número de células (1.000.000 células, 50.000 células o 500 células). Observamos que a menor número de células inyectadas, el tiempo de latencia para el inicio del crecimiento del tumor aumenta, lo que permite observar diferencias entre la velocidad de crecimiento de los tumores generados por cada una de las líneas (Fig. 34B). Aunque no se aprecian diferencias entre el volumen tumoral final alcanzado por las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 en cada uno de los grupos (Fig. 34A), al observar en detalle la gráfica de crecimiento de los tumores generados a partir de la inyección de 500 células, se aprecia que el tumor correspondiente a las células que sobreexpresan eIF5A2 aumenta su tamaño mucho más rápido que el tumor generado a partir de las células H1395-EV, que tiene un crecimiento más lineal a lo largo del tiempo. El tumor H1395-eIF5A2 alcanza un tamaño muy similar al que tiene en el momento de la eutanasia una semana antes que el tumor H1395-EV (Figura 34D).

Al tener estos tumores un crecimiento diferencial, se comprobó si una vez el tumor H1395-eIF5A2 había alcanzado el tamaño máximo, las células tumorales habían sido capaces de migrar y colonizar otros tejidos. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias en cortes de los pulmones recogidos en el momento de la eutanasia, y se pudo confirmar que existe una diferencia en la capacidad invasiva de las células. En el caso de los ratones inyectados con las células H1395-EV, las células que llegan al tejido pulmonar lo invaden como células individuales, mientras que en los pulmones de los ratones inyectados con las células H1395-eIF5A2 se observa la existencia de acúmulos y masas mucho más grandes de células (Fig. 34D).

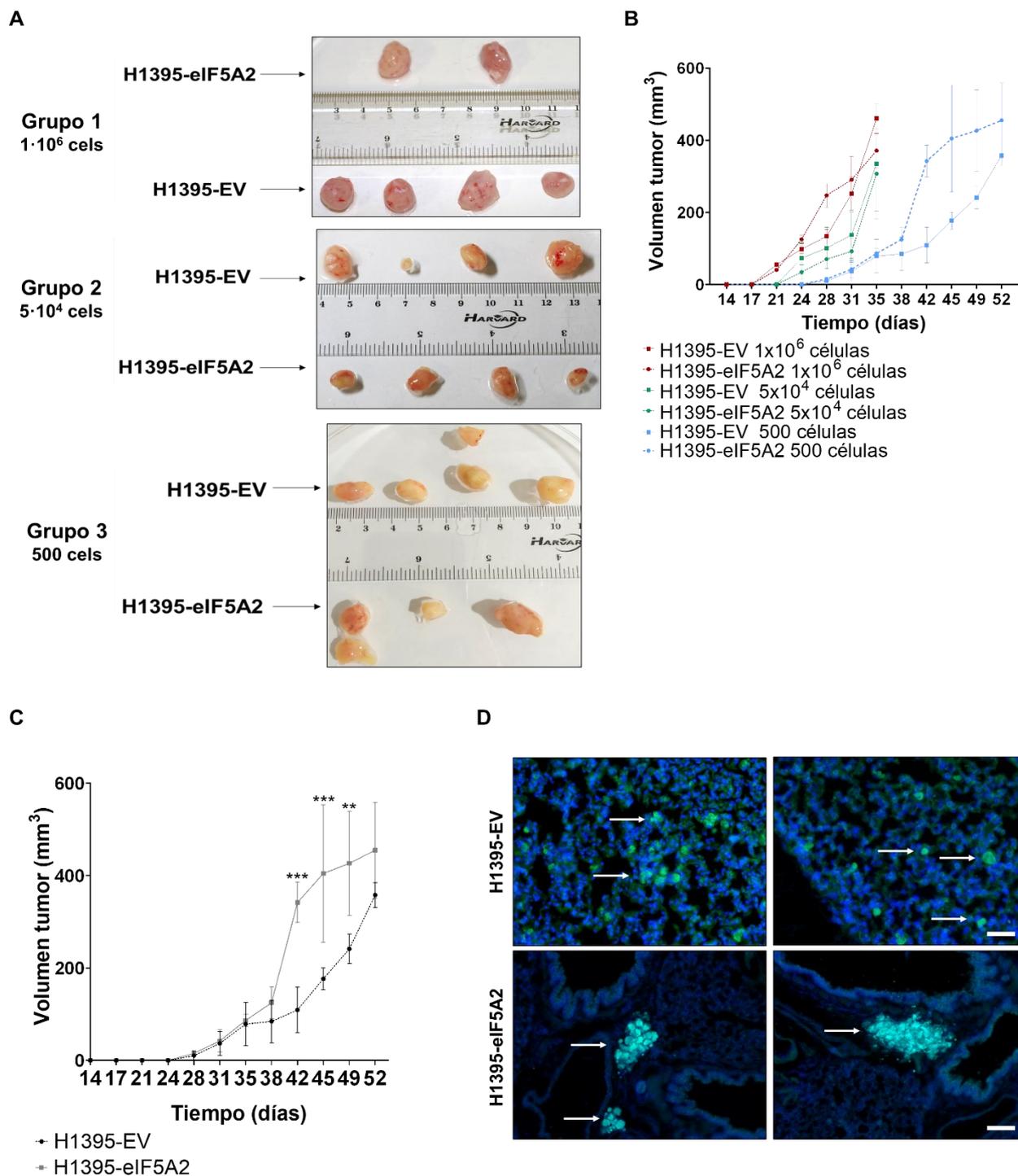


Figura 34. Estudio de la capacidad iniciadora de tumores y capacidad invasiva de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2 en ratones NSG. A. Imágenes de los tumores generados en tres grupos de ratones NSG xenotrasplantados con las células H1395-eIF5A2 y H1395-EV. En el primer grupo se inyectaron 1 millón de células, en el segundo grupo se inyectaron 50.000 células y en el último grupo se inyectaron 500 células. Las imágenes se tomaron en el momento de la eutanasia y recogida de la muestra.

(Continuación Fig. 34) **B.** Gráfica de crecimiento tumoral de las tres tandas de inyección en ratones NSG. El volumen tumoral se midió con la ayuda de un pie de rey cada 3-4 días mientras se comprobaba el estado de los ratones. **C.** Gráfica individual del crecimiento tumoral del grupo 3 de ratones NSG, inyectados con 500 células. El volumen tumoral se midió con la ayuda de un pie de rey cada 3-4 días mientras se comprobaba el estado de los ratones. **D.** Imágenes de microscopía de fluorescencia en tejido pulmonar recogido en el grupo 3 de los ratones NSG, inyectados con 500 células. El tejido se tiñó con Dapi (azul) para visualizar los núcleos. En verde se observa la GFP endógena que expresan las células estables. Barra de escala en las imágenes de las células H1395-EV 50 μm ; barra de escala en las imágenes de las células H1395-eIF5A2 100 μm .

6. Expresión de eIF5A2 en muestras de pacientes de CPNM

En colaboración con el Hospital La Fe de Valencia, se obtuvieron en el laboratorio un total de 33 muestras de tejido sano y tumor primario de cáncer de pulmón no microcítico de pacientes, que se implantaron en ratón NSG y 9 generaron tumor en el ratón (Patient-derived xenograft, PDX). 8 de estos tumores corresponden a CPNM (Pardo-Sánchez *et al.* 2021), que son los que se analizan a continuación.

En primer lugar, se realizó tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para identificar las células tumorales, y se analizó la expresión de eIF5A2 mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra eIF5A2 en el tejido del tumor primario y tejido normal adyacente al tumor. Los resultados obtenidos, mostraron que las 8 muestras expresan eIF5A2 en distintas intensidades (Fig. 35). También se analizó la expresión del marcador de proliferación Ki67 (Hitchcock 1991), cuyo valor como indicador de mal pronóstico se ha descrito en CPNM (Martin *et al.* 2004). En la Tabla 5 del apartado de Materiales y Métodos se resume la información clínica de los pacientes a los que pertenecen estas muestras tumorales.

La tinción con H&E se une a componentes celulares y biomoléculas, permitiendo distinguirlos gracias a los distintos colores (de rojo a azul) que se obtienen por la naturaleza ácida y básica de las distintas moléculas teñidas. Así, podemos distinguir, entre otros, células tumorales presentes en un nicho de tejido, ya que estas células tienen un pH más ácido, lo que les confiere una tinción morada característica. Por este motivo, observamos en la Figura 35 como en general, todas las muestras tumorales tienen masas más grandes y compactas de células teñidas de violeta más oscuro, que corresponden a estas células tumorales.

La muestra LF01 se ha descrito como un adenocarcinoma acinar, en estadio IIb. Esta muestra tiene una baja expresión de eIF5A2, tanto en tejido normal como en el tumor primario, y su localización es nuclear. Esto coincide con la localización observada para el marcador Ki67, cuya expresión también es baja y localiza en el núcleo de las células tumorales. En el tejido sano no se aprecia expresión de este marcador.

La muestra LF05 es un adenocarcinoma sólido, diagnosticado en un estadio avanzado de la enfermedad, en estadio IVa. En esta muestra se aprecia un claro aumento de la expresión de eIF5A2 en el tejido tumoral respecto al sano, con una localización citoplasmática y perinuclear. Este aumento de la expresión coincide también con un aumento de la expresión de Ki67 en la muestra tumoral, localizándose este marcador en el núcleo. En esta muestra, tampoco se observan células positivas para Ki67 en el tejido sano.

La muestra LF09 corresponde a un adenocarcinoma mucinoso lepidico, diagnosticado en estadio temprano Ib. Este tipo de cáncer es menos invasivo que otros subtipos, como el ADC acinar. En esta muestra se observa una expresión media de eIF5A2 en el tejido tumoral, algo mayor a la observada en el tejido sano. En este tejido la expresión es nuclear, mientras que en el tumor se aprecia marcaje tanto en el núcleo como en el citoplasma. Además, las células positivas para eIF5A2 se sitúan mayormente en el lumen de la parte tumoral. Ki67 es negativo en el tejido sano, y se aprecian sólo algunas células positivas en el tejido tumoral.

La muestra LF15, al igual que en el caso de la LF05, es un adenocarcinoma sólido, en este caso diagnosticado en un estadio más inicial de la enfermedad (estadio IIb). En esta muestra se observa una sobreexpresión de eIF5A2 en el tejido tumoral respecto al tejido sano, con la mayoría de las células presentes en el corte positivas para eIF5A2, con un marcaje nuclear, perinuclear y citoplasmático. Esta elevada expresión de eIF5A2 coincide con una elevada expresión del marcador Ki67, siendo positivo en las mismas zonas en las que se expresa eIF5A2.

La muestra LF19 se describió como un adenocarcinoma acinar, detectado en estadio Ia3. En la tinción de H&E se puede observar cómo las células tumorales crecen en esos conjuntos de células que se parecen a glándulas, característicos de este tipo de cáncer. eIF5A2 tiene una elevada expresión en esta muestra, y también localiza de forma nuclear, perinuclear y citoplasmática. En su mayoría, las células positivas para eIF5A2 se localizan dentro de estas regiones glandulares de células. En la periferia de este mismo espacio, es decir, en contacto con el estroma tumoral, localizan las células que son positivas para Ki67.

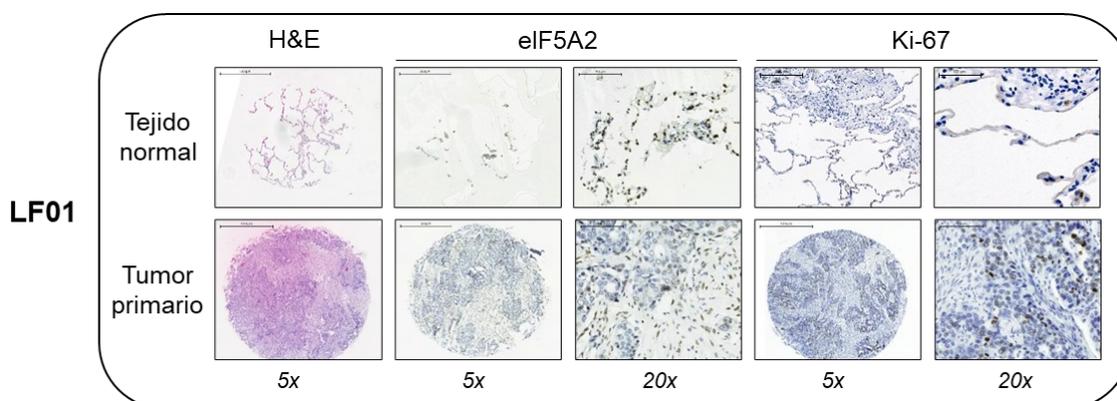
La muestra LF20 también se describió como un adenocarcinoma acinar en estadio IIIa, un estadio más tardío de la enfermedad. En esta muestra se observa una baja

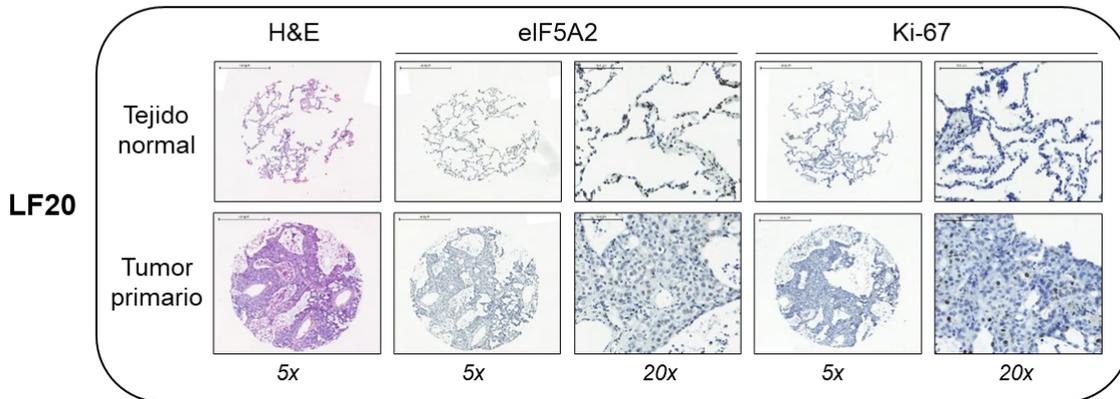
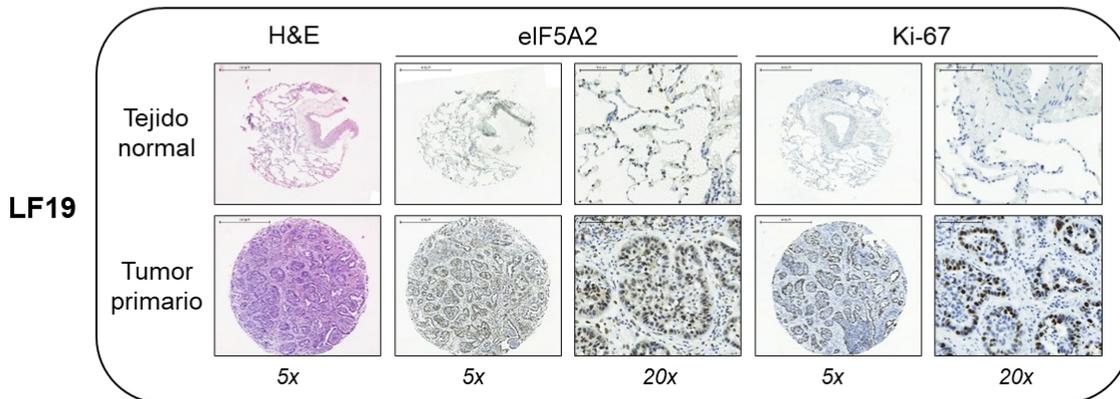
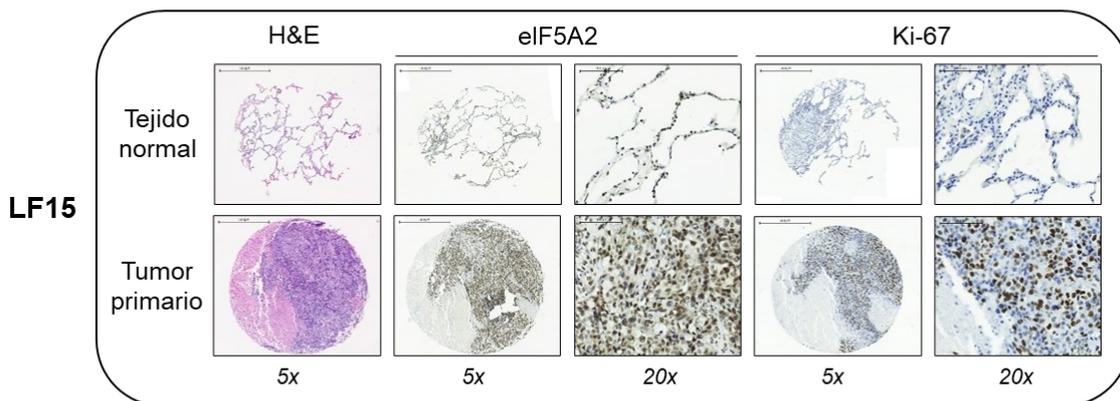
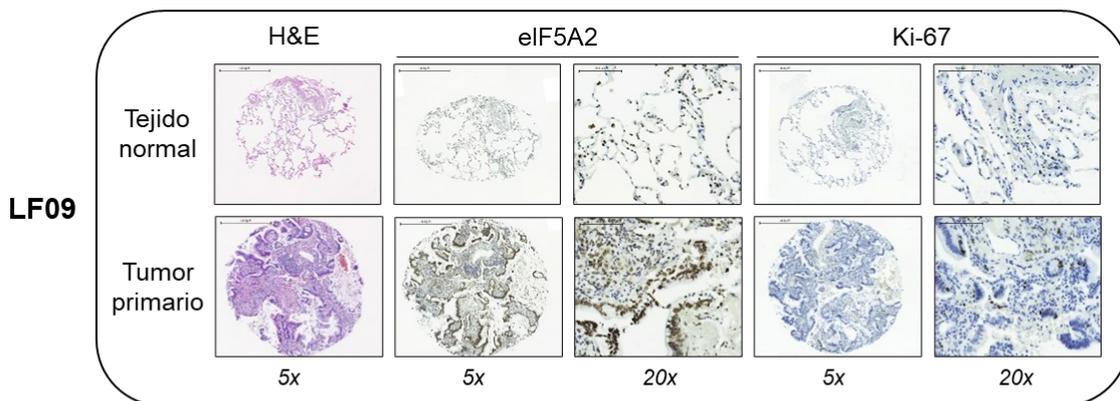
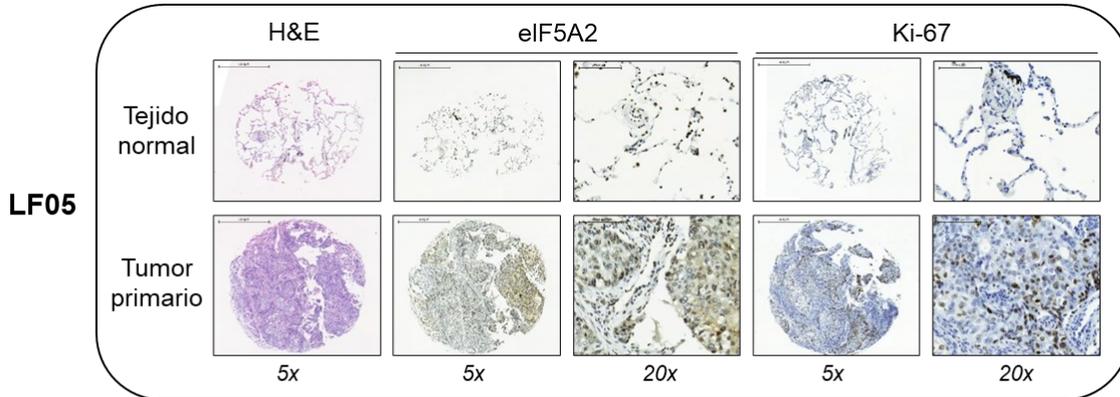
expresión de eIF5A2 y de Ki67 en el tumor primario. Aun así, cabe destacar que esta muestra es la que menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) presentó, de poco más de un año.

La muestra LF21 es la única muestra de esta colección que no es un adenocarcinoma. Se diagnosticó como un carcinoma escamoso en estadio Ia3. En la tinción con H&E se observa claramente diferenciada la zona de células tumorales escamosas con un color púrpura más intenso. Son estas células las que expresan eIF5A2 de una manera más intensa, localizándose la expresión mayoritariamente alrededor del núcleo. En este caso, Ki67 muestra una expresión más baja, siendo positivas sólo aquellas células que se encuentran en contacto con el estroma en el tumor primario.

Por último, la muestra LF29 también se identificó como un adenocarcinoma sólido, pero en este caso se observó que está escasamente diferenciado, es decir que apenas conserva el fenotipo de las células en las cuales se originó. Se diagnosticó en un estadio avanzado de la enfermedad, en estadio IVb, lo cual puede explicar, en parte, el estado de indiferenciación del tumor. En esta muestra, la expresión de eIF5A2 es elevada en el tumor primario, con una gran cantidad de células positivas repartidas por todo el tejido, con marcaje nuclear y perinuclear. Sin embargo, Ki67 apenas se expresa en el tumor primario.

Un resumen de la información descrita se presenta en la Tabla 6. En todos los tumores la localización de eIF5A2 es nuclear y perinuclear, y también se observa en algunas células expresión citoplasmática. Además, en la muestra LF15, una de las muestras con mayor expresión de eIF5A2, esta se correlaciona con una mayor expresión de Ki67.





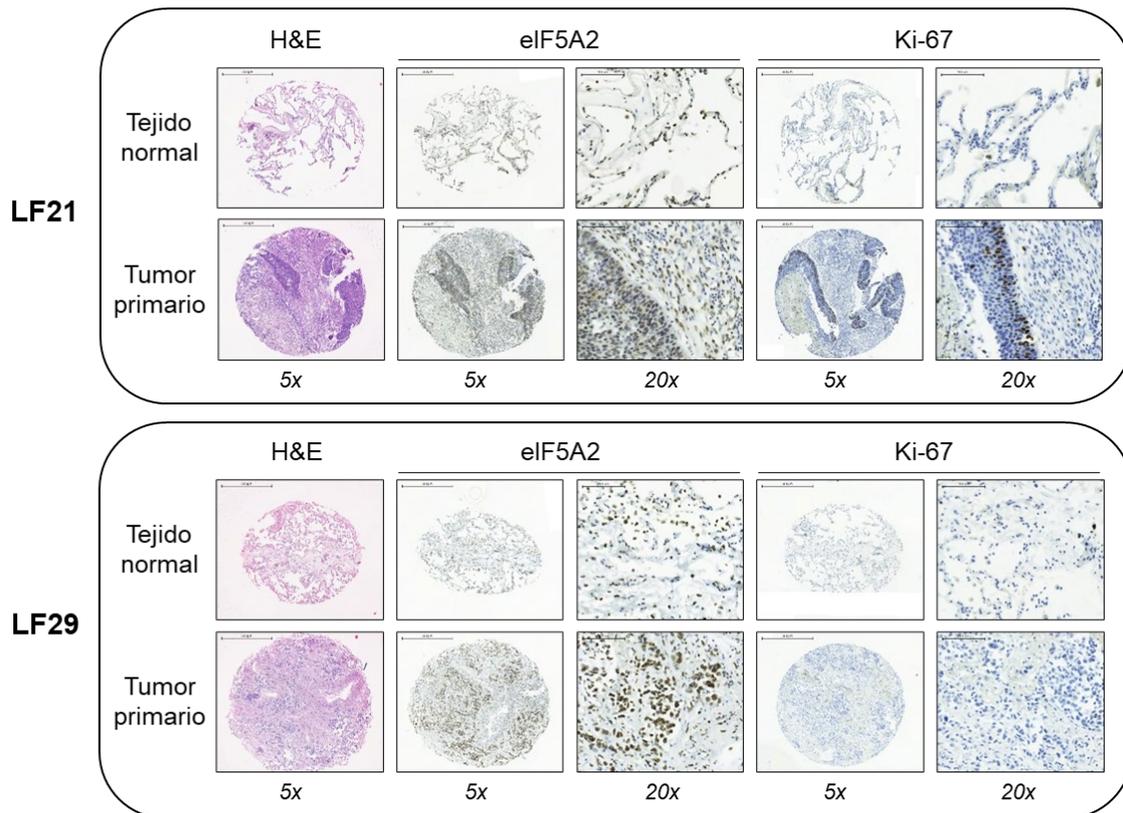


Figura 35. Inmunohistoquímica de la micromatriz de tejido de las muestras LF01, LF05, LF09, LF15, LF19, LF20, LF21 y LF29. Se muestra tejido normal (sano) y tejido del tumor primario. Se realizó inmunohistoquímica de hematoxilina y eosina (H&E), con el anticuerpo anti-eIF5A2 y con el anticuerpo anti-Ki67. Barra de escala para las imágenes 5x; 500 μm , barra de escala para las imágenes 20x; 100 μm .

Tabla 6. Resumen de las características clínicas e inmunohistoquímicas de las muestras de los pacientes LF01, LF05, LF09, LF15, LF19, LF20, LF21 y LF29.

Paciente	Estadio	Histología	SLE	Muestra	eIF5A2		Ki67	
					Intensidad	Localización	Intensidad	Localización
LF01	IIb	ADC predominantemente acinar	31,53	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	+/-	Núcleo	+/-	Núcleo
LF05	IVa	ADC predominantemente sólido	29,23	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	+	Citoplasma, perinuclear	++/-	Núcleo
LF09	Ib	ADC mucinoso predominantemente lepidico	27,57	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	+/-	Citoplasma, perinuclear, núcleo	+/-	Núcleo
LF15	IIb	ADC predominantemente sólido	14,23	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	++	Núcleo, perinuclear, citoplasma	++/-	Núcleo
LF19	Ia3	ADC acinar	24,30	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	++/-	Perinuclear, núcleo (algo citoplasma)	+/-	Núcleo
LF20	IIIa	ADC acinar	12,10	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	+/-	Perinuclear (algo citoplasma)	+/-	Núcleo
LF21	Ia3	Carcinoma Escamoso	22,10	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	++/-	Perinuclear (algo núcleo y citoplasma)	+/-	Núcleo
LF29	Ivb	ADC sólido escasamente diferenciado	15,90	Tejido normal	+/-	Núcleo	n.d.	
				Tumor primario	++/-	Núcleo, perinuclear	+/-	Núcleo

Además, se calculó el H-score de eIF5A2 y el marcador de proliferación y Ki67 y para cada paciente, a partir de las imágenes obtenidas del TMA, Se calculó aplicando la fórmula: $(1 \times \% \text{ células positivas con baja intensidad } 1+) + (2 \times \% \text{ células positivas } 2+) + (3 \times \% \text{ células positivas con alta intensidad } 3+)$. La intensidad para cada célula

positiva se obtuvo mediante una deconvolución de color empleando el plugin IHC Profiler (Pardo-Sánchez *et al.* 2021; Varghese *et al.* 2014).

Los H-score obtenidos se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman, obteniendo así una matriz de correlación que evalúa la relación entre ambas proteínas (Fig. 36). Los resultados muestran que existe una ligera relación positiva (coeficiente 0,17) entre Ki67 y eIF5A2. Sería necesario ampliar el tamaño muestral para poder establecer una mejor correlación.

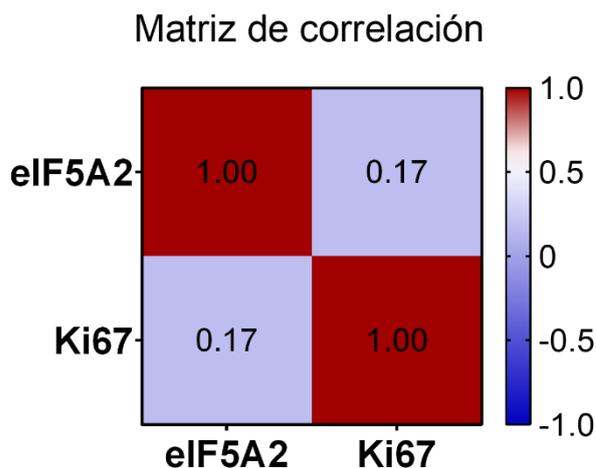


Figura 36. Matriz de correlación entre eIF5A2 y Ki67. La matriz se obtuvo tras aplicar el coeficiente de correlación de Spearman a los H-score obtenidos a partir del TMA de cada paciente.

Finalmente, con el fin de estudiar la relación entre la supervivencia de los pacientes y la mayor o menor expresión de eIF5A2, se realizó una curva de Kaplan-Meier. Los resultados, aunque no son estadísticamente significativos (debido al bajo número muestral) indican que una mayor expresión de eIF5A2 se asocia a una menor tasa de supervivencia (Fig. 37A). Este resultado coincide con lo observado en los datos de TCGA Pan-Cancer Atlas Studies en cBioPortal for Cancer Genomics, que muestran que una mayor expresión de *EIF5A2* se relaciona de manera significativa (p-Valor: 0.0465) con una menor tasa de supervivencia y peor pronóstico. Al contrario, niveles elevados de *EIF5A1* no están relacionados con mal pronóstico. Estos resultados ponen de manifiesto el papel potencial de eIF5A2 como un posible marcador de mal pronóstico en CPNM.

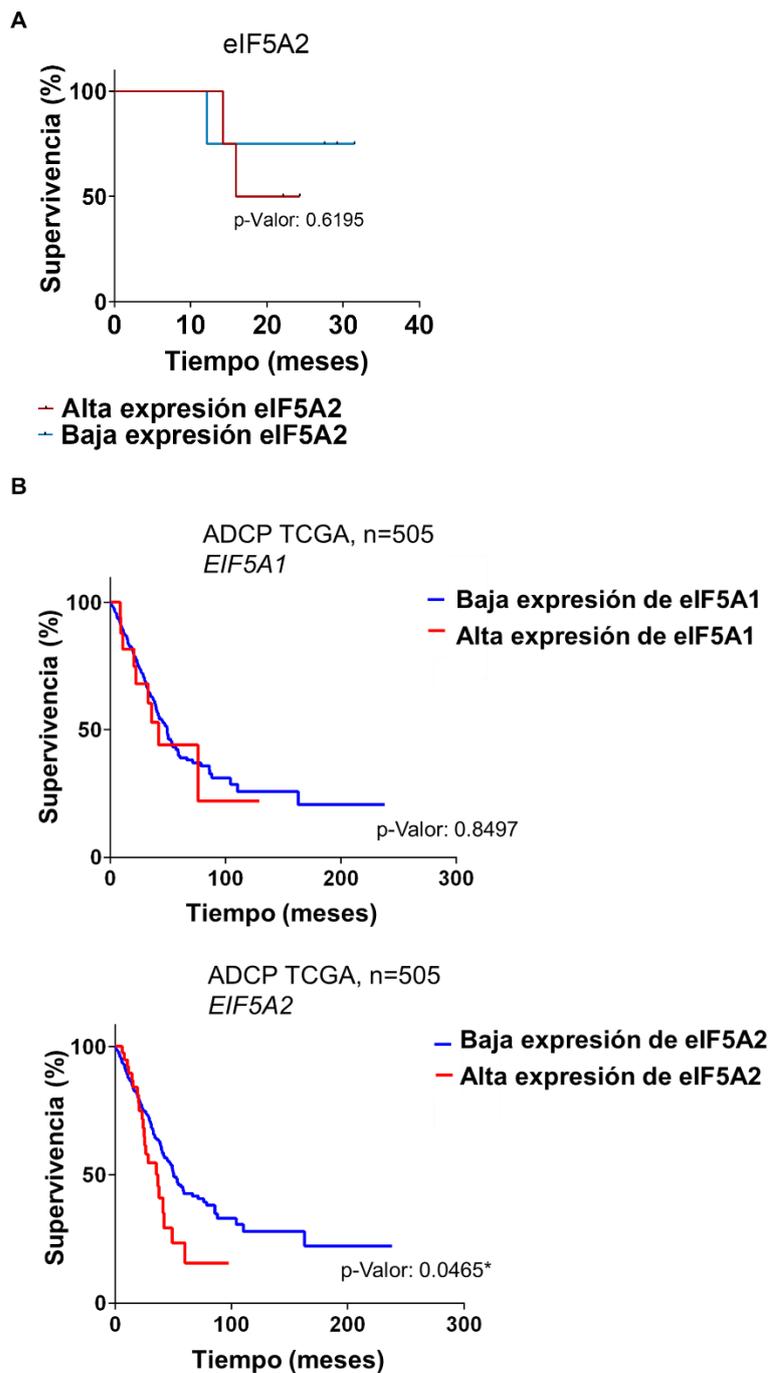


Figura 37. Curvas de supervivencia de pacientes de CPNM con relación a la expresión de eIF5A2. A. Curva de supervivencia de los pacientes incluidos en este estudio. Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier. (Continuación Fig. 37) El análisis de supervivencia se realizó mediante la prueba de Mantel-Cox (rango logarítmico) (ns). **B.** Curvas de supervivencia de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (ADCP) con alta y baja expresión de EIF5A1 (ns) y EIF5A2 (* $p < 0,05$) incluidos en el conjunto de datos de TCGA Pan-Cancer Atlas Studies en cBioPortal for Cancer Genomics.

DISCUSIÓN

1. Características fenotípicas de las líneas de CPNM estudiadas

Mediante qPCR y Western Blot se ha analizado la expresión basal de marcadores epiteliales y mesenquimales en las líneas de CPNM establecidas A549, H441, H1395 y PC9 (Fig. 10). Los resultados obtenidos nos han permitido clasificar la línea A549 como una línea mesenquimal, ya que expresa niveles elevados de vimentina, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico, mientras que las otras tres líneas celulares son líneas epiteliales que expresan E-cadherina en distintos grados, siendo las H441 las que mayor expresión de E-cadherina muestran.

Con estas mismas técnicas se ha analizado la expresión de las dos isoformas de eIF5A, eIF5A1 y eIF5A2. En general, las cuatro líneas muestran mayor expresión de eIF5A1 que de eIF5A2, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico, siendo las líneas PC9 y H1395 las que mayor expresión de eIF5A1 presentan. Respecto a eIF5A2, las líneas que más lo expresan son también PC9 y H1395, seguidas de A549.

En los experimentos llevados a cabo en este proyecto de tesis, por limitaciones de tiempo, se ha trabajado únicamente con las líneas A549, como modelo de una línea mesenquimal que expresa eIF5A2, y la línea H1395, como modelo de una línea epitelial que expresa eIF5A2.

2. Inhibición génica de eIF5A

Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia codificante de *EIF5A2* comparte un 80% de identidad con el ADNc de *EIF5A1*, y sus proteínas son un 84% idénticas y un 94% similares (Jenkins, Hååg, and Johansson 2001), por lo que es difícil inhibir de manera específica cada una de las dos isoformas, sin interferir en la expresión de la otra. Con este fin, se realizó un estudio informático de las secuencias de ambas isoformas, y se buscaron las zonas con menor homología de bases entre ellas, para diseñar secuencias de oligonucleótidos pequeños, de 19 pares de bases, que sirviesen de ARNpi específicos para cada una de las isoformas.

Estos oligonucleótidos se testaron en las líneas A549 y H1395 mediante qPCR y Western Blot para analizar si la inhibición, tanto a nivel de expresión de mensajero, como a nivel proteico, era efectiva.

Los resultados obtenidos (Fig. 13) mostraron que los oligos diseñados eran específicos para el silenciamiento de cada una de las isoformas de forma específica, ya que con el uso de cada uno, sólo se observaba la disminución de los niveles de mensajero y proteicos de la isoforma diana. También se observó que existe una

regulación entre ambas isoformas de eIF5A, ya que al silenciar eIF5A1 aumenta la expresión de mensajero y proteica de eIF5A2, lo que no ocurre al contrario. Por lo tanto, la inhibición dirigida de *EIF5A1* podría tener efectos secundarios derivados de la sobreproducción de *EIF5A2* con los que debe tenerse cuidado.

Diversos trabajos han mostrado que eIF5A es esencial para distintos procesos celulares como la fase de elongación y terminación de la traducción (Schuller *et al.* 2017), el recambio de ARNm, el ciclo celular, la proliferación (M.-H. Park *et al.* 2010), la activación del factor HIF-1 α en condiciones de hipoxia (Tariq *et al.* 2016) o la autofagia (H. Zhang *et al.* 2019). La regulación entre ambas isoformas observada en este trabajo, que no se había observado en publicaciones relacionadas con eIF5A, refuerza la esencialidad de eIF5A1 para el correcto funcionamiento de las células, ya que eIF5A2 aumenta para suplir su inhibición y podría ser que, por homología de secuencia y conformación, realizase las funciones que habitualmente realiza eIF5A1 en las células.

Sin embargo, los resultados de los estudios de migración y viabilidad realizados (Figs. 14 y 16) en estas mismas células mostraron que la inhibición de eIF5A2 provoca un mayor descenso tanto de la viabilidad, como de la migración celular. Además, al silenciar eIF5A1 la viabilidad celular aumenta tanto en la línea A549 como en H1395, y también aumenta la migración en células A549, fenómeno que puede deberse al aumento de la expresión de eIF5A2 que tiene lugar al silenciar eIF5A1. Por el contrario, al sobreexpresar eIF5A2 de forma estable en la línea H1395-eIF5A2 encontramos el efecto contrario, ya que los resultados de estos mismos ensayos (Fig. 22 y 24) muestran un aumento tanto de la viabilidad como de la migración en las células en las que eIF5A2 está sobreexpresado. Esto coincide con los resultados publicados por otros autores, en los que se muestra la relación entre eIF5A2 y un aumento de la migración y la agresividad de varios tipos de cáncer, como el CPNM (C. Chen *et al.* 2018), gástrico (Meng *et al.* 2015), ovárico (Zhao *et al.* 2021), hepático (Tang *et al.* 2010) o de próstata (Zhong *et al.* 2020). Además, cabe destacar que tanto en los experimentos de viabilidad como de migración, en las muestras que se silencia eIF5A1 se produce un ligero aumento de la viabilidad y también de la migración respecto a las células control, por lo que el aumento de eIF5A2 observado en estas células podría ser el responsable de este incremento. Estos resultados sugieren que eIF5A2 tiene mayor capacidad para promover la proliferación y migración celular respecto a eIF5A1. Cuando se silencia *EIF5A2*, los niveles de expresión de eIF5A1 presente en las células es suficiente para que la célula, aunque se limiten algunas funciones, continúe siendo viable, por lo que no sería necesario que aumente la expresión de eIF5A1.

El descenso observado en la motilidad de las células al silenciar *EIF5A2* podría deberse a la desorganización del citoesqueleto de actina observada (Fig. 19), en las que

los filamentos de actina se destruyen y se acumula en nudos. El citoesqueleto de actina y su correcta organización es imprescindible para el establecimiento de la polaridad celular, la morfogénesis, la adhesión y la migración celular (T. M. Svitkina 2018; T. Svitkina 2018), así como para la determinación de la capacidad invasiva de las células cancerosas durante la metástasis (Fife, McCarroll, and Kavallaris 2014). Se ha visto que eIF5A2 promueve la formación de fibras de estrés y lamelipodios a través de la activación de las GTPasas RhoA y Rac1 (Tang *et al.* 2010). Estas estructuras son necesarias para la adquisición de un fenotipo más mesenquimal y el desarrollo de la EMT y la invasividad celular, por lo que la falta de eIF5A2, y por tanto de la actividad de estas GTPasas provocaría un descenso de la motilidad celular, tal y como se observa en los resultados presentados en este proyecto de tesis.

Por último, se analizó la expresión de algunos marcadores de fenotipo mesenquimal y epitelial, así como algunas proteínas y factores de transcripción implicados en la EMT, en las células con *EIF5A1* y *EIF5A2* silenciado con el fin de estudiar su influencia en la promoción de la EMT (Figs. 17 y 18). En estos ensayos pudimos comprobar que la inhibición de eIF5A impide a las células la adquisición de un fenotipo mesenquimal completo característico de la EMT, ya que causa un aumento en la expresión de la E-cadherina. Sin embargo, los resultados obtenidos al estudiar las proteínas FHOD1, p85, MTA1, ezrina y SNAI1 no fueron concluyentes, ya que en cada una de las líneas celulares estudiadas se observa indistintamente el aumento y el descenso de estas proteínas, por lo que se pensó que las células necesitaban un estímulo adicional para activar la EMT y observar mejor los efectos del silenciamiento de cada isoforma. De esta forma, se trataron las células con TGFβ1, cuyos resultados se discuten en las secciones siguientes.

3. Efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre la expresión de eIF5A

TGFβ1 es una citoquina que, entre otras funciones, estimula el programa de EMT y la metástasis en células tumorales (Hao, Baker, and Dijke 2019; J. Xu, Lamouille, and Derynck 2009). Al tratar con TGFβ1 las células A549 y H1395 (Fig. 13) observamos un incremento de la expresión, tanto del ARNm de *EIF5A2* como de la proteína eIF5A2, respecto a las células sin tratamiento. Además, el incremento de eIF5A2 que se observa al silenciar eIF5A1 en las células es aún mayor en presencia de TGFβ1, por lo que esta citoquina podría estar regulando tanto la expresión de eIF5A2 como su actividad, ya que

en presencia de TGF β 1 también aumenta la expresión de eIF5A2 hipusinado y, por tanto, activo.

Esta observación se confirmó en los experimentos realizados con las líneas celulares establecidas en el laboratorio que expresan de manera constitutiva el plásmido vacío (H1395-EV) y eIF5A2 (H1395-eIF5A2). Al tratar con TGF β 1 a distintos tiempos en las células que sobreexpresan eIF5A2 (Fig. 25), se observó un aumento progresivo de la expresión de eIF5A2, tanto a nivel de ARNm como proteico, con el tiempo de exposición con TGF β 1. Además, también aumenta la expresión de eIF5A2-Hip hasta alcanzar un pico de expresión a las 24 y 48 h de tratamiento. Estos resultados coinciden con los mostrados en otro estudio en el cual TGF β también induce la expresión de eIF5A2 en las líneas de cáncer de ovario SKOV3 y OVCA8 (Zhao *et al.* 2021).

Además, los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia (Fig. 31) muestran que el tratamiento con TGF β 1 induce un cambio en la localización de eIF5A2 en el citoplasma, localizándose en la membrana celular y lamelipodios a las 72 h de tratamiento. Futuros experimentos de colocalización utilizando el anticuerpo contra paxilina nos ayudarán a confirmar la localización de eIF5A2 en las adhesiones focales.

También a las 72 h de tratamiento se observa mayor expresión de eIF5A2 mediante *Western Blot* y qPCR. Además, como se muestra en Figura 19, tanto en A549 como en H1395, al tratar las células con TGF β 1 se observa un aumento de las fibras de actina en el citoplasma y la formación de numerosos filopodios, necesarios para un aumento de la invasividad celular, como ya se ha mencionado. Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que la expresión y localización de eIF5A2 es dependiente de la señalización por TGF β 1, y el tratamiento con esta citoquina promovería la localización de eIF5A2 a la membrana celular y prolongaciones celulares.

Por último, el tratamiento con TGF β 1 también aumenta la migración en las líneas establecidas (Fig. 24) y en células H1395 en los experimentos de silenciamiento con *EIF5A1pi* y *EIF5A2pi* (Fig. 16), como era de esperar dado su papel en la inducción de la EMT.

En los ensayos de viabilidad realizados, tanto en los experimentos de silenciamiento (Fig. 14) como los realizados con las líneas establecidas (Fig. 22), se observa una disminución de la viabilidad al tratar las células con TGF β 1, más notablemente en el caso de las A549. El descenso en la migración en estas células podría relacionarse con esta disminución de la viabilidad. TGF β 1 es un factor con múltiples funciones en las células, por lo que además del estímulo de la EMT, podríamos estar observando su papel en la inhibición del ciclo celular. Esto se produce gracias al papel regulador que tiene TGF β 1 sobre las ciclinas G1 y las quinasas que se asocian a ellas mediante la inducción de proteínas como p21 o p53 (Datto *et al.* 1995; Samarakoon *et al.* 2019).

4. Papel de eIF5A2 en la señalización por TGFβ1

Con el fin de elucidar el papel específico que eIF5A2 puede estar llevando a cabo en la señalización mediada por TGFβ1, y descubrir si efectivamente interviene en la traducción de proteínas específicas, se estudió mediante *Western Blot* y qPCR la expresión de marcadores específicos de fenotipo mesenquimal y epitelial, como fibronectina, E-cadherina, vimentina y N-cadherina, y también otras proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina como FHOD1 y ezrina, y la EMT, como p85, MTA1 y SNAI1. Se seleccionaron estas proteínas, además por el importante papel que cumplen en el proceso de EMT, porque todas ellas, excepto la vimentina, contienen motivos de prolinas consecutivas (secuencias mostradas en el anexo, Fig. S2), ya sea de tres o más prolinas seguidas (Gutierrez *et al.* 2013) o algunos de los motivos con dos prolinas identificados por Pelechano & Alepuz (Pelechano and Alepuz 2017). Por tanto, en estas proteínas sería necesaria la presencia de eIF5A para facilitar el proceso de elongación de la traducción. Se analizaron estas proteínas tanto al silenciar *EIF5A1* y *EIF5A2* y tratar las células con TGFβ1 durante 48 h; como en las líneas H1395-EV y H1395-eIF5A2 tratadas con TGFβ1 hasta 72 h.

Respecto a las proteínas empleadas como marcadores de los fenotipos epitelial y mesenquimal, los resultados en los experimentos de silenciamiento (Fig. 17) muestran que, coincidiendo con lo esperado, en la línea A549 aumentan los niveles proteicos de E-cadherina y disminuyen los de vimentina, mientras que en la línea H1395 disminuyen tanto los de fibronectina como los de N-cadherina. Curiosamente, en la línea H1395 al silenciar eIF5A1, la expresión de ARNm de CDH1 y proteica de E-cadherina aumenta, mientras que, al silenciar *EIF5A2* la expresión de E-cadherina disminuye, tanto a nivel proteico como de ARNm. El hecho de que en cada una de las líneas los marcadores de comporten de forma diferente, pone de manifiesto que no se está consiguiendo una EMT completa en estas líneas, y quizá sería necesario probar otros tiempos de tratamiento con TGFβ1 para activar completamente el programa de EMT.

Estos resultados contrastan con otros estudios publicados en los que el silenciamiento de *EIF5A2* sí provoca la inhibición completa del programa de EMT, lo que conlleva al aumento de los niveles de E-cadherina y β-catenina y la disminución de vimentina y N-cadherina (C. Chen *et al.* 2018; Sun *et al.* 2018; Wei *et al.* 2014; Y. Zheng *et al.* 2021). Sin embargo, de todos estos estudios, solo uno se ha llevado a cabo en CPNM, y aun así, las líneas celulares empleadas son distintas, con las mutaciones propias de cada línea y la variabilidad de resultados que eso conlleva. Además, en ninguno de ellos se ha comprobado que la inhibición de eIF5A2 esté siendo específica de esa isoforma y no esté afectando a los niveles de eIF5A1, por lo que algunos

resultados de los observados en estos trabajos podrían ser producidos por el silenciamiento *off target* de *EIF5A1*.

Además, es necesario destacar que en ambas líneas se produce un aumento de la expresión de ciertos ARNm como *FN1* y *CDH2*, y también de *VIM* en A549 al inhibir eIF5A2, mientras que su expresión proteica desciende o no se ve afectada, lo que podría indicar una posible regulación a nivel transcripcional mediada por eIF5A2 para paliar los efectos que el silenciamiento pueda estar provocando sobre la traducción de estas proteínas, ya que son necesarias para la adquisición de un fenotipo más mesenquimal y por tanto el desarrollo de la EMT.

Los resultados en las líneas H1395-EV y H1395-eIF5A2 (Fig. 26) muestran que la sobreexpresión de eIF5A2 induce la EMT, al mostrar mayores niveles de fibronectina y N-cadherina y menores de E-cadherina la línea H1395-eIF5A2 respecto a la línea H1395-EV, coincidiendo con los resultados observados en otros estudios en los que la sobreexpresión de eIF5A2 también causaba estas mismas variaciones en la expresión de estas proteínas (Bao *et al.* 2015; Y. Li *et al.* 2014; Zhu *et al.* 2012). Además, el tratamiento con TGF β 1 a distintos tiempos muestra que mientras para la fibronectina sí es efectivo un tratamiento a tiempos largos, con picos de expresión a las 48 h y 72 h, tanto para la E-cadherina como para la N-cadherina, un tiempo corto de tratamiento es más efectivo, ya que es a las 8 h cuando se observa el mayor aumento de expresión de N-cadherina y la mayor inhibición de E-cadherina, confirmando así que para los experimentos de inhibición habría sido interesante testar otros tiempos de tratamiento con TGF β 1 para observar el proceso completo de EMT.

Respecto a las proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina como FHOD1 y ezrina, los resultados de los experimentos de silenciamiento (Fig. 18) han puesto de manifiesto que eIF5A2 es necesario para su correcta traducción bajo la señalización por TGF β 1, ya que al silenciarlo, desciende drásticamente su expresión proteica en ambas líneas celulares. Curiosamente, al silenciar *EIF5A1* se produce un ligero aumento de la expresión proteica de ezrina en ambas líneas y FHOD1 en H1395, lo que puede estar produciéndose por el aumento de la expresión de eIF5A2 observado en estas muestras. En la línea A549 el descenso observado no va acompañado de una disminución tan acuciada de los niveles de ARNm de estas proteínas, por lo que la regulación se estaría dando a nivel traduccional. Al sobreexpresar eIF5A2 y tratar las células con TGF β 1 (Fig. 27), hemos observado que a tiempos largos de tratamiento hay una mayor expresión proteica de FHOD1 y ezrina, mientras que los niveles de ARNm apenas varían, obteniendo así un resultado complementario a lo observado al silenciar eIF5A2.

Como se ha indicado en la introducción, las forminas son proteínas necesarias para la correcta polimerización de la actina (Chesarone, DuPage, and Goode 2010), y otros procesos como la formación del anillo durante la citocinesis en el último paso de la mitosis (Bohnert *et al.* 2013). En concreto, la formina FHOD1 parece estar regulada positivamente durante la EMT, donde contribuye a la formación del huso y la organización de la actina F mesenquimal, favoreciendo así a la migración celular y la invasión. Además, la desregulación de FHOD1 reduce la capacidad de las células que han entrado en el proceso de la EMT de formar invadopodios y degradar la matriz celular (Gardberg *et al.* 2013). Las forminas se han podido relacionar previamente con eIF5A, demostrando que el factor es necesario para la traducción de forminas con motivos poliprolina como la Bni1 en levaduras o la mDia en mamíferos (Muñoz-Soriano *et al.* 2017). Por su parte, la ezrina está implicada en procesos de morfogénesis, tráfico vesicular, adhesión, migración celular y también en el desarrollo del cáncer (Arpin *et al.* 2011; Clucas and Valderrama 2014). En concreto, diversos estudios han podido relacionar la ezrina con el proceso de EMT, indicando que la inhibición génica de la ezrina conlleva a una menor tasa de proliferación, migración e invasividad (LI *et al.* 2021; Xie *et al.* 2009; M. J. Chen *et al.* 2014). También se ha relacionado específicamente con la señalización por TGF β , confirmando que su silenciamiento disminuye la expresión de elementos clave de la ruta de TGF β como p-Smad2/3 (Xie *et al.* 2009) y también que tras la inducción de la EMT por TGF β , la ezrina interacciona con la podocalyxina (M. J. Chen *et al.* 2014), promoviendo la extravasación celular tras su contacto (Fröse *et al.* 2018).

La inhibición observada en la expresión de FHOD1 y ezrina al silenciar eIF5A2 también la observamos en la expresión de las proteínas p85, MTA1 y SNAI1 (Fig. 18), involucradas en el desarrollo de la EMT. En estas proteínas también observamos que los niveles correspondientes de ARNm no descienden de manera significativa al silenciar *EIF5A2*, si no que apenas varían o incluso aumentan, como ocurre en el caso de *SNAI1*, lo que de nuevo pone de manifiesto el importante papel de la regulación traduccional mediante eIF5A2 de estas proteínas. Además al analizar la expresión de estas proteínas al silenciar *EIF5A1* se ha observado un aumento de la expresión proteica de ezrina y p85 en ambas líneas celulares, especialmente en presencia de TGF β 1. Esto también nos ayuda a confirmar el papel de eIF5A2 en la traducción de estas proteínas, ya que en estas condiciones, la expresión de eIF5A2 aumenta, como se muestra en la Figura 13, y esto podría relacionarse con el aumento de la expresión de ezrina y p85.

El único caso en el que se provoca un mayor descenso al inhibir eIF5A1 que con eIF5A2 es en la proteína MTA1. Sin embargo, esto se contradice con lo observado al

sobreexpresar eIF5A2 (Fig. 27), donde se observa que la expresión de MTA1 es mayor en las células H1395-eIF5A2 en todos los tiempos de inducción con TGF β 1. Este resultado sí va acorde a los estudios publicados por otros autores, en los que la sobreexpresión de eIF5A2 promueve la invasividad del cáncer al aumentar la expresión de MTA1 y c-myc (Meng *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2012).

Respecto a p85 y SNAI1, la sobreexpresión de eIF5A2 (Fig. 27) induce una mayor expresión de p85 a tiempos cortos (4 h y 8 h) de tratamiento con TGF β 1, mientras que en el caso de SNAI1, el aumento de la expresión es más notable a tiempos largos de tratamiento (24 h, 48 h y 72 h). Este aumento de la expresión proteica únicamente va acompañado de un aumento de la expresión de ARNm en el caso de *SNAI1*, que aumenta con el tratamiento con TGF β 1, aunque su expresión es mayor en las células H1395-EV. A lo largo del apartado dedicado al proceso de EMT en la introducción, ya se ha destacado el importante papel que juega la familia transcripcional SNAIL en la regulación de este proceso, por lo que es destacable que este con este trabajo se haya conseguido relacionar la regulación a nivel traduccional mediante eIF5A2 con SNAI1, ya que eso refuerza que eIF5A2 pueda ser un marcador de mal pronóstico en cáncer. Finalmente, la ruta de señalización PI3K/AKT/mTor es una de las rutas más importantes en la regulación del cáncer, controlando mecanismos de crecimiento, movilidad, metabolismo celular, supervivencia y angiogenesis (J. Yang *et al.* 2019), por lo que conocer el mecanismo regulador de cualquiera de sus componentes es importante para su uso como posible diana terapéutica. En concreto, p85 es la subunidad reguladora α de PI3K, que junto a la subunidad catalítica p110, conforman la forma activa de PI3K. Concretamente, la sobreexpresión de p85 se ha relacionado con un menor ratio de supervivencia y menor tiempo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama (Zhou *et al.* 2014) y además su fosforilación es clave en la resistencia al tratamiento con inhibidores de PI3K (Han *et al.* 2018).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los resultados refuerzan la relación existente entre la sobreexpresión de eIF5A2 y el proceso de EMT inducido por TGF β 1, a través de su implicación en la regulación traduccional de proteínas como la formina FHOD1, ezrina, p85, MTA1 y SNAI1, todas ellas muy importantes en el desarrollo de una EMT completa.

5. La inhibición de eIF5A2 mediante GC7 como posible diana terapéutica

Como ya se ha mencionado en la introducción, la activación de eIF5A puede inhibirse mediante compuestos específicos que bloquean la actividad de las enzimas de la ruta de hipusinación DHS y DOHH. En este trabajo, hemos utilizado el compuesto GC7, que es un inhibidor competitivo de la DHS.

Existen otros compuestos para inhibir la activación de eIF5A, tal y como describen en su revisión Tauc *et al.* (Tauc *et al.* 2021). En nuestro laboratorio hemos realizado pruebas preeliminares con los compuestos Ciclopirox (CPX) y deferiprona (DFO), ambos inhibidores de la enzima DOHH. Al emplear cantidades mínimas de estos compuestos descritas en la bibliografía en nuestros experimentos de inhibición con las células H1395-EV y H1395-eIF5A2, el efecto nocivo sobre las células era muy grande, inhibiendo totalmente el crecimiento y la proliferación celular, por lo que estos compuestos deben estar afectando a más dianas que eIF5A, y al no poder realizar los experimentos en las mismas condiciones de crecimiento que con GC7, no se muestran los resultados previos en este trabajo.

Los resultados obtenidos muestran que la adición de GC7 inhibe tanto la viabilidad (Fig. 22) como la migración celular (Fig. 24). En ambos casos el efecto es mayor en la línea H1395-EV, ya que mientras el efecto sobre H1395-eIF5A2 puede verse paliado por la alta expresión de eIF5A2 que hay y no se consigue inhibir todo el factor activo, en la línea H1395-EV se expresan bajos niveles de eIF5A1 y eIF5A2 en comparación con H1395-eIF5A2, por lo que sí se puede estar consiguiendo una inhibición completa de eIF5A y por tanto que el efecto sea mayor.

En concreto, los resultados de los experimentos con GC7 y TGF β 1 en las línea H1395-eIF5A2 muestran que la inhibición proteica de eIF5A y eIF5A hipusinado es efectiva con la adición de GC7, mientras que con TGF β 1 se estimula su expresión. Respecto a la expresión de ARNm de ambas isoformas, cabe destacar que se observa un aumento de la expresión de *EIF5A2* al tratar las células con GC7 a 24 y 72 h, sólo o en combinación con TGF β 1, lo que podría indicar que se está produciendo una regulación a nivel transcripcional para suplir la falta de eIF5A2 activo que hay en la célula (Fig. 28). La adición de GC7 en el cultivo celular también afecta a la expresión proteica de los marcadores de fenotipo fibronectina, E-cadherina y N-cadherina (Fig. 29) y en las proteínas FHOD1, p85 y SNAI1 (Fig. 30). En el caso de los ARNm de *CDH1*, *CDH2*, *FHOD1* y *SNAI1* se produce un aumento de sus niveles en algunos tiempos del tratamiento con GC7. Además, en el experimento de microscopia de fluorescencia realizado con estas células H1395-eIF5A2, tratadas con GC7 y TGF β 1 (Fig. 31), hemos

podido observar que el tratamiento con GC7 durante 24 h provoca una disminución de los niveles de eIF5A2 localizado en la membrana citoplasmática, lo que en conjunto, ayuda a confirmar nuestra hipótesis de que estas proteínas pueden ser dianas traduccionales de eIF5A2, traduciéndose en el lugar en el que van a emplearse y que, al inactivar su actividad mediante la adición de GC7 se inhibiría su traducción. Por tanto, es necesaria una regulación a nivel transcripcional para aumentar los niveles de mRNA de estas proteínas para favorecer su expresión proteica.

Los resultados obtenidos en este trabajo ayudan a esclarecer el mecanismo molecular por el cual eIF5A2 tiene un papel en el desarrollo del cáncer. Tanto el silenciamiento génico de *EIF5A2* como su inhibición farmacológica con GC7 tienen un efecto inhibitorio en la EMT, la migración y la viabilidad celular, confirmando que la inhibición de eIF5A2 y su actividad, en combinación con otros fármacos, podría ser una nueva vía terapéutica que debe explorarse.

6. Modelos experimentales *in vivo* para el estudio de la función de eIF5A

Diversos trabajos han relacionado la sobreexpresión de eIF5A2 con un peor pronóstico y menor tasa de supervivencia en cánceres como el CPNM o el gástrico, entre otros (W. Chen *et al.* 2009; He *et al.* 2011; Meng *et al.* 2015; X. Zheng *et al.* 2020), por lo que comprender el mecanismo biológico subyacente que hace que los cánceres en los que se sobreexpresa eIF5A2 sean más agresivos es de interés para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

En este trabajo se han empleado modelos murinos para el estudio de la capacidad formadora de tumores y metastásica de eIF5A2, y también se han empleado muestras de tejido sano y tumoral de pacientes con CPNM para estudiar la expresión y localización de eIF5A2 y su posible correlación con el marcador de proliferación Ki67.

Los experimentos en ratones inmunodeprimidos NSG (Fig. 34A y B) han confirmado la capacidad iniciadora de tumores de las líneas estables H1395-EV y H1395-eIF5A2 generadas en el laboratorio y muestran que el número de células inyectado es importante para el desarrollo tumoral, ya que a mayor número de células, mayor velocidad de crecimiento. Además, hemos podido comprobar al inyectar 500 células que las células H1395-eIF5A2 generan un tumor más grande más rápido que las células H1395-EV, aunque el volumen final sea el mismo (Fig. 34C), lo que confirma que las células H1395-eIF5A2 tienen una mayor capacidad proliferativa, como se ha observado también en los ensayos de MTS realizados (Fig.22).

También cabe destacar que los ratones inyectados con H1395-eIF5A2 tienen una menor tasa de supervivencia, ya que en dos de los tres experimentos realizados, varios ratones con estas células no se han podido incluir en el estudio por una muerte prematura. Esto coincide con lo observado en los estudios mencionados anteriormente, en los que la sobreexpresión de eIF5A2 se correlaciona con un peor pronóstico y menor tasa de supervivencia. Esta menor tasa de supervivencia podría estar relacionada con la mayor capacidad invasiva y metastática de las células H1395-eIF5A2, como puede observarse en los resultados de inmunofluorescencia observados en la figura 34D. Esta mayor capacidad invasiva *in vivo* coincide con lo publicado por Wei *et al.*, que también observaron un mayor número de nódulos tumorales en los pulmones de los ratones inyectados con células que sobreexpresaban eIF5A2 (Wei *et al.* 2014). Esta inmunofluorescencia se ha realizado en tejido pulmonar, por lo que también sería interesante observar otros tejidos como el hígado o hueso, otras de las dianas principales de las metástasis ocasionadas por cáncer de pulmón (Riihimäki *et al.* 2014), para comprobar si efectivamente la capacidad invasiva de estas células es mayor al sobreexpresar eIF5A2.

Por otro lado, los resultados de inmunohistoquímica en las muestras de pacientes (Fig. 35) mostraron que eIF5A2 se puede localizar tanto en el núcleo, como fuera de él, ya sea de forma perinuclear o en el citoplasma, lo que coincide con las imágenes de microscopía de fluorescencia realizadas en las células H1395-EV y H1395-eIF5A2, donde también observamos las distintas expresiones de eIF5A2. De las muestras observadas, es en la LF15 donde se relacionan los niveles de expresión más elevados de eIF5A2, cuya localización abarca la totalidad de la célula, con una mayor intensidad del marcador de proliferación Ki67 (Hitchcock 1991). Como se ha mencionado anteriormente, Ki67 se ha descrito como un indicador de mal pronóstico en CPNM (Martin *et al.* 2004), lo que coincide con lo observado en esta muestra, ya que la supervivencia libre de enfermedad de este paciente es la segunda más baja, inferior al año y medio. Los resultados de la matriz de correlación entre Ki67 y eIF5A2 (Fig. 36) muestran que existe una ligera relación positiva entre ellos, aunque los datos no son significativos debido al pequeño número de muestras analizadas. Además, la curva de supervivencia (Fig. 37) realizada muestra que una mayor expresión de eIF5A2 se asocia con una menor tasa de supervivencia de los pacientes, confirmando así el papel de eIF5A2 como marcador de mal pronóstico. Sería necesario ampliar el tamaño muestral para poder establecer una correlación significativa, ya que en este trabajo únicamente se han incluido 8 muestras. También sería interesante correlacionar la expresión de eIF5A2 con algún marcador mesenquimal para ver si se asocia con células con mayor capacidad de migración e invasión.

7. Relación de eIF5A2 con la maquinaria de traducción

Actualmente, los estudios funcionales realizados para descubrir la implicación de eIF5A en el proceso de traducción de proteínas, se han realizado con la isoforma eIF5A1 (Gutierrez *et al.* 2013; Saini *et al.* 2009; Shin *et al.* 2017), ya que es la mayoría en las células y la que primero se descubrió. Por tanto, no hay estudios que relacionen específicamente eIF5A2 con la maquinaria traduccional, y la mayor parte de lo que se conoce sobre las funciones de esta isoforma, se asume por su homología con eIF5A1. De hecho, se ha relacionado más a eIF5A2 con la transcripción que con la síntesis de proteínas (Farache, Liu, and Lee 2022). Es por este motivo, que en el laboratorio se realizaron varios experimentos para relacionar de forma concreta eIF5A2 con el proceso de traducción.

En el primero de ellos, se han analizado las diferencias en los perfiles polisomales generados por las células H1395-EV y H1395-eIF5A2 (Fig. 23), y se ha observado un aumento de la cantidad de polisomas en las células que sobreexpresan eIF5A2, por lo que este factor estaría favoreciendo la traducción de proteínas. En un estudio llevado a cabo en la línea de cáncer de ovario UACC-1598, se observó un patrón de expresión diferente de los ARNm de *EIF5A1* y *EIF5A2* asociados a polisomas, en el cual *EIF5A1* estaba presente tanto en monosomas como en polisomas, mientras que *EIF5A2* estaba mayormente relacionado con los monosomas (Clement *et al.* 2006). Por tanto, estos resultados son novedosos en esta área, y el trabajo resulta de interés extra al ser capaz de relacionar la sobreexpresión de eIF5A2 con una mayor cantidad de polisomas en las células en cáncer de pulmón, y también para comprobar que eIF5A2 está presente en estos polisomas más pesados, como se observa en los resultados de *Western Blot*. Experimentos futuros de perfiles polisomales con células tratadas con TGF β 1 nos permitirán comprobar si efectivamente eIF5A2 es un factor implicado en la síntesis de proteínas aguas abajo en la señalización por TGF β 1.

En el segundo experimento llevado a cabo, se ha empleado el tratamiento con puromicina como estrategia para detectar mediante inmunofluorescencia puntos de traducción activa en la célula (Starck *et al.* 2004) (Fig. 24), y ver si estos puntos colocalizan tanto con eIF5A2 como con la hipusina, detectando así eIF5A2 activo. Los resultados mostraron que en las células H1395-eIF5A2 se produce un aumento de la cantidad de puromicina detectada, por lo que existe una mayor actividad traduccional. Esto concuerda con los resultados mencionados de los polisomas, en los que también hay una mayor cantidad de polisomas en estas células. Además, la expresión también aumentaba al tratarse las células con TGF β 1, confirmando que esta citoquina aumenta la expresión y la actividad de eIF5A2, mientras que al añadir GC7, la expresión

disminuye, por lo que la inhibición de eIF5A2 se relaciona con una menor actividad traduccional. Además, eIF5A2 y la hipusina colocalizan con la puromicina en puntos de la membrana celular y los filopodios celulares, sobre todo en las células tratadas con TGF β 1, lo que coincide con los resultados mostrados en la Figura 22.

8. Modelo de acción y perspectivas futuras

En conjunto, este trabajo pone de manifiesto el papel que tiene eIF5A2 en la regulación de la expresión de eIF5A presente en las células para su correcto funcionamiento y confirma la relación entre eIF5A2 y la EMT inducida por la señalización por TGF β 1.

La hipótesis de partida de este trabajo de investigación, resumida en la Figura 38 y discutida a lo largo de este manuscrito, es que eIF5A2 se hipusina en el interior del núcleo (como ya se ha mostrado por otros autores), y gracias a la estimulación mediante TGF β 1 sale al citoplasma y la membrana celular, donde participa en la síntesis de proteínas con motivos poliprolina cuya actividad es requerida en la progresión de la EMT y la organización del citoesqueleto de actina, como pueden ser la ezrina, FHOD1, p85, MTA1 y SNAI1. Su sobreexpresión causa un aumento de la proliferación, migración e invasión celular. Que la actividad de eIF5A2 pueda inhibirse de forma específica con inhibidores de la hipusinación, hace que sea de interés ya que eIF5A2 podría emplearse como un marcador de mal pronóstico en cáncer de pulmón (y otros cánceres donde esté activo) y su inhibición podría ser de utilidad para prevenir la metástasis en cánceres en sus primeros estadios.

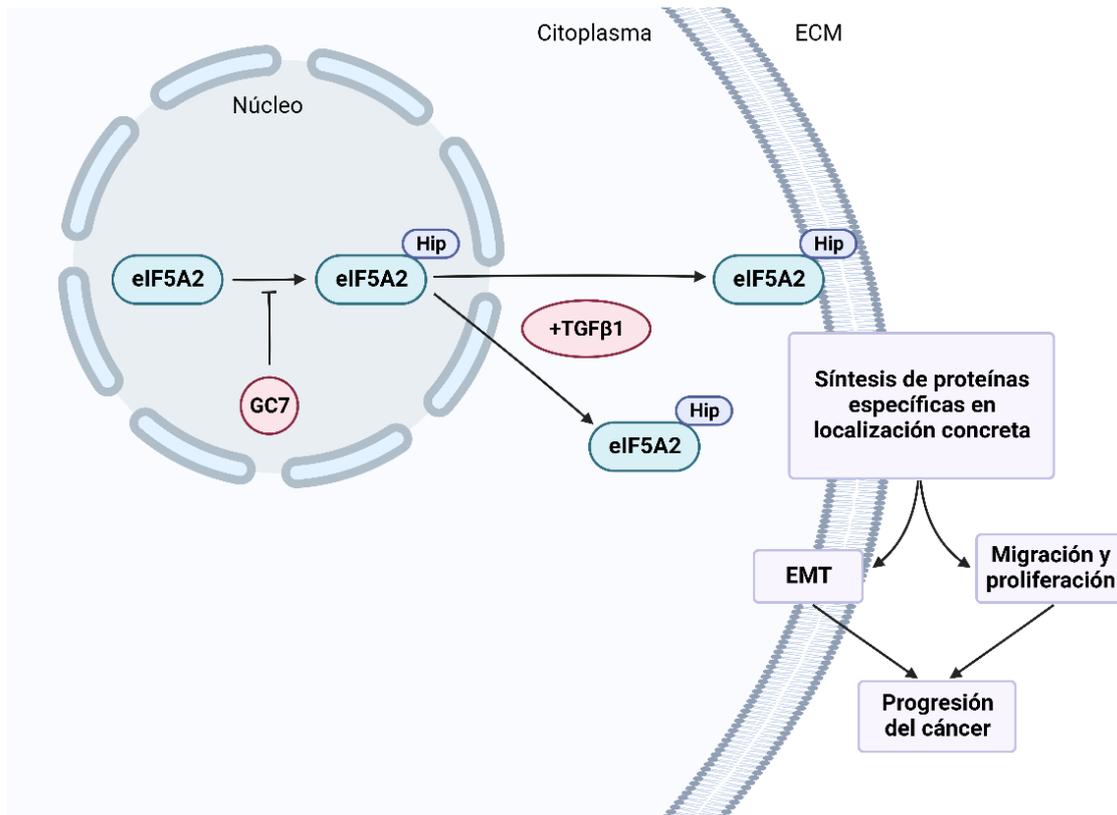


Figura 38. Modelo de acción planteado para eIF5A2. Creado con BioRender.com.

Puesto que nuestros resultados muestran que eIF5A2 está relacionado con la maquinaria de síntesis de proteínas, futuros trabajos de proteómica y de química de *Click-it* (Belda-Palazón, Ferrando, and Farràs 2016) podrán ayudarnos a identificar las dianas en cuya traducción está implicado de forma específica eIF5A2. Además, actualmente en el laboratorio contamos con una colección de organoides derivados de las muestras de biopsias de pacientes incluidos en los experimentos de TMA. Cultivar estos organoides y conseguir derivar líneas estables celulares de estos pacientes puede resultar muy interesante para verificar los resultados obtenidos en este trabajo y poder testar además del GC7, otros inhibidores de eIF5A.

Estas células, una vez caracterizadas mediante citometría, *Western Blot* y qPCR, también pueden inyectarse en ratones para estudiar el crecimiento tumoral de líneas que expresan eIF5A2 y otros marcadores de célula madre en distintos grados, y ver que combinación puede ser la más agresiva, creando así un posible panel de marcadores de peor pronóstico en cáncer. Esto, junto al planteamiento de nuevos experimentos realizados en ratones, para poner a punto la dosis y tiempo de tratamiento de GC7, solo o en combinación con otros inhibidores específicos de la hipusinación, nos permitirá elucidar la implicación de eIF5A2 en el proceso de metástasis celular y evaluar el papel

de GC7 como una posible diana terapéutica en aquellos cánceres en los que se encuentre sobreexpresado.

CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares de CPNM H441, H1395, PC9 y A549 se definieron como epiteliales o mesenquimales en función de la expresión ARNm y proteica de E-cadherina y vimentina. Las líneas celulares H441, H1395 y PC9 expresan niveles elevados de E-cadherina y muy bajos de vimentina por lo que las hemos definido como líneas celulares epiteliales. La línea celular A549 expresa niveles elevados de vimentina y muy bajos de E-cadherina por lo que la hemos definido como mesenquimales. Las líneas celulares con mayor nivel endógeno de eIF5A2 y eIF5A2 hipusinado (activo) son PC9 y H1395, seguido de la línea celular A549. No se detectó expresión de eIF5A2 en la línea celular H441.
2. Al inhibir genéticamente *EIF5A1* en las líneas A549 y H1395 se observa un aumento en los niveles de ARNm y proteína de eIF5A2, pero no al revés, lo que sugiere una compensación unidireccional entre ambos homólogos.
3. La sobreexpresión de eIF5A2 aumenta la viabilidad e induce la migración celular. Al contrario, el silenciamiento de *EIF5A2* y el tratamiento con el inhibidor de hipusinación GC7 disminuyen la viabilidad y reducen la migración celular.
4. La depleción de eIF5A1 y eIF5A2 induce a la desorganización del citoesqueleto de actina, siendo esta alteración más dramática en las células depletadas de eIF5A2, provocando la rotura de los filamentos de actina y su acumulación en nudos. Por el contrario, la sobreexpresión de eIF5A2 induce a la formación de filopodios en el citoesqueleto de actina.
5. La expresión de eIF5A2 y eIF5A2 hipusinado (activo) se induce al añadir TGF β 1. Este resultado sugiere que eIF5A2 es un mediador de la señalización por TGF β 1 y por tanto podría promover la EMT, la migración y la invasión celular en respuesta a TGF β 1. Cabe destacar que la sobreexpresión de eIF5A2 se asoció con la inducción de proteínas implicadas en la EMT como MTA1, p85 y SNAI1 y en la organización del citoesqueleto, como FHOD1 y ezrina, que son proteínas que contienen motivos de poliprolinas.
6. TGF β 1 induce la traslocación de eIF5A2 al citoplasma y la membrana celular, en sitios de traducción activa. Lo que sugiere que puede facilitar la traducción de proteínas específicas en el mismo lugar en el que van a emplearse.

7. A diferencia de eIF5A1, eIF5A2 se ha implicado en la regulación de la transcripción, pero no en la traducción de proteínas. Los resultados presentados en los perfiles polisomales e inmunofluorescencia con puromicina muestran que la sobreexpresión de eIF5A2 está asociada con un aumento de la tasa traduccional en las células de CPNM.
8. La sobreexpresión de eIF5A2 se asocia con un mal pronóstico en pacientes con CPNM, y estos datos se correlacionaron con nuestra evidencia experimental de una mayor capacidad de invasión celular cuando se injerta en ratones inmunocomprometidos. Estos datos refuerzan que eIF5A2 es un marcador de mal pronóstico en CPNM.
9. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de eIF5A2 es una potencial diana terapéutica en cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulhussein, Ahmed A., and Heather M. Wallace. 2013. "Polyamines and Membrane Transporters." *Amino Acids* 2013 46:3 46 (3): 655–60. <https://doi.org/10.1007/S00726-013-1553-6>.
- Aksu, Metin, Sergei Trakhanov, and Dirk Görlich. 2016. "Structure of the Exportin Xpo4 in Complex with RanGTP and the Hypusine-Containing Translation Factor EIF5A." *Nature Communications* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11952>.
- "AlphaFold Protein Structure Database." n.d. Accessed July 1, 2022. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P63241>.
- Aplin, John D., Teresa Haigh, Ljilyana Vicovac, Heather J. Church, and Carolyn J.P. Jones. 1998. "Anchorage in the Developing Placenta: An Overlooked Determinant of Pregnancy Outcome?" In *Human Fertility*, 1:75–79. *Hum Fertil (Camb)*. <https://doi.org/10.1080/1464727982000198161>.
- Arpin, Monique, Dafne Chirivino, Alexandra Naba, and Ingrid Zwaenepoel. 2011. "Emerging Role for ERM Proteins in Cell Adhesion and Migration." *Cell Adhesion & Migration* 5 (2): 199. <https://doi.org/10.4161/CAM.5.2.15081>.
- Arruabarrena-Aristorena, Amaia, Amaia Zabala-Letona, and Arkaitz Carracedo. 2018. "Oil for the Cancer Engine: The Cross-Talk between Oncogenic Signaling and Polyamine Metabolism." *Science Advances* 4 (1). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAR2606/ASSET/C788EA1C-EFDF-4CF1-8CE6-858F2BCDCBF7/ASSETS/GRAPHIC/AAR2606-F3.JPEG>.
- Bachrach, Uriel. 2010. "The Early History of Polyamine Research." *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (7): 490–95. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2010.02.003>.
- Bao, Ying, Yongliang Lu, Xiang Wang, Wenming Feng, Xinrong Sun, Huihui Guo, Chengwu Tang, Xiaojing Zhang, Qilin Shi, and Hongbin Yu. 2015. "Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A2 (EIF5A2) Regulates Chemoresistance in Colorectal Cancer through Epithelial Mesenchymal Transition." *Cancer Cell International* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0250-9>.
- Barba-Aliaga, Marina, and Paula Alepuz. 2022. "Role of EIF5A in Mitochondrial Function." *International Journal of Molecular Sciences*. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms23031284>.
- Barrallo-Gimeno, Alejandro, and M Angela Nieto. 2005. "The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer." *Development* 132 (14): 3151–61. <https://doi.org/10.1242/dev.01907>.
- Bartig, Dirk, Henning Schümann, and Friedrich Klink. 1990. "The Unique Posttranslational Modification Leading to Deoxyhypusine or Hypusine Is a General

- Feature of the Archaeobacterial Kingdom.” *Systematic and Applied Microbiology* 13 (2): 112–16. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80156-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80156-6).
- Battaglia, Valentina, Christina DeStefano Shields, Tracy Murray-Stewart, and Robert A. Casero. 2014. “Polyamine Catabolism in Carcinogenesis: Potential Targets for Chemotherapy and Chemoprevention.” *Amino Acids* 46 (3): 511. <https://doi.org/10.1007/S00726-013-1529-6>.
- Belda-Palazón, Borja, Alejandro Ferrando, and Rosa Farràs. 2016. “Quantitation of Protein Translation Rate in Vivo with Bioorthogonal Click-Chemistry.” In *Methods in Molecular Biology*, 1449:369–82. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3756-1_24.
- Benne, R., and J. W.B. Hershey. 1978. “The Mechanism of Action of Protein Synthesis Initiation Factors from Rabbit Reticulocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 253 (9): 3078–87. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40805-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40805-2).
- Bohnert, K. Adam, Alaina H. Willet, David R. Kovar, and Kathleen L. Gould. 2013. “Formin-Based Control of the Actin Cytoskeleton during Cytokinesis.” In *Biochemical Society Transactions*, 41:1750–54. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1042/BST20130208>.
- Brabletz, Simone, Harald Schuhwerk, Thomas Brabletz, and Marc P. Stemmler. 2021. “Dynamic EMT: A Multi-tool for Tumor Progression.” *The EMBO Journal* 40 (18). <https://doi.org/10.15252/emj.2021108647>.
- Brochier, C. Éline, Purificación López-García, and David Moreira. 2004. “Horizontal Gene Transfer and Archaeal Origin of Deoxyhypusine Synthase Homologous Genes in Bacteria.” *Gene* 330 (1–2): 169–76. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2004.01.018>.
- Cano, Veridiana S.P., Geoung A. Jeon, Hans E. Johansson, C. Allen Henderson, Jong Hwan Park, Sandro R. Valentini, John W.B. Hershey, and Myung Hee Park. 2008. “Mutational Analyses of Human EIF5A-1--Identification of Amino Acid Residues Critical for EIF5A Activity and Hypusine Modification.” *The FEBS Journal* 275 (1): 44–58. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2007.06172.X>.
- Chassé, Héloïse, Sandrine Boulben, Vlad Costache, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2017. “Analysis of Translation Using Polysome Profiling.” *Nucleic Acids Research* 45 (3): e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw907>.
- Chen, Cheng, Bojia Zhang, Shanshan Wu, Yongxiang Song, and Jian Li. 2018. “Knockdown of EIF5A2 Inhibits the Malignant Potential of Non-Small Cell Lung Cancer Cells,” 4541–49. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7832>.

- Chen, Guoan, Tarek G Gharib, Dafydd G Thomas, Chiang-Ching Huang, David E Misek, Rork D Kuick, Thomas J Giordano, *et al.* 2003. "Proteomic Analysis of EIF-5A in Lung Adenocarcinomas." *Proteomics* 3 (4): 496–504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687616>.
- Chen, Miao Juan, Xue Juan Gao, Li Na Xu, Teng Fei Liu, Xiao Hui Liu, and Lang Xia Liu. 2014. "Ezrin Is Required for Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by TGF-B1 in A549 Cells." *International Journal of Oncology* 45 (4): 1515–22. <https://doi.org/10.3892/IJO.2014.2554>.
- Chen, Wei, Jun-Hang Luo, Wen-Feng Hua, Fang-Jian Zhou, Marie C Lin, Hsiang-Fu Kung, Yi-Xin Zeng, Xin-Yuan Guan, and Dan Xie. 2009. "Overexpression of EIF-5A2 Is an Independent Predictor of Outcome in Patients of Urothelial Carcinoma of the Bladder Treated with Radical Cystectomy." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (2): 400–408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155439>.
- Chesarone, Melissa A, Amy Grace DuPage, and Bruce L Goode. 2010. "Unleashing Formins to Remodel the Actin and Microtubule Cytoskeletons." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (1): 62–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997130>.
- Childs, A. C., D. J. Mehta, and E. W. Gerner. 2003. "Polyamine-Dependent Gene Expression." *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (7): 1394–1406. <https://doi.org/10.1007/S00018-003-2332-4>.
- Clement, Paul M.J., Hans E. Johansson, Edith C. Wolff, and Myung H. Park. 2006. "Differential Expression of EIF5A-1 and EIF5A-2 in Human Cancer Cells." *The FEBS Journal* 273 (6): 1102. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2006.05135.X>.
- Clucas, J., and F. Valderrama. 2014. "ERM Proteins in Cancer Progression." *Journal of Cell Science* 127 (2): 267–75. <https://doi.org/10.1242/jcs.133108>.
- Cooper, H. L., M. H. Park, J. E. Folk, B. Safer, and R. Braverman. 1983. "Identification of the Hypusine-Containing Protein Hy+ as Translation Initiation Factor EIF-4D." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (7 1): 1854–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1854>.
- Craene, Bram de, and Geert Berx. 2013. "Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression." *Nature Reviews. Cancer* 13 (2): 97–110. <https://doi.org/10.1038/NRC3447>.

- Damiani, Elisabetta, and Heather M Wallace. 2018. "Polyamines and Cancer" 1694. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9>.
- Datto, Michael B., Yan Li, Joanne F. Panus, David J. Howe, Yue Xiong, and Xiao Fan Wang. 1995. "Transforming Growth Factor Beta Induces the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21 through a P53-Independent Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (12): 5545. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.12.5545>.
- Dever, Thomas E., and Ivaylo P. Ivanov. 2018. "Roles of Polyamines in Translation." <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003338>.
- Dissanayake, Samudra K., Michael Wade, Carrie E. Johnson, Michael P. O'Connell, Poloko D. Leotlela, Amanda D. French, Kavita v. Shah, *et al.* 2007. "The Wnt5A/Protein Kinase C Pathway Mediates Motility in Melanoma Cells via the Inhibition of Metastasis Suppressors and Initiation of an Epithelial to Mesenchymal Transition." *Journal of Biological Chemistry* 282 (23): 17259–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700075200>.
- Domenico, Marina di, and Antonio Giordano. 2017. "Signal Transduction Growth Factors: The Effective Governance of Transcription and Cellular Adhesion in Cancer Invasion." *Oncotarget* 8 (22): 36869–84. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16300>.
- Dongre, Anushka, and Robert A. Weinberg. 2019. "New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (2): 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- Farache, Dorian, Luo Chen Liu, and Amy S.Y. Lee. 2022. "Eukaryotic Initiation Factor 5A2 Regulates Expression of Antiviral Genes." *Journal of Molecular Biology* 434 (10): 167564. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167564>.
- Fields, Alan P., Verline Justilien, and Nicole R. Murray. 2016. "The Chromosome 3q26 OncCassette: A Multigenic Driver of Human Cancer." *Advances in Biological Regulation* 60 (January): 47. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2015.10.009>.
- Fife, C. M., J. A. McCarroll, and M. Kavallaris. 2014. "Movers and Shakers: Cell Cytoskeleton in Cancer Metastasis." *British Journal of Pharmacology* 171 (24): 5507–23. <https://doi.org/10.1111/BPH.12704>.
- Flavahan, William A., Elizabeth Gaskell, and Bradley E. Bernstein. 2017. "Epigenetic Plasticity and the Hallmarks of Cancer." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>.

- Fröse, Julia, Michelle B. Chen, Katie E. Hebron, Ferenc Reinhardt, Cynthia Hajal, Andries Zijlstra, Roger D. Kamm, and Robert A. Weinberg. 2018. "Epithelial-Mesenchymal Transition Induces Podocalyxin to Promote Extravasation via Ezrin Signaling." *Cell Reports* 24 (4): 962–72. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.06.092>.
- Gandin, Valentina, Kristina Sikström, Tommy Alain, Masahiro Morita, Shannon McLaughlan, Ola Larsson, and Ivan Topisirovic. 2014. "Polysome Fractionation and Analysis of Mammalian Translatomes on a Genome-Wide Scale." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 87 (May). <https://doi.org/10.3791/51455>.
- Gardberg, Maria, Katja Kaipio, Laura Lehtinen, Piia Mikkonen, Vanina D. Heuser, Kati Talvinen, Kristiina Iljin, *et al.* 2013. "FHOD1, a Formin Upregulated in Epithelial-Mesenchymal Transition, Participates in Cancer Cell Migration and Invasion." *PLoS ONE* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074923>.
- Guan, Xin Yuan, Jonathan S.T. Sham, Terence C.M. Tang, Yan Fang, Ke Ke Huo, and Jin Ming Yang. 2001. "Isolation of a Novel Candidate Oncogene within a Frequently Amplified Region at 3q26 in Ovarian Cancer." *Cancer Research* 61 (9): 3806–9. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/61/9/3806/508700/Isolation-of-a-Novel-Candidate-Oncogene-within-a>.
- Gudey, Shyam Kumar, Reshma Sundar, Carl-Henrik Heldin, Anders Bergh, Marene Landström, Shyam Kumar Gudey, Reshma Sundar, Carl-Henrik Heldin, Anders Bergh, and Marene Landström. 2017. "Pro-Invasive Properties of Snail1 Are Regulated by Sumoylation in Response to TGF β Stimulation in Cancer." *Oncotarget* 8 (58): 97703–26. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.20097>.
- Gupta, Piyush B., Ievgenia Pastushenko, Adam Skibinski, Cedric Blanpain, and Charlotte Kuperwasser. 2019. "Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance." *Cell Stem Cell*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011>.
- Gutierrez, Erik, Byung Sik Shin, Christopher J Woolstenhulme, Joo Ran Kim, Preeti Saini, Allen R Buskirk, and Thomas E Dever. 2013. "Eif5A Promotes Translation of Polyproline Motifs." *Molecular Cell* 51 (1): 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.021>.
- Han, Myung Woul, In Sun Ryu, Jong Cheol Lee, Song Hee Kim, Hyo Won Chang, Yoon Sun Lee, Seulkina Lee, Seong Who Kim, and Sang Yoon Kim. 2018. "Phosphorylation of PI3K Regulatory Subunit P85 Contributes to Resistance against PI3K Inhibitors in Radioresistant Head and Neck Cancer." *Oral Oncology* 78 (March): 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.ORALONCOLOGY.2018.01.014>.

- Hanahan, Douglas. 2022. "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." *Cancer Discovery*.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- . 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144: 646–74.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hao, Yang, David Baker, and Peter ten Dijke. 2019. "TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>.
- Hay, Elizabeth D. 1985. "Matrix-cytoskeletal Interactions in the Developing Eye." *Journal of Cellular Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/jcb.240270208>.
- He, Li Ru, Hong Yun Zhao, Bin Kui Li, Yan Hui Liu, Meng Zhong Liu, Xin Yuan Guan, Xiu Wu Bian, Yi Xin Zeng, and Dan Xie. 2011. "Overexpression of EIF5A-2 Is an Adverse Prognostic Marker of Survival in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer Patients." *International Journal of Cancer* 129 (1): 143–50.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25669>.
- Henderson, Allen, and John W Hershey. 2011. "Eukaryotic Translation Initiation Factor (EIF) 5A Stimulates Protein Synthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (16): 6415–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008150108>.
- Hershey, John W.B., Zeljka Smit-McBride, and Joachim Schnier. 1990. "The Role of Mammalian Initiation Factor EIF-4D and Its Hypusine Modification in Translation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1050 (1–3): 160–62. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(90\)90159-Y](https://doi.org/10.1016/0167-4781(90)90159-Y).
- Hitchcock, C. L. 1991. "Ki-67 Staining as a Means to Simplify Analysis of Tumor Cell Proliferation." *American Journal of Clinical Pathology* 96 (4): 444–47.
<https://doi.org/10.1093/AJCP/96.4.444>.
- Hofmann, W, B Reichart, A Ewald, E Müller, I Schmitt, R H Stauber, F Lottspeich, *et al.* 2001. "Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (RRE)- and Constitutive Transport Element (CTE)-Containing Retroviral RNAs. An Unexpected Role for Actin." *The Journal of Cell Biology* 152 (5): 895–910.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238447>.

- Huang, Ruby Yun Ju, Parry Guilford, and Jean Paul Thiery. 2012. "Early Events in Cell Adhesion and Polarity during Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Cell Science* 125 (19): 4417–22. <https://doi.org/10.1242/JCS.099697>.
- Imaoka, Nobuo, and Teruo Nakajima. 1973. "Hypusine, N6-(4-Amino-2-Hydroxybutyl)-2,6-Diaminohexanoic Acid, in Tissue Proteins of Mammals." *BBA - General Subjects* 320 (1): 97–103. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(73\)90170-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(73)90170-0).
- Ingolia, Nicholas T., Liana F. Lareau, and Jonathan S. Weissman. 2011. "Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes." *Cell* 147 (4): 789–802. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.002>.
- Ishfaq, Muhammad, Kazuhiro Maeta, Satoko Maeda, Toru Natsume, Akihiro Ito, and Minoru Yoshida. 2012a. "The Role of Acetylation in the Subcellular Localization of an Oncogenic Isoform of Translation Factor EIF5A." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76 (11): 2165–67. <https://doi.org/10.1271/BBB.120620>.
- . 2012b. "Acetylation Regulates Subcellular Localization of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A)." *FEBS Letters* 586 (19): 3236–41. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2012.06.042>.
- Jenkins, Zandra A., Petra G. Hååg, and Hans E. Johansson. 2001. "Human EIF5A2 on Chromosome 3q25-Q27 Is a Phylogenetically Conserved Vertebrate Variant of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A with Tissue-Specific Expression." *Genomics* 71 (1): 101–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161802>.
- Jiang, Xiangli, and Fabricio Loayza-Puch. 2022. "Roles of EIF5A in the Immunosurveillance of Cellular Senescence." *Cancer Biology & Medicine*, October 1–5. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2022.0408>.
- Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of Clinical Investigation* 119.
- Kemper, Wayne M, Karen W Berry, and William C Merrick. 1976. "Purification and Properties of Rabbit Reticulocyte Protein Synthesis Initiation Factors M2Balpha and M2Bbeta." *The Journal Of Biological Chemistry* 251 (18): 5551–57.
- Kim, Kyeong Kyu, Li-Wei Hung, Hisao Yokota, Rosalind Kim, and Sung-Hou Kim. 1998. "Crystal Structures of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A from *Methanococcus Jannaschii* at 1.8 Å Resolution." *Biochemistry* 95: 10419–24.
- Klier, Hannelore, Robert Csonga, Heidi C. Joao, Christoph Eckerskorn, Manfred Auer, Friederich Lottspeich, and Joerg Eder. 1995. "Isolation and Structural Characterization of Different Isoforms of the Hypusine-Containing Protein EIF-5A

- from HeLa Cells.” *Biochemistry* 34 (45): 14693–702.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00045a010>.
- Koenig, Alexander, Claudia Mueller, Cornelia Hasel, Guido Adler, and Andre Menke. 2006. “Collagen Type I Induces Disruption of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contacts and Promotes Proliferation of Pancreatic Carcinoma Cells.” *Cancer Research* 66 (9): 4662–71. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2804>.
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. “Molecular Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Lane, D. P. 1992. “P53, Guardian of the Genome.” *Nature*. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/358015a0>.
- Lee, Seung Bum, Jong Hwan Park, Jorn Kaevel, Monika Sramkova, Roberto Weigert, and Myung Hee Park. 2009. “The Effect of Hypusine Modification on the Intracellular Localization of EIF5A.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Lemmon, Mark A., and Joseph Schlessinger. 2010. “Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases.” *Cell*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- Leptin, M. 1991. “Twist and Snail as Positive and Negative Regulators during Drosophila Mesoderm Development.” *Genes and Development* 5 (9): 1568–76.
<https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1568>.
- Li, Haojian, Susan E. Zimmerman, and Urbain Weyemi. 2021. “Genomic Instability and Metabolism in Cancer.” In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 364:241–65. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.05.004>.
- LI, Mo Juan, Dan XIONG, Hao HUANG, and Zhong Yong WEN. 2021. “Ezrin Promotes the Proliferation, Migration, and Invasion of Ovarian Cancer Cells.” *Biomedical and Environmental Sciences: BES* 34 (2): 139–51.
<https://doi.org/10.3967/BES2021.020>.
- Li, Tianlu, Borja Belda-Palazón, Alejandro Ferrando, and Paula Alepuz. 2014. “Fertility and Polarized Cell Growth Depends on EIF5A for Translation of Polyproline-Rich Formins in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics* 197 (4): 1191–1200.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24923804>.
- Li, Yan, Li Fu, Jian Biao Li, Yanru Qin, Ting Ting Zeng, Jie Zhou, Zhao Lei Zeng, *et al.* 2014. “Increased Expression of EIF5A2, via Hypoxia or Gene Amplification, Contributes to Metastasis and Angiogenesis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma.” *Gastroenterology* 146 (7).
<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.02.029>.

- Liberti, Maria v., and Jason W. Locasale. 2016. "The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells?" *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3): 211. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.12.001>.
- Lipinski, Marta M., and Tyler Jacks. 1999. "The Retinoblastoma Gene Family in Differentiation and Development." *Oncogene*. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203244>.
- Lipowsky, Gerd, F. Ralf Bischoff, Petra Schwarzmaier, Regine Kraft, Susanne Kostka, Enno Hartmann, Ulrike Kutay, and Dirk Görlich. 2000. "Exportin 4: A Mediator of a Novel Nuclear Export Pathway in Higher Eukaryotes." *The EMBO Journal* 19 (16): 4362–71. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.16.4362>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>.
- Ma, Ke, Yangwei Fan, Xuyuan Dong, Danfeng Dong, Yuyan Guo, Xin Wei, Jing Ning, *et al.* 2017. "MTA1 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis in Non-Small-Cell Lung Cancer." *Oncotarget* 8 (24): 38825–40. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16404>.
- Mandal, Swati, Ajeet Mandal, and Myung Hee Park. 2015. "Depletion of the Polyamines Spermidine and Spermine by Overexpression of Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1 (SAT1) Leads to Mitochondria-Mediated Apoptosis in Mammalian Cells." *Biochemical Journal* 468 (3): 435–47. <https://doi.org/10.1042/BJ20150168>.
- Manjunath, Hema, He Zhang, Frederick Rehfeld, Jaeil Han, Tsung Cheng Chang, and Joshua T. Mendell. 2019. "Suppression of Ribosomal Pausing by EIF5A Is Necessary to Maintain the Fidelity of Start Codon Selection." *Cell Reports* 29 (10): 3134-3146.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.129>.
- Marconi, Guya D., Luigia Fonticoli, Thangavelu Soundara Rajan, Sante D. Pierdomenico, Oriana Trubiani, Jacopo Pizzicannella, and Francesca Diomedea. 2021. "Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis." *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells10071587>.
- Martin, B, M Paesmans, C Mascaux, T Berghmans, P Lothaire, A-P Meert, J-J Lafitte, and J-P Sculier. 2004. "Ki-67 Expression and Patients Survival in Lung Cancer: Systematic Review of the Literature with Meta-Analysis." *British Journal of Cancer* 91: 2018–25. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602233>.

- Mathews, Michael B., and John W.B. Hershey. 2015. "The Translation Factor EIF5A and Human Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (7): 836–44. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939915001005>.
- Meng, Qing bin, Wei Ming Kang, Jian Chun Yu, Yu Qin Liu, Zhi Qiang Ma, Li Zhou, Quan Cai Cui, and Wei Xun Zhou. 2015. "Overexpression of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A2 (EIF5A2) Correlates with Cell Aggressiveness and Poor Survival in Gastric Cancer." *PLoS ONE* 10 (3): 119229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119229>.
- Miller-Fleming, Leonor, Viridiana Olin-Sandoval, Kate Campbell, and Markus Ralser. 2015. "Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell." *Journal of Molecular Biology* 427 (21): 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.06.020>.
- Moghanibashi, Mehdi, Ferdous Rastgar Jazii, Zahra Soheila Soheili, Maryam Zare, Aliasghar Karkhane, Kazem Parivar, and Parisa Mohamadynejad. 2013. "Esophageal Cancer Alters the Expression of Nuclear Pore Complex Binding Protein Hsc70 and EIF5A-1." *Functional and Integrative Genomics* 13 (2): 253–60. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0320-9>.
- Muñoz-Soriano, Verónica, Ana Domingo-Muelas, Tianlu Li, Esther Gamero, Alexandra Bizy, Isabel Fariñas, Paula Alepuz, and Nuria Paricio. 2017. "Evolutionary Conserved Role of Eukaryotic Translation Factor EIF5A in the Regulation of Actin-Nucleating Formins." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10057-y>.
- Nakajima, Teruo, Takeyuki Matsubayashi, Yusuo Kakimoto, and Isamu Sano. 1971. "Distribution of Hypusine, N6(-4amino-2-Hydroxybutyl)-2, 6-Diaminohexanoic Acid, in Mammalian Organs." *BBA - General Subjects* 252 (1): 92–97. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(71\)90095-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(71)90095-X).
- Nathans, D. 1964. "Puromycin Inhibition of Protein Synthesis: Incorporation of Puromycin into Peptide Chains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of* 51 (4): 585–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.4.585>.
- National Cancer Institute at the National Institutes of Health. 2021. "What Is Cancer?" 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition>.
- Nieto, M. Angela, Ruby Yun Y.J. Huang, Rebecca A A. Jackson, and Jean Paul P. Thiery. 2016. "EMT: 2016." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.

- Nieto, M. Angela, Michael G. Sargent, David G. Wilkinson, and Jonathan Cooke. 1994. "Control of Cell Behavior during Vertebrate Development by Slug, a Zinc Finger Gene." *Science (New York, N.Y.)* 264 (5160): 835–39. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7513443>.
- Ning, Liang, Lei Wang, Honglai Zhang, Xuelong Jiao, and Dong Chen. 2020. "Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A in the Pathogenesis of Cancers." *Oncology Letters*. *Oncol Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11942>.
- Nishimura, Kazuhiro, Seung Bum Lee, Jong Hwan Park, and Myung Hee Park. 2012. "Essential Role of EIF5A-1 and Deoxyhypusine Synthase in Mouse Embryonic Development." *Amino Acids* 42 (2–3): 703–10. <https://doi.org/10.1007/S00726-011-0986-Z>.
- Nisticò, Paola, Mina J. Bissell, and Derek C. Radisky. 2012. "Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A011908>.
- Novita Sari, Ita, Tania Setiawan, Kwang Seock Kim, Yoseph Toni Wijaya, Kae Won Cho, and Hyog Young Kwon. 2021. "Metabolism and Function of Polyamines in Cancer Progression." *Cancer Letters*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.020>.
- Pällmann, Nora, Melanie Braig, Henning Sievert, Michael Preukschas, Irm Hermans-Borgmeyer, Michaela Schweizer, Claus Henning Nagel, *et al.* 2015. "Biological Relevance and Therapeutic Potential of the Hypusine Modification System." *Journal of Biological Chemistry* 290 (30): 18343–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.664490>.
- Palmer, Andrew J., and Heather M. Wallace. 2009. "The Polyamine Transport System as a Target for Anticancer Drug Development." *Amino Acids* 2009 38:2 38 (2): 415–22. <https://doi.org/10.1007/S00726-009-0400-2>.
- Pardo-Sánchez, José Miguel, Nuria Mancheño, José Cerón, Carlos Jordá, Emilio Ansotegui, Óscar Juan, Sarai Palanca, Antonio Cremades, Carolina Gandía, and Rosa Farràs. 2021. "Increased Tumor Growth Rate and Mesenchymal Properties of NSCLC-Patient-Derived Xenograft Models during Serial Transplantation." *Cancers* 13 (12). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13122980>.
- Park, Jae Hyung, Woo Yang Pyun, and Hyun Woo Park. 2020. "Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets." *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells9102308>.

- Park, Jong Hwan, L Aravind, Edith C Wolff, Jörn Kaevel, Yeon Sook Kim, and Myung Hee Park. 2006. "Molecular Cloning, Expression, and Structural Prediction of Deoxyhypusine Hydroxylase: A HEAT-Repeat-Containing Metalloenzyme." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (1): 51–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509348102>.
- Park, Myung Hee, and Kazuei Igarashi. 2013. "Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases." *Biomolecules and Therapeutics*. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.097>.
- Park, Myung Hee, Young Ae Joe, and Kee Ryeon Kang. 1998. "Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1677–83. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.3.1677>.
- Park, Myung Hee, and Edith C. Wolff. 2018. "Hypusine, a Polyamine-Derived Amino Acid Critical for Eukaryotic Translation." *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003341>.
- Park, Myung-Hee, Herbert L. Cooper, and J. E. Folk. 1981. "Identification of Hypusine, an Unusual Amino Acid, in a Protein from Human Lymphocytes and of Spermidine as Its Biosynthetic Precursor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (5): 2869–73.
- Park, Myung-Hee, Kazuhiro Nishimura, Cleslei Fernando Zanelli, and Sandro Roberto Valentini. 2010. "Functional Significance of EIF5A and Its Hypusine Modification in Eukaryotes." *Amino Acids*.
- Park, Myung-Hee, E. C. Wolff, Young Bok Lee, and J. E Folk. 1994. "Antiproliferative Effects of Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. Inhibition of Growth of Chinese Hamster Ovary Cells by Guanyl Diamines." *Journal of Biological Chemistry* 269 (45): 27827–32. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)46861-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)46861-5).
- Park, Myung-Hee, Edith C. Wolff, and J. E. Folk. 1993. "Hypusine: Its Post-Translational Formation in Eukaryotic Initiation Factor 5A and Its Potential Role in Cellular Regulation." *BioFactors* 4 (2): 95-104. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8347280/>.
- Park, Myung-Hee, Edith C. Wolff, Zeljka Smit-McBride, John W.B. Hershey, and J. E. Folk. 1991. "Comparison of the Activities of Variant Forms of EIF-4D: The Requirement for Hypusine or Deoxyhypusine." *Journal of Biological Chemistry* 266 (13): 7988–94. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)92929-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)92929-7).

- Parreiras-e-Silva, Lucas T., Marcelo D. Gomes, Eduardo B. Oliveira, and Claudio M. Costa-Neto. 2007. "The N-Terminal Region of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Signals to Nuclear Localization of the Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (2): 393–98. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.07.185>.
- Pastushenko, Ievgenia, and Cédric Blanpain. 2019. "EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis." *Trends in Cell Biology* 29 (3): 212–26. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2018.12.001>.
- Patel, Prajal H., Mauro Costa-Mattoli, Karen L. Schulze, and Hugo J. Bellen. 2009. "The Drosophila Deoxyhypusine Hydroxylase Homologue Nero and Its Target EIF5A Are Required for Cell Growth and the Regulation of Autophagy." *The Journal of Cell Biology* 185 (7): 1181–94. <https://doi.org/10.1083/JCB.200904161>.
- Pegg, Anthony E. 2009. "Mammalian Polyamine Metabolism and Function." *IUBMB Life* 61 (9): 880. <https://doi.org/10.1002/IUB.230>.
- Pegg, Anthony E. 2016. "Functions of Polyamines in Mammals." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>.
- Peinado, Héctor, David Olmeda, and Amparo Cano. 2007. "Snail, ZEB and BHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?" *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>.
- Pelechano, Vicent, and Paula Alepuz. 2017. "EIF5A Facilitates Translation Termination Globally and Promotes the Elongation of Many Non Polyproline-Specific Tripeptide Sequences." *Nucleic Acids Research*, May. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx479>.
- Pereira, Karina Danielle, Leticia Tamborlin, Leticia Meneguello, André Ricardo Gomes de Proença, Isadora Cristina de Paula Andrade Almeida, Rogério Ferreira Lourenço, and Augusto Ducati Luchessi. 2016. "Alternative Start Codon Connects EIF5A to Mitochondria." *Journal of Cellular Physiology* 231 (12): 2682–89. <https://doi.org/10.1002/JCP.25370>.
- Pochopien, Agnieszka A., Bertrand Beckert, Sergo Kasvandik, Otto Berninghausen, Roland Beckmann, Tanel Tenson, and Daniel N. Wilson. 2021. "Structure of Gcn1 Bound to Stalled and Colliding 80S Ribosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (14). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2022756118/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- Prichard, P. M., J. M. Gilbert, D. A. Shafritz, and W. F. Anderson. 1970. "Factors for the Initiation of Haemoglobin Synthesis by Rabbit Reticulocyte Ribosomes." *Nature* 226 (5245): 511–14. <https://doi.org/10.1038/226511A0>.

- Pringle, Eric S., Craig McCormick, and Zhenyu Cheng. 2019. "Polysome Profiling Analysis of mRNA and Associated Proteins Engaged in Translation." *Current Protocols in Molecular Biology* 125 (1): e79. <https://doi.org/10.1002/CPMB.79>.
- Puleston, Daniel J., Francesc Baixauli, David E. Sanin, Joy Edwards-Hicks, Matteo Villa, Agnieszka M. Kabat, Marcin M. Kamiński, *et al.* 2021. "Polyamine Metabolism Is a Central Determinant of Helper T Cell Lineage Fidelity." *Cell* 184 (16): 4186. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.06.007>.
- Rana, Manish K., Francesca M. Aloisio, Changhoon Choi, and Diane L. Barber. 2018. "Formin-Dependent TGF- β Signaling for Epithelial to Mesenchymal Transition." *Molecular Biology of the Cell* 29 (12): 1465–75. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-05-0325>.
- Riihimäki, M., A. Hemminki, M. Fallah, H. Thomsen, K. Sundquist, J. Sundquist, and K. Hemminki. 2014. "Metastatic Sites and Survival in Lung Cancer." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 86 (1): 78–84. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2014.07.020>.
- Robichaud, N., S. v. del Rincon, B. Huor, T. Alain, L. A. Petruccelli, J. Hearnden, C. Goncalves, *et al.* 2015. "Phosphorylation of EIF4E Promotes EMT and Metastasis via Translational Control of SNAIL and MMP-3." *Oncogene* 34 (16): 2032–42. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.146>.
- Roger, Lauréline, Fanny Tomas, and Véronique Gire. 2021. "Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence." *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>.
- Rosorius, Olaf, Beate Reichart, Friedrich Krätzer, Peter Heger, Marie Christine Dabauvalle, and Joachim Hauber. 1999. "Nuclear Pore Localization and Nucleocytoplasmic Transport of EIF-5A: Evidence for Direct Interaction with the Export Receptor CRM1." *Journal of Cell Science* 112 (14): 2369–80. <https://doi.org/10.1242/JCS.112.14.2369>.
- Rubtsova, Svetlana N., Irina Y. Zhitnyak, and Natalya A. Gloushankova. 2021. "Phenotypic Plasticity of Cancer Cells Based on Remodeling of the Actin Cytoskeleton and Adhesive Structures." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (4): 1–24. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041821>.
- Ruhl, M., M. Himmelspach, G. M. Bahr, F. Hammerschmid, H. Jaksche, B. Wolff, H. Aschauer, *et al.* 1993. "Eukaryotic Initiation Factor 5A Is a Cellular Target of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Activation Domain Mediating Trans-

- Activation." *The Journal of Cell Biology* 123 (6 Pt 1): 1309–20. <https://doi.org/10.1083/JCB.123.6.1309>.
- Safer, Brian. 1989. "Nomenclature of Initiation, Elongation and Termination Factors for Translation in Eukaryotes: Recommendations 1988." *European Journal of Biochemistry* 186 (1–2): 1–3. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15169.x>.
- Sagar, Narashans Alok, Swarnava Tarafdar, Surbhi Agarwal, Ayon Tarafdar, and Sunil Sharma. 2021. "Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management." *Medical Sciences* 9 (2): 44. <https://doi.org/10.3390/medsci9020044>.
- Saini, P., D. E. Eyler, R. Green, and T. E. Dever. 2009. "Hypusine-Containing Protein EIF5A Promotes Translation Elongation." *Nature* 459 (7243): 118–21. <https://doi.org/10.1038/nature08034>.Hypusine-containing.
- Samarakoon, Rohan, Stephen P. Higgins, Craig E. Higgins, and Paul J. Higgins. 2019. "The TGF-B1/P53/PAI-1 Signaling Axis in Vascular Senescence: Role of Caveolin-1." *Biomolecules* 9 (8). <https://doi.org/10.3390/BIOM9080341>.
- Sasaki, Kazuhiro, Md Ruhul Abid, and Masazumi Miyazaki. 1996. "Deoxyhypusine Synthase Gene Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEBS Letters* 384 (2): 151–54. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00310-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00310-9).
- Schmidt, Christian, Thomas Becker, André Heuer, Katharina Braunger, Vivekanandan Shanmuganathan, Markus Pech, Otto Berninghausen, Daniel N. Wilson, and Roland Beckmann. 2015. "Structure of the Hypusinylated Eukaryotic Translation Factor EIF-5A Bound to the Ribosome." *Nucleic Acids Research* 44 (4): 1944–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1517>.
- Schnier, J, H G Schwelberger, Z Smit-McBride, H A Kang, and J W Hershey. 1991. "Translation Initiation Factor 5A and Its Hypusine Modification Are Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 11 (6): 3105–14. <https://doi.org/10.1128/MCB.11.6.3105-3114.1991>.
- Schrader, Rainer, Craig Young, Detlef Kozian, Reinhard Hoffmann, and Friedrich Lottspeich. 2006. "Temperature-Sensitive EIF5A Mutant Accumulates Transcripts Targeted to the Nonsense-Mediated Decay Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 281 (46): 35336–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601460200>.
- Schuller, Anthony P., Colin Chih Chien Wu, Thomas E. Dever, Allen R. Buskirk, and Rachel Green. 2017. "EIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination." *Molecular Cell* 66 (2): 194-205.e5. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.03.003>.

- Sepich-Poore, Gregory D., Laurence Zitvogel, Ravid Straussman, Jeff Hasty, Jennifer A. Wargo, and Rob Knight. 2021. "The Microbiome and Human Cancer." *Science (New York, N. Y.)* 371 (6536). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC4552>.
- Shafritz, D. A., P. M. Prichard, J. M. Gilbert, and W. F. Anderson. 1970. "Separation of Two Factors, M1 and M2, Required for Poly U Dependent Polypeptide Synthesis by Rabbit Reticulocyte Ribosomes at Low Magnesium Ion Concentration." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 38 (4): 721–27. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90641-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90641-8).
- Shafritz, D. A., P. M. Prichard, J. M. Gilbert, W. C. Merrick, and W. F. Anderson. 1972. "Separation of Reticulocyte Initiation Factor M 2 Activity into Two Components." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (4): 983–87. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.4.983>.
- Shafritz, David A., and W. French Anderson. 1970. "Factor Dependent Binding of Methionyl-TRNAs to Reticulocyte Ribosomes." *Nature* 1970 227:5261 227 (5261): 918–20. <https://doi.org/10.1038/227918a0>.
- Shafritz, David A, David G Laycock, and W French Anderson. 1971. "Puromycin-Peptide Bond Formation with Reticulocyte Initiation Factors M1 and M2" 68 (2): 496–99. <https://www.pnas.org>.
- Sheppard, Dean. 2005. "Integrin-Mediated Activation of Latent Transforming Growth Factor Beta." *Cancer Metastasis Reviews* 24 (3): 395–402. <https://doi.org/10.1007/S10555-005-5131-6>.
- Shi, Xiao Ping, Kuo Chang Yin, Zoran A. Zimolo, Andrew M. Stern, and Lloyd Waxman. 1996. "The Subcellular Distribution of Eukaryotic Translation Initiation Factor, EIF-5A, in Cultured Cells." *Experimental Cell Research* 225 (2): 348–56. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1996.0185>.
- Shiba, Tetsuo, Hiroyuki Mizote, Takeo Kaneko, Teruo Nakajima, Kakimoto Yasuo, and Isamu sano. 1971. "Hypusine, a New Amino Acid Occurring in Bovine Brain. Isolation and Structural Determination." *BBA - General Subjects* 244 (3): 523–31. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(71\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(71)90069-9).
- Shin, Byung Sik, Takayuki Katoh, Erik Gutierrez, Joo Ran Kim, Hiroaki Suga, and Thomas E. Dever. 2017. "Amino Acid Substrates Impose Polyamine, EIF5A, or Hypusine Requirement for Peptide Synthesis." *Nucleic Acids Research* 45 (14): 8392–8402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx532>.
- Sievert, Henning, Nora Pällmann, Katharine K. Miller, Irm Hermans-Borgmeyer, Simone Venz, Ataman Sendoel, Michael Preukschas, *et al.* 2014. "A Novel Mouse Model

- for Inhibition of DOHH-Mediated Hypusine Modification Reveals a Crucial Function in Embryonic Development, Proliferation and Oncogenic Transformation." *DMM Disease Models and Mechanisms* 7 (8): 963–76. <https://doi.org/10.1242/DMM.014449/-/DC1>.
- Singh, Nitin, Deepak Baby, Jagadish Rajguru, Pankaj Patil, Savita Thakkannavar, and Veena Pujari. 2019. "Inflammation and Cancer." *Annals of African Medicine* 18 (3): 121–26. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18.
- Smit-McBride, Z., T. E. Dever, J. W.B. Hershey, and W. C. Merrick. 1989. "Sequence Determination and cDNA Cloning of Eukaryotic Initiation Factor 4D, the Hypusine-Containing Protein." *Journal of Biological Chemistry* 264 (3): 1578–83. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94226-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94226-2).
- Smit-McBride, Z, J Schnier, R J Kaufman, and J W Hershey. 1989. "Protein Synthesis Initiation Factor EIF-4D. Functional Comparison of Native and Unhypusinated Forms of the Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 264 (31): 18527–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509460>.
- Starck, Shelley R., Harry M. Green, José Alberola-Ila, and Richard W. Roberts. 2004. "A General Approach to Detect Protein Expression In vivo Using Fluorescent Puromycin Conjugates." *Chemistry and Biology* 11 (7): 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.05.011>.
- Steinkasserer, Alexander, Tania Jones, Denise Sheer, Karl Koettnitz, Joachim Hauber, and Dorian Bevec. 1995. "The Eukaryotic Cofactor for the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Rev Protein, EIF-5A, Maps to Chromosome 17p12-P13: Three EIF-5A Pseudogenes Map to 10q23.3, 17q25, and 19q13.2." *Genomics* 25 (3): 749–52. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80025-H](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80025-H).
- Strasser, Andreas, and David L. Vaux. 2020. "Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer." *Molecular Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>.
- Sugimoto, Asako. 2004. "High-Throughput RNAi in *Caenorhabditis Elegans*: Genome-Wide Screens and Functional Genomics." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 72 (2–3): 81–91. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.2004.07202004.X>.
- Sun, Jiancheng, Zhiyuan Xu, Hang Lv, Yiping Wang, Lijing Wang, Yixiu Ni, Xiaofeng Wang, *et al.* 2018. "EIF5A2 Regulates the Resistance of Gastric Cancer Cells to Cisplatin via Induction of EMT." *American Journal of Translational Research* 10 (12): 4269–79. [/pmc/articles/PMC6325524/](https://pmc/articles/PMC6325524/).

- Svitkina, Tatyana. 2018. "The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018267>.
- Svitkina, Tatyana M. 2018. "ULTRASTRUCTURE OF THE ACTIN CYTOSKELETON." *Current Opinion in Cell Biology* 54 (October): 1. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2018.02.007>.
- Tam, Wai Leong, and Robert A. Weinberg. 2013. "The Epigenetics of Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer." *Nature Medicine*. Nat Med. <https://doi.org/10.1038/nm.3336>.
- Tanaka, Hidekazu, Weisong Shan, Greg R. Phillips, Kirsten Arndt, Ozlem Bozdagi, Lawrence Shapiro, George W. Huntley, Deanna L. Benson, and David R. Colman. 2000. "Molecular Modification of N-Cadherin in Response to Synaptic Activity." *Neuron* 25 (1): 93–107. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80874-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80874-0).
- Tanaka, Yuta, Osamu Kurasawa, Akihiro Yokota, Michael G. Klein, Koji Ono, Bunnai Saito, Shigemitsu Matsumoto, *et al.* 2020. "Discovery of Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase." *Journal of Medicinal Chemistry* 63 (6): 3215–26. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01979>.
- Tang, Dong Jiang, Sui Sui Dong, Ning Fang Ma, Dan Xie, Leilei Chen, Li Fu, Sze Hang Lau, Yan Li, and Xin Yuan Guan. 2010. "Overexpression of Eukaryotic Initiation Factor 5A2 Enhances Cell Motility and Promotes Tumor Metastasis in Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology* 51 (4): 1255–63. <https://doi.org/10.1002/hep.23451>.
- Tariq, Mohammad, Akihiro Ito, Muhammad Ishfaq, Elliot Bradshaw, and Minoru Yoshida. 2016. "Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Is Essential for HIF-1 α Activation in Hypoxia." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470 (2): 417–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.024>.
- Tauc, Michel, Marc Cougnon, Romain Carcy, Nicolas Melis, Thierry Hauet, Luc Pellerin, Nicolas Blondeau, and Didier F Pisani. 2021. "The Eukaryotic Initiation Factor 5A (EIF5A1), the Molecule, Mechanisms and Recent Insights into the Pathophysiological Roles." *Cell and Bioscience* 11 (219). <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00733-y>.
- Toivola, Diana M., Guo Zhong Tao, Aida Habtezion, Jian Liao, and M. Bishr Omary. 2005. "Cellular Integrity plus: Organelle-Related and Protein-Targeting Functions of Intermediate Filaments." *Trends in Cell Biology* 15 (11): 608–17. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2005.09.004>.

- Tomayko, Mary M., and C. Patrick Reynolds. 1989. "Determination of Subcutaneous Tumor Size in Athymic (Nude) Mice." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24 (3): 148–54. <https://doi.org/10.1007/BF00300234>.
- Tong, Yufeng, Isaac Park, Bum Soo Hong, Lyudmila Nedyalkova, Wolfram Tempel, and Hee Won Park. 2009. "Crystal Structure of Human EIF5A1: Insight into Functional Similarity of Human EIF5A1 and EIF5A2." *Proteins* 75 (4): 1040–45. <https://doi.org/10.1002/PROT.22378>.
- Tsuchiya, Hiroyuki, and Goshi Shiota. 2021. "Immune Evasion by Cancer Stem Cells." *Regenerative Therapy* 17 (June): 20. <https://doi.org/10.1016/J.RETH.2021.02.006>.
- Usman, Saima, Naushin H. Waseem, Thuan Khanh Ngoc Nguyen, Sahar Mohsin, Ahmad Jamal, Muy Teck Teh, and Ahmad Waseem. 2021. "Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis." *Cancers* 13 (19). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13194985>.
- Varghese, Frency, Amirali B. Bukhari, Renu Malhotra, and Abhijit De. 2014. "IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples." *PloS One* 9 (5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0096801>.
- Viallard, Claire, and Bruno Larrivée. 2017. "Tumor Angiogenesis and Vascular Normalization: Alternative Therapeutic Targets." *Angiogenesis*. *Angiogenesis*. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>.
- Vićovac, L., and J. D. Aplin. 1996. "Epithelial-Mesenchymal Transition during Trophoblast Differentiation." *Cells Tissues Organs* 156 (3): 202–16. <https://doi.org/10.1159/000147847>.
- Vitis, Marco de, Francesco Berardinelli, and Antonella Sgura. 2018. "Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)." *International Journal of Molecular Sciences*. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms19020606>.
- Wang, Feng-wei, Xin-yuan Guan, and Dan Xie. 2013. "Roles of Eukaryotic Initiation Factor 5A2 in Human Cancer." *International Journal of Biological Sciences* 9 (10): 1013–20. <http://www.ijbs.com/v09p1013.htm>.
- Wang, Lu, and Ye Guang Chen. 2016. "Signaling Control of Differentiation of Embryonic Stem Cells toward Mesendoderm." *Journal of Molecular Biology*. *J Mol Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.013>.
- Wei, J-H, J-Z Cao, D Zhang, B Liao, W-M Zhong, J Lu, H-W Zhao, *et al.* 2014. "EIF5A2 Predicts Outcome in Localised Invasive Bladder Cancer and Promotes Bladder

- Cancer Cell Aggressiveness in Vitro and in Vivo." *British Journal of Cancer* 110 (7): 1767–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504366>.
- Wheelock, Margaret J., Yasushi Shintani, Masato Maeda, Yuri Fukumoto, and Keith R. Johnson. 2008. "Cadherin Switching." *Journal of Cell Science* 121 (Pt 6): 727–35. <https://doi.org/10.1242/JCS.000455>.
- Witsch, Esther, Michael Sela, and Yosef Yarden. 2010. "Roles for Growth Factors in Cancer Progression." *Physiology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>.
- Wolff, E. C., K. R. Kang, Y. S. Kim, and M. H. Park. 2007. "Posttranslational Synthesis of Hypusine: Evolutionary Progression and Specificity of the Hypusine Modification." *Amino Acids* 33 (2): 341–50. <https://doi.org/10.1007/S00726-007-0525-0>.
- Wolff, E. C., T. G. Kinzy, W. C. Merrick, and Myung Hee Park. 1992. "Two Isoforms of EIF-5A in Chick Embryo. Isolation, Activity, and Comparison of Sequences of the Hypusine-Containing Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 267 (9): 6107–13. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42668-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42668-3).
- Woolstenhulme, Christopher J, Shankar Parajuli, David W Healey, Diana P Valverde, E Nicholas Petersen, Agata L Starosta, Nicholas R Guydosh, W Evan Johnson, Daniel N Wilson, and Allen R Buskirk. 2013. "Nascent Peptides That Block Protein Synthesis in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10): E878-87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431150>.
- World Health Organization. 2022. "Cancer." 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Wu, Gao Qi, Yan Ming Xu, and Andy T.Y. Lau. 2020. "Recent Insights into Eukaryotic Translation Initiation Factors 5A1 and 5A2 and Their Roles in Human Health and Disease." *Cancer Cell International*. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01226-7>.
- Xie, Jian Jun, Li Yan Xu, Yang Min Xie, Hai Hua Zhang, Wei Jia Cai, Fei Zhou, Zhong Ying Shen, and En Min Li. 2009. "Roles of Ezrin in the Growth and Invasiveness of Esophageal Squamous Carcinoma Cells." *International Journal of Cancer* 124 (11): 2549–58. <https://doi.org/10.1002/IJC.24216>.
- Xu, Aiguo, David Li En Jao, and Kuang Yu Chen. 2004. "Identification of mRNA That Binds to Eukaryotic Initiation Factor 5A by Affinity Co-Purification and Differential

- Display.” *Biochemical Journal* 384 (3): 585–90.
<https://doi.org/10.1042/BJ20041232>.
- Xu, Jian, Samy Lamouille, and Rik Derynck. 2009. “TGF-Beta-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition.” *Cell Research* 19 (2): 156–72.
<https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.
- Yang, Fen, Luyang Sun, Qian Li, Xiao Han, Liandi Lei, Hua Zhang, and Yongfeng Shang. 2012. “SET8 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Confers TWIST Dual Transcriptional Activities.” *EMBO Journal* 31 (1): 110–23.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.364>.
- Yang, Jing, Parker Antin, Geert Berx, Cédric Blanpain, Thomas Brabletz, Marianne Bronner, Kyra Campbell, *et al.* 2020. “Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal Transition.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.
- Yang, Jing, Ji Nie, Xuelei Ma, Yuquan Wei, Yong Peng, and Xiawei Wei. 2019. “Targeting PI3K in Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials.” *Molecular Cancer* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0954-X>.
- Yilmaz, Mahmut, and Gerhard Christofori. 2009. “EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion.” *Cancer Metastasis Reviews* 28 (1–2): 15–33.
<https://doi.org/10.1007/S10555-008-9169-0>.
- Yuan, Salina, Robert J. Norgard, and Ben Z. Stanger. 2019. “Cellular Plasticity in Cancer.” *Cancer Discovery*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>.
- Zhang, Hanlin, Ghada Alsaleh, Jack Feltham, Yizhe Sun, Gennaro Napolitano, Thomas Riffelmacher, Philip Charles, *et al.* 2019. “Polyamines Control EIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence.” *Molecular Cell* 76 (1): 110-125.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.005>.
- Zhang, Jing, Xiao Li, Xiaorui Liu, Fujun Tian, Weihong Zeng, Xiaowei Xi, and Yi Lin. 2018. “EIF5A1 Promotes Epithelial Ovarian Cancer Proliferation and Progression.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 100 (April): 168–75.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.016>.
- Zhao, Guannan, Wenjing Zhang, Peixin Dong, Hidemichi Watari, Yuqi Guo, Lawrence M. Pfeffer, Gabor Tigyi, and Junming Yue. 2021. “EIF5A2 Controls Ovarian Tumor Growth and Metastasis by Promoting Epithelial to Mesenchymal Transition via the TGFβ Pathway.” *Cell and Bioscience* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00578-5>.

- Zheng, Xin, Lei Gao, Bo Tao Wang, Ping Shen, Xiang Fei Yuan, Lan Qiu Zhang, Lei Yang, Da Peng Zhang, Qi Zhang, and Xi Mo Wang. 2020. "Overexpression of EIF5A2 Is Associated with Poor Survival and Aggressive Tumor Biology in Gallbladder Cancer." *Histology and Histopathology* 35 (6): 579–87. <https://doi.org/10.14670/HH-18-186>.
- Zheng, Yuancai, Ping Li, Hang Huang, Xueting Ye, Wei Chen, Guodong Xu, and Fangyi Zhang. 2021. "Androgen Receptor Regulates EIF5A2 Expression and Promotes Prostate Cancer Metastasis via EMT." *Cell Death Discovery* 7 (1): 373. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00764-x>.
- Zhong, Xiulong, Hong Xiu, Yanan Bi, Hongmei Zhang, Laizhen Chang, and Huifeng Diao. 2020. "Targeting EIF5A2 Inhibits Prostate Carcinogenesis, Migration, Invasion and Metastasis in Vitro and in Vivo." *Bioengineered* 11 (1): 619–27. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1774993>.
- Zhou, Weiwei, Guangyu An, Ping Wei, and Wenming Chen. 2014. "Significance of P85 Expression as a Prognostic Factor for Patients with Breast Cancer." *Oncology Letters* 8 (4): 1657. <https://doi.org/10.3892/OL.2014.2359>.
- Zhu, Wei, Mu Yan Cai, Zhu Ting Tong, Sui Sui Dong, Shi Juan Mai, Yi Ji Liao, Xiu Wu Bian, *et al.* 2012. "Overexpression of EIF5A2 Promotes Colorectal Carcinoma Cell Aggressiveness by Upregulating MTA1 through C-Myc to Induce Epithelial - Mesenchymal Transition." *Gut* 61 (4): 562–75. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300207>.
- Zuk, Dorit, and Allan Jacobson. 1998. "A Single Amino Acid Substitution in Yeast EIF-5A Results in mRNA Stabilization." *EMBO Journal* 17 (10): 2914–25. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2914>.

CONTRIBUCIONES

1. PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Arantxa Martínez-Férriz, Alejandro Ferrando Monleón, Alihamze Fathinajafabadi, Rosa Farràs. (2021). **Ubiquitin-mediated mechanisms of translational control**. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2022 Dec; 132:146-154. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.12.009. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34952788.

Beatriz Pérez-Benavente, Alihamze Fathinajafabadi, Lorena de la Fuente, Carolina Gandía, **Arantxa Martínez-Férriz**, José Miguel Pardo-Sánchez, Lara Milián, Ana Conesa, Octavio A. Romero, Julian Carretero, Rune Matthiesen, Isabelle Jariel-Encontre, Marc Piechaczyk, Rosa Farràs (2022). **New roles for AP-1/JUNB in cell cycle control and tumorigenic cell invasion via regulation of cyclin E1 and TGF- β 2**. *Genome Biology* 23, 252 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02800-0>.

Arantxa Martínez-Férriz, Carolina Gandía, José Miguel Pardo-Sánchez, Alihamze Fathinajafabadi, Alejandro Ferrando Monleón, Rosa Farràs (2023). **Eukaryotic Initiation Factor 5A2 localizes in actively translating ribosomes to promote cell protrusions and invasion of cancer cells**. *Cell Commun Signal* 21, 54 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01076-6>.

2. PUBLICACIONES EN LIBROS

Alejandro Ferrando Monleón, Alihamze Fathinajafabadi, **Arantxa Martínez-Férriz**. Rosa Farràs. (2021). **Ribosomal Pauses during Translation and Proteostasis**. Proteostasis and Proteolysis (1 - 11). Routledge - Taylor & Francis Group. 9780367499327.

3. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES

a. 16th ASEICA INTERNATIONAL CONGRESS

Título del trabajo: Translational control of EMT by the Eukaryotic translation initiation factor 5A2 in cancer.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Valencia, Comunidad Valenciana, España

Fecha de celebración: 06/11/2018 al 08/11/2018

Entidad organizadora: Asociación Española de Investigaciones en Cáncer (ASEICA)

Autores: Arantxa Martínez Férriz; José Miguel Pardo Sánchez; Borja Belda Palazón; Alihamze Fathinajafabadi; Beatriz Pérez Benavente; Carolina Gandía; Jerónimo Forteza; Alejandro Farrando; Rosa Farràs.

b. The Final COST Action BM1307 Meeting: Proteostatic Mechanisms in Health and Disease

Título del trabajo: Roles of Eukaryotic Initiation Factor 5A2 in Lung Cancer.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Atenas, Grecia

Fecha de celebración: 22/02/2018 al 24/02/2018

Entidad organizadora: Proteostasis - COST

Autores: José Miguel Pardo Sánchez; **Arantxa Martínez Férriz**; Borja Belda Palazón; Beatriz Pérez Benavente; Juan Diego De Maya Gironés; Carolina Gandía; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs.

c. 42nd FEBS Congress “From molecules to cells and back”

Título del trabajo: Regulation of epithelial-mesenchymal transition by means of eIF5A2- dependent translational control.

Tipo de participación: Ponencia oral

Ciudad de celebración: Jerusalem, Israel

Fecha de celebración: 10/09/2017 al 14/09/2017

Entidad organizadora: Federation of European Biochemical Societies (FEBS)

Autores: José Miguel Pardo Sánchez; **Arantxa Martínez Férriz**; Juan Diego De Maya Gironés; Beatriz Pérez Benavente; Carolina Gandía; Borja Belda Palazón; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs Rivera.

Publicado en: The FEBS Journal. 284, pp. 87 - 88. FEBS PRESS - WILEY, 09/2017. ISSN 1742-464X.

d. 17th FEBS Young Scientists' Forum (YSF)

Título del trabajo: Regulation of epithelial-mesenchymal transition by means of eIF5A2- dependent translational control.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Jerusalem, Israel

Fecha de celebración: 07/09/2017 al 10/09/2017

Entidad organizadora: The FEBS Young Scientists' Forum (YSF)

Autores: José Miguel Pardo Sánchez; **Arantxa Martínez Férriz**; Juan Diego De Maya Gironés; Beatriz Pérez Benavente; Carolina Gandía; Borja Belda Palazón; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs Rivera.

e. 3rd PROTEOSTASIS Workshop: PROTEOSTASIS and its biological implications

Título del trabajo: Regulation of epithelial-mesenchymal transition mediated by translation factor eIF5A.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Lisboa, Portugal

Fecha de celebración: 11/2016

Entidad organizadora: Proteostasis - COST

Autores: José Miguel Pardo Sánchez; **Arantxa Martínez Férriz**; Juan Diego De Maya Gironés; Beatriz Pérez Benavente; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs Rivera.

4. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES

a. Jornada de la Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana (RAMCV) y la Junta Provincial de Valencia de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) 2022

Título del trabajo: Nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer de pulmón basadas en el control de la síntesis de proteínas mediada por poliaminas.

Nombre de la jornada: IV Symposium De Investigación Contra El Cáncer Valencia.

Tipo de participación: Ponencia oral

Ciudad de celebración: Valencia, Comunidad Valenciana, España

Fecha de celebración: 10/02/2022

Entidad organizadora: Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana y la AECC Junta Provincial Asociada de Valencia

Autores: **Arantxa Martínez Férriz.**

b. 43rd Annual Meeting of the Spanish Society of Biochemistry & Molecular Biology

Título del trabajo: Role of the spermidine-hypusine-eIF5A axis in cancer progression.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: On-line

Fecha de celebración: 19/07/2021 al 22/07/2021

Entidad organizadora: Spanish Society of Biochemistry & Molecular Biology

Autores: **Arantxa Martínez-Férriz**; José Miguel Pardo-Sánchez; Carolina Gandía; Alihamze Fathinajafabadi; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs.

c. Jornada de la Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana (RAMCV) y la Junta Provincial de Valencia de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) 2020

Título del trabajo: Nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer de pulmón basadas en el control de la síntesis de proteínas mediada por poliaminas.

Nombre de la jornada: Implementando la investigación de cáncer en Valencia: Jornada de presentación de proyectos de investigación.

Tipo de participación: Ponencia oral

Ciudad de celebración: Valencia, Comunidad Valenciana, España

Fecha de celebración: 04/02/2020

Entidad organizadora: Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana y la AECC Junta Provincial Asociada de Valencia

Autores: **Arantxa Martínez-Férriz**.

d. 2nd Educational Symposium ASEICA 2019 Arantxa

Título del trabajo: Role of the polyamine-hypusine-eIF5A in cancer progression.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Madrid, Comunidad de Madrid, España

Fecha de celebración: 28/11/2019 al 29/11/2019

Entidad organizadora: ASEICA

Autores: **Arantxa Martínez-Férriz**; José Miguel Pardo-Sánchez; Alihamze Fathinajafabadi Carolina Gandía; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs.

**e. III National Congress of Young Researchers in Biomedicine & IV
Congress of Biomedicine of PhD Students in Valencia**

Título del trabajo: Oncogenic Role of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A2.

Tipo de participación: Ponencia oral

Ciudad de celebración: Valencia, Comunidad Valenciana, España

Fecha de celebración: 24/04/2019 al 26/04/2019

Entidad organizadora: Organizing Committee ConBioPreVal

Autores: **Arantxa Martínez-Férriz**; Alihamze Fathinajafabadi; José Miguel Pardo-Sánchez; Carolina Gandía; Beatriz Pérez-Benavente; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs.

**f. III Encuentro de Investigadores de la Comunidad Valenciana en
Cáncer Ciudad de Alcoy: Investigar es Avanzar en la Lucha Contra
el Cáncer**

Título del trabajo: Eukaryotic Initiation Factor 5A2 promotes EMT and invasion in NSCLC.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Alcoy, Comunidad Valenciana, España

Fecha de celebración: 20/04/2018

Entidad organizadora: Universitat Politècnica de València

Autores: **Arantxa Martínez Férriz**; José Miguel Pardo Sánchez; Borja Belda Palazón; Beatriz Pérez Benavente; Juan Diego De Maya Gironés; Carolina Gandía; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs.

**g. II National Congress of Young Researchers in Biomedicine & IV
Congress of Biomedicine of PhD Students in Valencia**

Título del trabajo: eIF5A2 regulates formin expression and lung cancer cell differentiation.

Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Valencia, Comunidad Valenciana, España

Fecha de celebración: 23/11/2017 al 24/11/2017

Entidad organizadora: Organizing Committee ConBioPreVal

Autores: **Arantxa Martínez Férriz**; José Miguel Pardo Sánchez; Juan Diego De Maya Gironés; Beatriz Pérez Benavente; Carolina Gandía; Borja Belda Palazón; Alejandro Ferrando; Rosa Farràs.

ANEXO

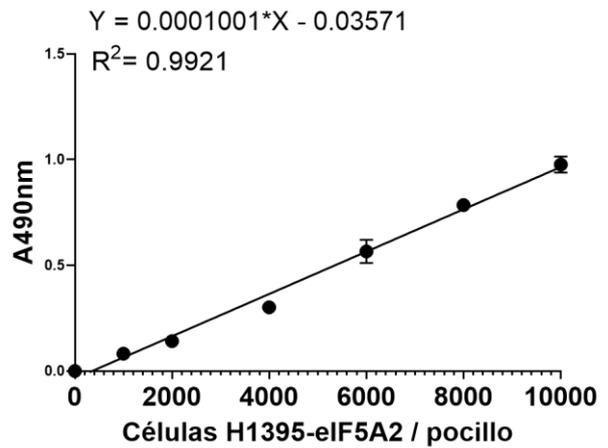
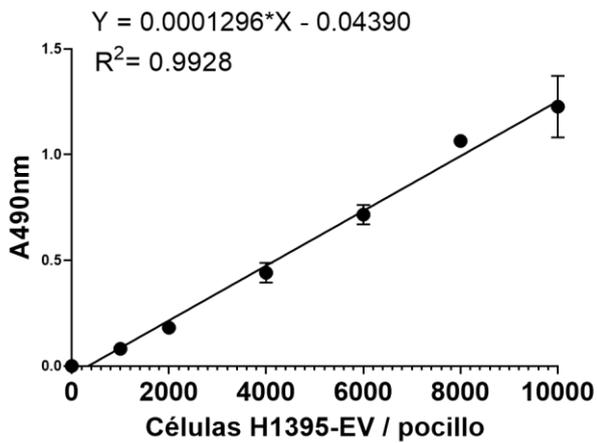


Figura S1. Comprobación de la linealidad entre la densidad celular y la absorbancia a 490nm por MTS. Los ensayos de viabilidad por MTS en células H1395-EV y H1395-eIF5A2 se realizaron 72 h después de sembrar 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 8.000 y 10.000 por pocillo. Las medias experimentales (N=3 con triplicados experimentales) de absorbancia a 490nm se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple.

>sp|P02751|FINC_HUMAN Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1
PE=1 SV=5

MLRGP GPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSKRQAQQMVQPQSPVAVSQSKPGCYDNGKH
YQINQQWERTYLGNALVCTCYGGSRGFNCEKPEAEETCFDKYTGNTYRVGDTYERPKDSMI
WDCTCIGAGRGRISCTIANRCHEGGQSYKIGDTWRRPHETGGYMLECVCLGNGKGEWTCK
PIAEKCFDHAAGTSYVVGETWEKPYQGMMVDCTCLGEGSGRITCTSRNRCNDQDTRTSY
RIGDTWSKKDNRGNLLQCICTGNRGEWK CERHTSVQTTSSSGSPFTDVRAAVYQPQPHP
Q**PPP**YGHCVTDSGVVY SVGMQWLKTQGNKQMLCTCLGNGVSCQETA VTQT YGGNSNGEPC
VLPFTYNGRTFY SCTTEGRQDGH LWCS TTSNYEQDQKYSFCTDHTVLVQTRGGNSNGALC
HFPFLYNNHNYTDCTSEGRRDNMKWCGTTQNYDADQKFGFCPMAAHEEICTTNEGVMYRI
GDQWDKQHDMMRCTCVGNRGEWTCIAYSQLRDQCI VDDITYNVNDTFHKRHEEGHM
LNCTCFGQGRGRWKCDPVDQCQDSETGTFYQIGDSWEKYVHGVRVYQCYCYGRGIGEWHCQ
PLQTYPSSSGPVEVFITETPSQPNSHPIQWNAPQPSHISKYILRWRPKNSVGRWKEATIP
GHLNSYTIKGLKPGVVYEGQLISIQQYGHQEVTRFDFTTTSTSTPVTSNTVTGETTPFSP
LVATSESVTEITASSFVVSWSASDTVSGFRVEYELSEEGDEPQYLDLPSTATSVNIPDL
LPGRKYIVNVYQISEDGEQSLILSTSQTAPD**APPD**TTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITG
YRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPGVQYNIT IYAVEENQESTPVVIQQETT
GTPRSDTVPSPRDLQFVEVTDVKVTIMWTPPESAVTGYRVDVIPVNLPGEHGQRLPISRNT
FAEVTGLSPGVTYFYFKVFAVSHGRESKPLTAQQTTKLDAPTNLQFVNETDSTVLVRWTPP
RAQITGYRLTVGLTRRQPRQYNVGPSVSKYPLRNLQPA SEYTVSLVAIKGNQESPKATG
VFTTLQPGSSIPPYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGV RPSQGGEAPREVTSDSGSIVV
SGLTPGVEYVYTIQVLRDQGERDAPIVNVVTPLSPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTT
PDITGYRITTTPTNGQQGNSLEEVVHADQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPI
S DTI IPEVPQLTDL SFVDITDSSIGLRWTP LNSSTIIGYRITVVAAGEGPIFEDFVDSV
GYT VTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQTAV**PPP**TDLRFTNIGPDTMRVTWAP
PPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSI SPSDNAVVLTNLLPGTEYVVS SVSVEYQHESTP
LRGRQKTGLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHS
RNSITLTLNLT PGTEYVVSIVALNGREESPLLI GQQSTVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWD
APAVTVRYRITYGETGGNSPVQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDS
PA SSKPISINYRTEIDKPSQM QVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTTPKNGPGPTKTKT
AGPDQTEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPSGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTD VDVDSIK
IAWESPGQVSR YRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAE LQGLRPGSEYTVSVVALHDDM
ESQPLIGTQSTAI PAPTDLKFTQVTP TSLSAQWT**PPN**VQLTGYRV RVT PKEKTGPMKEIN
LAPDSSSVVVSGLMVATKYEVSVA LKDTLTSRPAQGVVTTLENVS**PPR**RARVTDATETT
ITISWRKTETITGFQVDAVPANGQTPIQRTIKPDVRSY TITGLQPGTDYKIYLYTLNDN
ARSSPVVIDASTAIDAPSNL RFLATTPNSLLVSWQ**PPR**ARITGYIIKYEKPGS**PPR**EVV
RPRPGVTEATITGLEPGTEYTIYVIALKNNQKSEPLIGRKKTDEL PQLVTLPHPNLHGPE
ILDVPSTVQKTPFVTHPGYDTGNGIQLPGTSGQQPSVGGQMI FEEHGFRRTTPPTTATPI
RHRPRPY**PPN**VGEEIQIGHI PREDVDYHLYPHGPGLNPNASTGQEALSQTTISWAPFQDT
SEYIISCHPVGTDEEPLQFRVPGTSTSATLTGLTRGATY NVIVEALKDQQRHKVREEVVT
VGN SVNEGLNQPTDDSCFDPYTVSHYAVGDEWERMSESGFKLLCQCLGFGSGHFRCDSR
WCHDNGVNYKIGEKWDRQGENGQMMSCTCLGNGKGEFKCDPHEATCYDDGKTYHVGEQWQ
KEYLGAIC SCTCFGGQRGWRCDNCR RPPGGEPSPEGTTGQSYNQYSQRYHQRTNTNVNCP
IECFMPLDVQADREDSRE

>sp|P12830|CADH1_HUMAN Cadherin-1 OS=Homo sapiens OX=9606
GN=CDH1 PE=1 SV=3

MGPWSRSL SALLLLQVSSWLCQEPEPCHPGFDAESYFTVPRRHLEGRVLRVNFEDC
TGRQRTAYFSLDTRFKVGTGVTIVKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTLNVTG
HHHR**PPH**HQASVSGIQAELLTFPNSSPGLRRQKRDWVI PPI SCPENEGPFPKNLVQIKS
NKDKEGKVFYSITGQGADTPPVGVFIIERETGWLKVTEPLDRERIATYTLFSHAVSSNGN
AVEDPMEILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYNAAI
AYTILSQDPELPDKNMFTINRNTGVISVVTGLDRESFPTYTLVVQAADLQGEGLSTTAT
AVITVTDNDNPPIFNPTTYKQVPENEANVVITTLKVTDADAPNTPAWEAVYTI LNDDG
GQFVVTTNPVNDGILKTAKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTVDVLVDV
NEAPIFVPPEKRVESDFGVGQEI SYTAQEPDTFMEQKIT YRIWRDTANWLEINPDTG
AISTRAELDREDFEHVKNSTY TALIIATDNGSPVATGTG TLLLILSDVNDNAPIPEPRTI
FFCERNPKPQVINIIDADL**PPN**TSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESIILKPKMALEV
GDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGILAL
LILILLLLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARP
EVTRNDVAPTLMSPRYLPRPANPDEIGNFIDENLKAADTDPT**APP**YDSSLVFDYEGSGS
EAASLSSLNSESDDKQDYDYLNEWGNRFKLLADMYGGGEDD

>sp|P19022|CADH2_HUMAN Cadherin-2 OS=Homo sapiens OX=9606
GN=CDH2 PE=1 SV=4

MCRIAGALR TLLPLLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVKFSNCN
GKRKVQYESSEPADFKVDEEDGVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQVAVKLSLKPTLTE
ESVKESAEVEEIVFPRQFSKHSGHLQKQKRDWVI PPI NL PENS RGFPPQELVRI RSDRDKNLSL
RYSVTGPGADQPPTGIFII NPISGQLSVTKPLDREQIARFHLRAHAVDINGNQVENPIDIVINV
IDMNDNRPEFLHQVWNGTVPEGSKPGTYVMTVTAIDADDPNALNGMLRYRIVSQAPSTPSPNMF
TINNETGDIITVAAGLDREKVQYTLIIQATDMEGNPTYGLSNTATAVITVTDVNDNPPEFTAM
TFYGEV PENRVDIIVANLTVTDKQPHTPAWN AVYRISGGDPTGRFAIQ TDPNSNDGLVTVVKP
IDFETNRMFVLTVA AENQVPLAKGIQH**PPQ**STATVSVTVIDVNENPYFAPNPKIIRQEEGLHAG
TMLTTFTAQDPDRYMQQNIRYTKLSDPANWLKIDPVNGQITTI AVL DRESPNVKNNIYNATFLA
SDNGIPPM SGTGTLQIYLLDINDNAPQVLPQEAETCETPD P NSINITALDYDIDPNAGPFAFDL
PLSPVTIKRNWTITRLNGDFAQLNLKIKFLEAGIYEVPIIITDSGNPPKSNISILRVKVCQCD
NGDCTDVDRIVGAGLGTGAI IAILLCIIILLILVLMFVVMKRRDKERQAKQLLIDPEDDVRDN
ILKYDEEGGGEEDQDYDLSQLQQPDTVEPDAIKPVGIRRM DERPIHAEPQYPVRS AAPH PGDIG
DFINEGLKAADNDPT**APP**YDSSLVFDYEGSGSTAGSLSSLN SSSSGGEQDYDYLNDWGRPFKLL
ADM YGGGDD

>sp|P08670|VIME_HUMAN Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM
PE=1 SV=4

MSTRSVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSRSYVTTSTRTYSLGSALRPSTSRSLYASSPGGV
YATRSSAVRLRSSVPGVRLQLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDRFANYIDK
VRFLEQQNKILLAELEQLKGQKSR LGDLYEEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVERDNLAE
DIMRLREKLQEEMLQREEAENTLQSFRQDV DNASLARLDL ERKVESLQEEIAFLKKLHEE
EIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRQQYESVA AKNLQEAEEWYKSKFADLSE
AANRNNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDAL KGTNESLERQMREMEENFAVEAANYQD
TIGRLQDEIQNMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATYRKLLEGEESRISLPLPNFSS
LNLRETNLDSLPLVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLE

>sp|Q9Y613|FHOD1_HUMAN FH1/FH2 domain-containing protein 1
OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FHOD1 PE=1 SV=3

MAGGEDRGRDGEVSVVTVRVQYLEDTDPFACANFPEPRRAPTCSLDGALPLGAQIPAVHR
LLGAPLKLEDCALQVSPSGYYLDTELSLEEQREMLEGFYEEISKGRKPTLILRTQLSVRV
NAILEKLYSSSGPELRRSLFSLKQIFQEDKDLVPEFVHSEGLSCLIRVGAAADHNYQSYI
LRALGQLMLFVDGMLGVVAHSDTIQWLYTLCASLSRLVVKTALKLLLLVFVEYSENNAPLF
IRAVNSVASTTG**APPWAN**LVSILEEKNGADPELLVYTVTLINKTLAALPDQDSFYDVTDA
LEQQGMEALVQRHLGTAGTDVDLRTQLVLYENALKLEDGDIEEAPGAGGRRERRKPSSEE
GKRSRRSLEGGGCPARAPEPGPTGPASVPGPTSSTGPALLTGPASSPV**GPP**SGLQASVNL
FPTISVAPSADTSSERSIYKARFLENVAAAETEKQVALAQGRAETLAGAMPNEAGGHPDA
RQLWDSPETAPAARTPQSPAPCVLLRAQRSLAPEPEKEPLIPASPKAEPIWELPTRAPRLS
IGDLDFSDLGEDEDQDMLNVESVEAGKDI PAPSPLPLLSGV**PPPPPLPPPPPIKGPFP**
PPPLPLAAPLPHSVPDSSALPTKRKTVKLFWRELKLAGGHGVSASRFGPCATLWASLDPV
SVDTARLEHLFESRAKEVLPSSKAGEGRRMTTTLVDPKRSNAINIGLTTLPVHVIKAAL
LNFDEFVAVSKDGIKLLTMMPTTEERQKIEEAQLANPDIPLGPAENFLMTLASIGGLAAR
LQLWAFKLDYDSMEREIAEPLFDLKVGMELVQVQATFRCLATLLAVGNFLNGSQSSGFE
LSYLEKVSEVKDTRRQSLHHLCSLVLQTRPESSDLYSEIPALTRCAKVDQFELTENLG
QLERRSRAAEESLRSLAKHELAPALRRLTHFLDQCARRVAMLRIVHRRVCNRFHAFLLY
LGYTPQAAREVRIMQFCHTLREFALEYRTCRERVLQQQKQATYRERNKTRGRMITETEK
FSGVAGEAPSNPSVPVAVSSGPGRGDADSHASKSLLTSRPEDTTHNRRSRGMVQSSSPI
MPTVGPSTASPE**EP**PGSSLSPTSDEIMDLLVQSVTKSSPRALAARERKRSRGNRKSRLR
TLKSGLGDDLVQALGLSKGPGLEV

>sp|P27986|P85A_HUMAN Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory
subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIK3R1 PE=1 SV=2

MSAEGYQYRALYDYKKEREEDIDLHLGDI LTVNKGSLVALGFSDGQEARPEEIGWLNQYN
ETTGERGDFPGTYVEYIGRKKISPPTPKPR**PPR**PLPVAPGSSKTEADVEQQALTLPLDLAE
QF**APPDIAPP**LLIKLVEAIEKKGLECESTLYRTQSSSNLAELRQLLDCDTPSVLEMIDVH
VLADAFKRYLLDLPNPVI PAAVYSEMI SLAPEVQSSEYIQLLKKLIRSPSIPHQYWLTL
QYLLKHFFKLSQTSSKNLLNARVLSEIFSPMLFRFSAASSDNTENLIKVIEILISTEWNE
RQPAPALPPKPKPTTVANNGMNNMNSLQDAEWYWGDISREEVNEKLRDADGTFLVRDA
STKMHGDYTLTLRKGGNNKLIKIFHRDGKYGFS DPLTFSSVVELINHYRNESLAQYNPKL
DVKLLYPVSKYQQDQVVKEDNIEAVGKKLHEYNTQFQEKREYDRLYEYTRTSQEI QMK
RTAIEAFNETIKIFEEQCQTQERYSKEYIEKFKREGNEKEIQRIMHNYDKLSRISEIID
SRRRLEEDLKKQAAEYREIDKRMNSIKPDLIQLRKTRDQYLMWLTQKGVQRKKNLNEWLGN
ENTEDQYSLVEDDEDLPHHDEKTWNVGSSNRNKAENLLRGKRDGTFLVRESSKQGCYACS
VVVDGEVKHCVINKTATGYGFAEPYNLYSSSLKELVLHYQHTSLVQHNDLNVTLAYPVYA
QQR

>sp|Q13330|MTA1_HUMAN Metastasis-associated protein MTA1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTA1 PE=1 SV=2

MAANMYRVGDYVYFENSSSNPYLIRRIEELNKTANGNVEAKVVCFYRRRDISSTLIALAD
KHATLSVCYKAGPGADNGEEGEIEEEMENPEMVDLPEKCLKHQLRHRELFLSRQLES LPAT
HIRGKCSVTLLNETESLKSYLEREDFFFYSLVYDPQOKTLLADKGEIRVGNRYQADITDL
LKEGEEDGRDQSRLETQVWEAHNPLTDKQIDQFLVVARSVGTFARALDCSSSVRQPSLHM
SAAAASRDITLHFAMDTLHKNIYDISKAISALVPQGGPVLCDMEEWSASEANLFEEAL
EKYGKDFTDIQDQDFLPWKSLSIIEYYMWKTTDRYVQQKRLKAAEAESKCLKQVYIPNYN
KPNPNQISVNNVKAGVVNGTGAPGQSPGAGRACESCYTTQSYQWYSWGPPNMQCRLCASC
WTYWKYGGGLKMPTRLGDGERPGPNRSNMSPHGLPARSSGSPKFAMKTRQAFYLHTTKLTR
IARRLCREILRPWHAARHPYLPINSAAIKAECTARLPEASQSPLVLKQAVRKPPEAVLRY
LETHPRPPKPDVKS SVSSVLSLTPAKVAPVINNGSPTILGKRSYEQHNGVDGNMKKRLL
MPSRGLANHGQARHMGPSRNLLNGKSYPTKVRLIRGGSLPPVKRRRMNWIDAPDDVFYM
ATEETRKRIRKLLSSSETKRAARRPYKPIALRQSQALPPRPPPPAPVNDEPIVIED

>sp|P15311|EZRI_HUMAN ezrina OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EZR PE=1 SV=4

MPKPINVRVTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTI GLREVWYFGLHYVDNKGFPPTWLK
LDDKVSQAQEVKRNPLQFKFRAKFPYEDVAEELIQDITQKLFLLQVKEGILSDEIYCPPE
TAVLLGSYAVQAKFGDYNKEVHKSGYLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAHR
GMLKDNAMLEYLKI AQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGV DALGLNIYEKDDKLT PKIGF
PWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVFYAPRLRINKRILQLCMGNHELYMRRRKPDTI
EVQQMKAQAREEKHQKQLERQQLETEKKRRETVEREKEQMMREKEELMLRLQDYEEKTKK
AERELSEQIQRALQLEERKRAQEEAERLEADRMAALRAKEELERQAVDQIKSQEQLAEE
LAEYTAKIALLEEARRRKEDEVEEWQHRAKEAQQDDL VKTKEELHLVMTAPPPPPPVYEP
VSYHVQESLQDEGA EPTGYS AELSSEGIRDDRNEEKRI TEAEKNERVQRQLLTLSS ELSQ
ARDENKRTHNDIIHNENMRQGRDKYKTLRQIRQGNTKQRIDEFEAL

>sp|O95863|SNAI1_HUMAN Zinc finger protein SNAI1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNAI1 PE=1 SV=2

MPRSFLVRKPSDPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLLAAI PPP EILNPTASLPMLI
WDSVLAPQAQPIAWASLR LQESPRVAELTSLSD EDSGKGSQPPSPSPAPSSFSSTSVSS
LEAEAYAAFPGLGQVPKQLAQLSEAKDLQARKAFNCKYCNKEYLSLGALKMHIRSH TLPC
VCGTCGKAFSRPWLLQGHVRTH TGEKPFSCPHCSRAFA DRSNLRAHLQTHSDVKKYQCQA
CARTFSRMSLLHKHQESGCSG CPR

Figura S2. Secuencia proteica de fibronectina, E-cadherina, N-cadherina, vimentina, FHOD1, p85, MTA1 ezrina y SNAI1. Los motivos de prolina consecutivos están marcados en rojo en las secuencias.