



**Programa de Doctorado en  
Señalización Celular**

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
APTÁMEROS FRENTE A LA HISTONA  
ACETILTRANSFERASA 1 (HAT1).  
POTENCIAL USO TERAPÉUTICO EN  
CÁNCER DE PULMÓN**

**Tesis Doctoral presentada por  
José Ignacio Klett Mingo**

Directores:

Dra. María Elena Martín Palma

Dr. Víctor Manuel González Muñoz

Dra. María del Val Toledo Lobo

Alcalá de Henares, 2022

---



El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid (durante los años 2018-2022). Su desarrollo ha sido posible gracias a la concesión de un contrato de Personal Técnico de Apoyo del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (PTA2016-13335-I).



*A Celia, Nora y Sergio*

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.*  
**Albert Einstein**



## AGRADECIMIENTOS

Aunque estén al principio, escribo estas líneas cuando termino este trabajo porque es cuando, mirando atrás, puedo valorar las aportaciones y el esfuerzo que todos los que aparecéis a continuación habéis hecho para acompañarme en este viaje. Como todos sabéis, no ha sido un camino fácil, ni breve, ya que llevo mucho tiempo luchando por llegar hasta aquí y, por fin, lo he conseguido, ¡he escrito mi tesis! Os puedo asegurar que yo solo no habría podido hacerlo y por eso, quiero daros las gracias. Este trabajo es de todos vosotros.

Quiero empezar agradeciendo a mis directores de tesis del hospital, la Dra. María Elena Martín y el Dr. Víctor Manuel González, por darme la oportunidad de realizar esta tesis cuando estaba a punto de darme por vencido, por abrirme los ojos y engancharme al maravilloso mundo de los aptámeros, por la paciencia que habéis mostrado con mis lagunas, por los conocimientos adquiridos en estos años, no solo de ciencia y, sobre todo, por la cercanía que me habéis mostrado en todo momento. Gracias a vosotros me veo preparado para afrontar próximos desafíos en el mundo de la ciencia, y en la vida en general.

A mi otra directora, la Dra. María del Val Toledo, de la UAH, por ayudarme tantísimo con esas apetecibles charlas de ciencia sobre HAT1 y cáncer, por abrirme las puertas de tu laboratorio de par en par, por confiar tanto en mí y, especialmente, por valorarme tanto.

A toda la gente del laboratorio, los que están y los que se fueron, del pasillo de bioquímica e investigación del hospital Ramón y Cajal de las plantas -1, -2 y -3, donde hay gente maravillosa y muy válida en su trabajo. También en los demás departamentos del hospital donde he realizado alguna rotación.

A toda la gente de la fundación y de la comisión de igualdad, de la que he formado parte, especialmente a Clara y Esther, dos personas maravillosas, entregadas y capaces de hacer cualquier cosa que se propongan, que han apostado por mí y a las que debo mucho. De vosotras me llevo muchas lecciones de vida.

A todos los compañeros del grupo de aptámeros, que han sido de gran ayuda en este viaje, ya sea con consejos y enseñanzas, con ayuda en los experimentos o con momentos de risa y distracción. Lo he pasado muy bien durante todos estos años, y es gracias a vosotros: Víctor, Elena, Celia, Gero, Miguel, Marta, Miriam, Maripili (algunos la llaman Maribel), Rebeca, Valerio, Silvia, Ana G, Ana S, Raquel, Alberto, Cristina, Esther y al grupo del Dr. Alberto Alcázar, Merche, Emma, Alejandro y Lorena. Al final, tanto tiempo juntos os ha convertido en mi segunda familia. Si hoy soy un buen científico es por vosotros.

He de destacar a unas personas que, sin saber muy bien cómo, se han convertido en personas fundamentales en mi vida, y las tengo que hacer un agradecimiento especial. A lo largo de estos años os he ido descubriendo poco a poco, y me he dado cuenta de lo que valéis, para cualquier cosa que os propongáis. Además de hacerme algún que otro ensayo (no tantos como decís...), me habéis ayudado en muchísimos momentos difíciles y, sobre todo, me lo he pasado muy bien con vosotras. Rebe, Miri, Esther, Ana, sois increíbles, muchas gracias chicas.

Por supuesto, gracias a mis amigos, especialmente a ti, Álex, por muchas cosas, entre ellas por hacerme mejor científico, ya que para discutir contigo hay que documentarse bien... Gracias también a Paco, por tus ánimos, tus detalles conmigo (tengo entretenimiento para unos cuantos años), y por esta portada preciosa que me has diseñado.

Gracias también a mis padres, hermanos, cuñados, sobrinos y a mi familia política, sin vuestro apoyo no sería quien soy, y no estaría donde estoy. Julio, gracias también por ayudarme con el análisis de datos. Nos esperan grandes cosas juntos, estoy seguro.

Gracias a mis niños, Nora y Sergio, con los que aprendo cada día nuevas lecciones, y con los que me puedo evadir del mundo solo para disfrutar de su compañía. Veros crecer es el mejor regalo.

Y, por último, gracias a la persona más especial de mi vida, que se merece más de la mitad de este trabajo, y sin la que no hubiera sido capaz de hacer esto, Celia. Podría escribir otra tesis solo con las cosas que tengo que agradecerte. Gracias por ser como eres, por tu apoyo incondicional, por guiarme y ayudarme a no salir del camino y, sobre todo, por crear juntos esta familia tan bonita. Lo eres todo para mí, por eso te dedico no solo este trabajo, sino mi vida entera.



---

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
1. <b>BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN.....</b>	<b>17</b>
1.1. Clasificación del cáncer de pulmón .....	17
a) Tumores neuroendocrinos .....	18
1) Cáncer de célula pequeña o microcítico .....	18
2) Carcinoma neuroendocrino de células grandes.....	18
3) Tumores carcinoides .....	18
b) Cáncer de célula no pequeña o no microcítico.....	18
1) Adenocarcinoma.....	19
2) Carcinoma de célula escamosa.....	19
3) Carcinoma de célula grande .....	19
1.2. Factores de riesgo del cáncer de pulmón.....	20
1.3. Tratamiento del cáncer de pulmón .....	21
a) Cirugía .....	22
b) Quimioterapia.....	22
c) Radioterapia.....	22
d) Medicina personalizada. Inmunoterapia .....	22
2. <b>PROCESOS EPIGENÉTICOS: EL CONTEXTO DE HAT1 .....</b>	<b>23</b>
2.1. Epigenética y cáncer .....	23
2.2. Modificaciones postraduccionales de histonas.....	24
2.3. Acetilación de histonas.....	24
2.4. Histona acetiltransferasa 1 .....	25
a) Sustratos y localización de HAT1 .....	26
b) Complejos que forma HAT1 .....	28
c) Funciones de HAT1 .....	31
d) Desregulación de HAT1 .....	34
e) HAT1 en cáncer .....	37
f) Inhibidores de HAT1 .....	40
3. <b>APTÁMEROS COMO HERRAMIENTAS TERAPEÚTICAS .....</b>	<b>41</b>
3.1. Enriquecimiento exponencial en presencia de ligando. Método SELEX.....	42
3.2. Estructura de los aptámeros.....	44
3.3. Comparativa Aptámero-Anticuerpo .....	45
3.4. Usos de los aptámeros.....	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
MATERIALES .....	57
METODOLOGÍA.....	61
1. INMUNOHISTOQUÍMICA DE TEJIDOS DE PULMÓN .....	61
2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE HAT1 RECOMBINANTE .....	62
2.1. Subclonaje del cDNA de HAT1 en un plásmido pQE-30 .....	62
2.2. Expresión de His-HAT1 en bacterias .....	64
2.3. Purificación de la proteína His-HAT1 .....	65
3. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS .....	65
3.1. Selección <i>in vitro</i> (SELEX) .....	65
3.2. Clonaje de aptámeros y secuenciación Sanger .....	67
3.3. Secuenciación masiva .....	67
3.4. Ensayo enzimático en placa con aptámeros (ELONA) .....	67
3.5. Análisis de la evolución de la población por PCR a tiempo real .....	68
3.6. Western blot y aptawestern blot.....	69
3.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	69
3.6.2. Transferencia de proteínas e inmunodetección .....	69
3.7. Ensayos de actividad HAT1 <i>in vitro</i> .....	71
3.8. Ensayo de estabilidad en plasma humano.....	71
4. CULTIVOS CELULARES.....	72
4.1. Líneas celulares eucariotas .....	72
4.2. Localización intracelular de los aptámeros por microscopía confocal .....	73
4.3. Transfección y procesamiento celular .....	73
4.3.1. Transfección de células .....	73
4.3.2. Obtención de lisados celulares .....	74
4.4. Ensayos de viabilidad celular. Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT) .....	74
4.5. Determinación de la citotoxicidad celular por LDH .....	75
4.6. Ensayos de ciclo celular .....	75
4.7. Ensayos de formación de colonias.....	75
4.8. Análisis de los niveles de ARN mensajero .....	76
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	77
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HAT1 EN CÁNCER DE PULMÓN .....	81
1.1. Expresión de la proteína HAT1 en tumores pulmonares.....	81
1.1.1. Análisis bioinformático.....	81
1.1.2. Análisis inmunohistoquímico .....	85

---

1.2. Niveles de expresión de la proteína HAT1 en 3 líneas celulares de pulmón.....	90
2. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE APTÁMEROS FRENTE A HAT1.....	91
2.1. Selección <i>in vitro</i> de aptámeros frente a HAT1.....	91
2.2. Obtención de secuencias únicas con reconocimiento específico de HAT1.....	92
2.2.1. Clonaje y secuenciación Sanger .....	92
2.2.2. Secuenciación de Nueva Generación (NGS) .....	93
2.3. Caracterización estructural y optimización de los aptámeros seleccionados .....	95
2.4. Caracterización de la interacción de los aptámeros seleccionados con HAT1....	97
2.5. Ensayos de inhibición de la actividad HAT1 <i>in vitro</i> por parte de los aptámeros seleccionados .....	98
2.6. Estudio de estabilidad en plasma humano .....	99
2.7. Localización subcelular de los aptámeros en dos líneas celulares de pulmón..	100
3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS APTÁMEROS SOBRE LA TUMOROGÉNESIS EN LÍNEAS CELULARES .....	101
3.1. Actividad antitumorogénica de los aptámeros .....	101
3.1.1. Toxicidad de los aptámeros en las líneas celulares HepG2 y HL60 .....	101
3.1.2. Efecto de los aptámeros sobre la proliferación celular y la necrosis en células tumorales de pulmón.....	102
3.1.3. Efecto de apHAT610 sobre el ciclo celular en células tumorales de pulmón .....	105
3.1.4. Efecto de apHAT610 sobre la apoptosis en células tumorales de pulmón.....	106
3.2. Actividad anticlonogénica de apHAT610 en células tumorales de pulmón .....	107
3.3. Efecto inhibitorio de apHAT610 sobre la actividad HAT1 en células tumorales de pulmón.....	108
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>

## Índice de Figuras y Tablas

<b>Figura 1.</b> Histogénesis de tipos histológicos de cáncer de pulmón .....	20
<b>Figura 2.</b> Estructura del cristal de HAT1 .....	27
<b>Figura 3.</b> Complejos que forma HAT1 .....	30
<b>Figura 4.</b> Entrada de HAT1 en el núcleo .....	31
<b>Figura 5.</b> Papeles de HAT1 durante la fase S del ciclo celular .....	32
<b>Figura 6.</b> Participación de HAT1 en la inflamación y en la infección viral .....	35
<b>Figura 7.</b> Regulación de HAT1 por parte de miR-486 .....	37
<b>Figura 8.</b> Relación de HAT1 con diferentes biomarcadores en cáncer .....	39
<b>Figura 9.</b> Esquema del proceso SELEX .....	43
<b>Figura 10.</b> Expresión y purificación de la proteína His-HAT1 recombinante .....	65
<b>Figura 11.</b> Expresión de HAT1 en diferentes tipos de tumores.....	81
<b>Figura 12.</b> Expresión de HAT1 en cáncer de pulmón .....	83
<b>Figura 13.</b> Relación de la sobreexpresión de HAT1 con la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón .....	84
<b>Figura 14.</b> Inmunohistoquímica para HAT1 en muestras de pacientes sin antecedentes de cáncer de pulmón y en muestras de tejido peritumoral .....	86
<b>Figura 15.</b> Niveles de HAT1 en tejidos pulmonares.....	88
<b>Figura 16.</b> Inmunohistoquímica para HAT1 en tumores pulmonares y tejido peritumoral de cada paciente .....	89
<b>Figura 17.</b> Niveles de HAT1 en líneas celulares de pulmón .....	90
<b>Figura 18.</b> Estudio de la evolución de la selección .....	92
<b>Figura 19.</b> Estudio de la afinidad de las cadenas F y R de los aptámeros.....	93
<b>Figura 20.</b> Análisis de la Secuenciación masiva de las rondas 3 y 6 de la selección de aptámeros frente a HAT1.....	94
<b>Figura 21.</b> Ejemplo del clúster de apHAT63 de la ronda 3.....	95
<b>Figura 22.</b> Estructuras secundarias y <i>G-quadruplex</i> .....	96
<b>Figura 23.</b> Caracterización de la interacción de los aptámeros seleccionados con HAT1....	98
<b>Figura 24.</b> Ensayo de actividad HAT1 con aptámeros.....	99
<b>Figura 25.</b> Estabilidad de los aptámeros en plasma humano.....	100
<b>Figura 26.</b> Estudio de la localización de los aptámeros apHAT63 y apHAT610 en las células .....	101
<b>Figura 27.</b> Medida de la actividad MTT. ....	102
<b>Figura 28.</b> Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT y LDH de las líneas celulares de pulmón.....	103

---

<b>Figura 29.</b> Efecto de apHAT610 sobre el crecimiento de las células de las 3 líneas de estudio .....	104
<b>Figura 30.</b> Estudio del efecto de apHAT610 sobre el ciclo celular de las líneas de pulmón .....	105
<b>Figura 31.</b> Efecto de apHAT610 sobre la apoptosis en las líneas celulares de pulmón .....	106
<b>Figura 32.</b> Efecto de apHAT610 sobre la capacidad clonogénica de las células .....	107
<b>Figura 33.</b> Efecto de apHAT610 sobre los niveles de acetilación de la histona H4 a las 24 horas y a las 72 horas post-transfección.....	108
<b>Figura 34.</b> Efecto de apHAT610 sobre los niveles de HAT1 a las 24 horas y a las 72 horas post-transfección .....	109
<b>Figura 35.</b> Efecto de apHAT610 sobre los niveles de ARN mensajero de HAT1 .....	110
<b>Figura 36.</b> Modelo de evolución de una selección.....	116
<b>Tabla I.</b> Clasificación de los diferentes tipos de cáncer de pulmón. ....	21
<b>Tabla II.</b> Clasificación de las principales HATs en mamíferos.....	26
<b>Tabla III.</b> Listado de las principales ventajas de aptámeros frente a anticuerpos.....	46
<b>Tabla IV.</b> Aptámeros con aplicación terapéutica aprobados o en ensayos clínicos.....	48
<b>Tabla V.</b> Relación de oligonucleótidos empleados.....	59
<b>Tabla VI.</b> Relación de anticuerpos primarios utilizados.....	59
<b>Tabla VII.</b> Relación de anticuerpos secundarios empleados.....	60
<b>Tabla VIII.</b> Relación de aptámeros utilizados .....	60
<b>Tabla IX.</b> Programa de PCR utilizado para amplificar HAT1 .....	63
<b>Tabla X.</b> Programa de PCR utilizado durante la selección.....	66
<b>Tabla XI.</b> Programa de PCR a tiempo real para ver la evolución de la población .....	69
<b>Tabla XII.</b> Programa de PCR a tiempo real para analizar los niveles a ARNm.....	76
<b>Tabla XIII.</b> Siglas de los diferentes tipos de tumor .....	82
<b>Tabla XIV.</b> Casuística de los tejidos pulmonares disponibles .....	87



# **ABREVIATURAS**





**ABREVIATURAS**

<b>2'F-ANA</b>	Ácido 2'-fluoroarabinonucleico
<b>ABCA1</b>	Transportador de casete de unión a ATP A1
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis
<b>AcCoA</b>	Acetil coenzima A
<b>ACE2</b>	Enzima convertidora de angiotensina 2
<b>ACLY</b>	ATP citrato liasa
<b>ACSS2</b>	AcCoA sintetasa 2 de cadena corta
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	ADN ribosomal
<b>ALK</b>	Linfoma anaplásico quinasa
<b>AMD</b>	Degeneración macular asociada a la edad
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>AR</b>	Receptor de andrógenos
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ASF1</b>	Proteína Funcional Antisilenciamiento 1
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
<b>Bcl2L12</b>	Proteína 12 de la familia Bcl2
<b>BRAF</b>	Fibrosarcoma rápidamente acelerado B
<b>BRD4</b>	Proteína asociada a bromodominio 4
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CaMK2</b>	Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina
<b>CBP</b>	Proteína de unión a CREB

<b>cccDNA</b>	ADN circular covalentemente cerrado
<b>cDNA</b>	ADN copia
<b>CENP-A</b>	Proteína A del centrómero
<b>CK2</b>	Casein quinasa 2
<b>CLIC1</b>	Canal clorhidro intracelular 1
<b>COVID-19</b>	Infección viral por coronavirus
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo <i>Dulbecco modified Eagles minimal essential medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo enzimático en placa
<b>ELONA</b>	Ensayo enzimático en placa con aptámeros
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GNAT</b>	N-acetiltransferasa relativa a GCN5
<b>HAT</b>	Histona acetiltransferasa
<b>HAT1</b>	Histona acetiltransferasa 1
<b>HBc</b>	Proteína c de hepatitis B
<b>HBV</b>	Virus de la hepatitis B

---

<b>HDAC</b>	Histona desacetilasa
<b>HGNET</b>	Tumor neuroendocrino de alto grado
<b>Hif1</b>	Factor interactor de HAT1
<b>His</b>	Histidina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>Hsm3</b>	Mutabilidad espontánea mejorada
<b>IC50</b>	Inhibición del crecimiento del 50%
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>IR</b>	Inmunoratio
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>KRAS</b>	Virus del sarcoma de rata Kristen
<b>LCNEC</b>	Carcinoma neuroendocrino de célula grande
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MET</b>	Transición epitelio mesénquima
<b>MHV</b>	Proteína vasa homóloga
<b>MNK1</b>	Proteína quinasa 1 de interacción con MAPK
<b>MTT</b>	Metiltiazol tetrazolio
<b>NASP</b>	Proteína nuclear autoantigénica de espermatozoos
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolio/x-fosfato
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa potenciador de la cadena ligera de las células B activadas
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>Nox-5</b>	NAPDH oxidasa 5

<b>NuB4</b>	Complejo histona acetiltransferasa tipo B Nuclear específico para H4
<b>ORC</b>	Complejo de Reconocimiento del Origen de Replicación
<b>p53</b>	Proteína 53
<b>PARP</b>	Polimerasa de poli ADP-ribosa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD-L1</b>	Ligando 1 de muerte programada
<b>PKC-β2</b>	Proteína quinasa C β2
<b>PLZF</b>	Proteína de dedo de zinc leucemia promielocítica
<b>PTMs</b>	Modificaciones postraduccionales
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real con transcriptasa inversa
<b>RbAp46</b>	Proteína de retinoblastoma A asociado a la proteína 46
<b>RET</b>	Reorganizado durante la transfección
<b>RIP1</b>	Proteína 1 que interactúa con el receptor de la quinasa
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNAse</b>	Ribonucleasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
<b>SARS-COV2</b>	Síndrome respiratorio agudo severo causado por coronavirus tipo 2
<b>SCLS</b>	Carcinoma de célula pequeña
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

<b>SELEX</b>	Enriquecimiento exponencial por evolución sistemática de ligandos
<b>SEOM</b>	Sociedad Española de Oncología Médica
<b>ssDNA</b>	ADN de cadena sencilla
<b>TBS</b>	Tampón salino tamponado TRIS
<b>TEMED</b>	N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina
<b>TLR</b>	Receptor tipo toll
<b>TLR4</b>	Receptor tipo toll 4
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TPM</b>	Tránscritos por millón
<b>TP53</b>	Proteína tumoral 53
<b>U.A.</b>	Unidades arbitrarias
<b>UBE4A</b>	Factor de ubiquitinación E4A
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>WHO</b>	Organización mundial de la salud



# **INTRODUCCIÓN**





# INTRODUCCIÓN

## 1. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Torre et al. 2015; Karimpour et al. 2021) y el más común entre todos los tipos de cáncer (Nasim et al. 2019). Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM, <https://seom.org/>) es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo y el cuarto en España. Actualmente, el cáncer de pulmón es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado y el tercero que más muertes produce en mujeres y el cuarto más diagnosticado y el que más muertes produce en hombres. En los últimos años ha habido un cambio de tendencia en la mortalidad entre ambos sexos debido al aumento del consumo de tabaco en mujeres a partir de los años 70, aunque todavía sigue siendo mayor en hombres. Sin embargo, se espera una disminución en el futuro debida a la reducción del tabaquismo en los últimos años (Torre et al. 2015).

Los avances científicos de los últimos años han permitido el desarrollo de nuevos abordajes diagnósticos y terapéuticos en el manejo del cáncer de pulmón que han contribuido en muchos casos a mejorar el pronóstico de los pacientes. En este sentido, el diagnóstico precoz de la enfermedad es una necesidad absoluta en oncología. En un paciente con cáncer de pulmón, un diagnóstico tardío incrementa las posibilidades de que el tumor se encuentre en una etapa avanzada, e incluso desarrolle metástasis (Pendharkar et al. 2013; Langevin et al. 2015), lo que aumenta las posibilidades de fracaso terapéutico, ya que las opciones de tratamiento son principalmente paliativas (Karimpour et al. 2021) y esto hace que disminuya la supervivencia de los pacientes de manera notable (Singh et al. 2016). La búsqueda de marcadores tumorales útiles para el diagnóstico precoz, con valor pronóstico o de utilidad en la evaluación de la respuesta a la terapia es, pues, imprescindible en la lucha oncológica.

### 1.1. Clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una neoplasia altamente compleja con numerosos tipos histológicos. En la **Figura 1** se muestran los tipos de tumor que más incidencia tienen en la población. Según la última clasificación WHO (World Health Organization) de 2015 (Travis et al. 2015), los principales subtipos de tumores de origen epitelial en pulmón son los siguientes (**Tabla I**):

### **a) Tumores neuroendocrinos**

Comprenden tres subtipos: carcinoma de célula pequeña o microcítico (Small Cell Lung Cancer, SCLC), que es el más frecuente; carcinoma neuroendocrino de célula grande (Large Cell NeuroEndocrine Carcinoma, LCNEC); y tumor carcinoide (típico/atípico). Los dos primeros son considerados tumores neuroendocrinos de alto grado (High-Grade NeuroEndocrine Tumors, HGNET), más agresivos, caracterizados por una historia de hábito tabáquico importante (Travis 2012; Langevin et al. 2015; Saber et al. 2017; Herbst et al. 2018).

#### **1) Cáncer de célula pequeña o microcítico**

Extremadamente agresivo, supone un 10-15% del total de casos. La supervivencia a 5 años en estadíos avanzados es menor del 10% (Araz and Karakurt Eryilmaz 2021). Son tumores de crecimiento rápido y la mayor parte han metastatizado en el momento del diagnóstico (Gazdar et al. 2017; Sabari et al. 2017), normalmente en cerebro. Las células son pequeñas, de forma redonda, escaso citoplasma con gránulos de neurosecreción, y con sus límites mal definidos. Forman grandes masas con zonas de necrosis, y se localiza normalmente en las principales vías aéreas y en zonas periféricas del pulmón (Travis 2012). Se diagnostica principalmente por sus características histológicas o citológicas. Son tumores en principio muy sensibles a quimioterapia, con una tasa de respuesta elevada. Sin embargo, la tasa de recidiva es muy alta, con muy mal pronóstico (Araz and Karakurt Eryilmaz 2021).

#### **2) Carcinoma neuroendocrino de células grandes**

Supone menos del 5% de todos los casos. Al igual que el cáncer microcítico, es extremadamente agresivo (Altmayer et al. 2020). Se presenta como largas masas con áreas de necrosis y metástasis temprana. Son muy parecidos a los carcinomas de células pequeñas pero están formados por células mucho más grandes.

#### **3) Tumores carcinoides**

Comparados con los demás miembros de este grupo, los pacientes que lo padecen son significativamente más jóvenes, tienen un mejor pronóstico, y no existe tanta relación con hábitos tabáquicos (Travis et al. 2015). Se divide en dos subtipos: típico y atípico. Ambos se caracterizan histológicamente por tener una población de células tumorales muy uniforme, con citoplasma granulado. Normalmente ocurren en la zona periférica del pulmón

### **b) Cáncer de célula no pequeña o no microcítico**

Es el tipo de cáncer de pulmón más común, ya que se produce en un 80-85% del total de pacientes diagnosticados con esta patología (Molina et al. 2008; Langevin et al. 2015; Singh

et al. 2016; Saber et al. 2017; Herbst et al. 2018; Karimpour et al. 2021). Existen 3 subtipos diferenciados:

### **1) Adenocarcinoma**

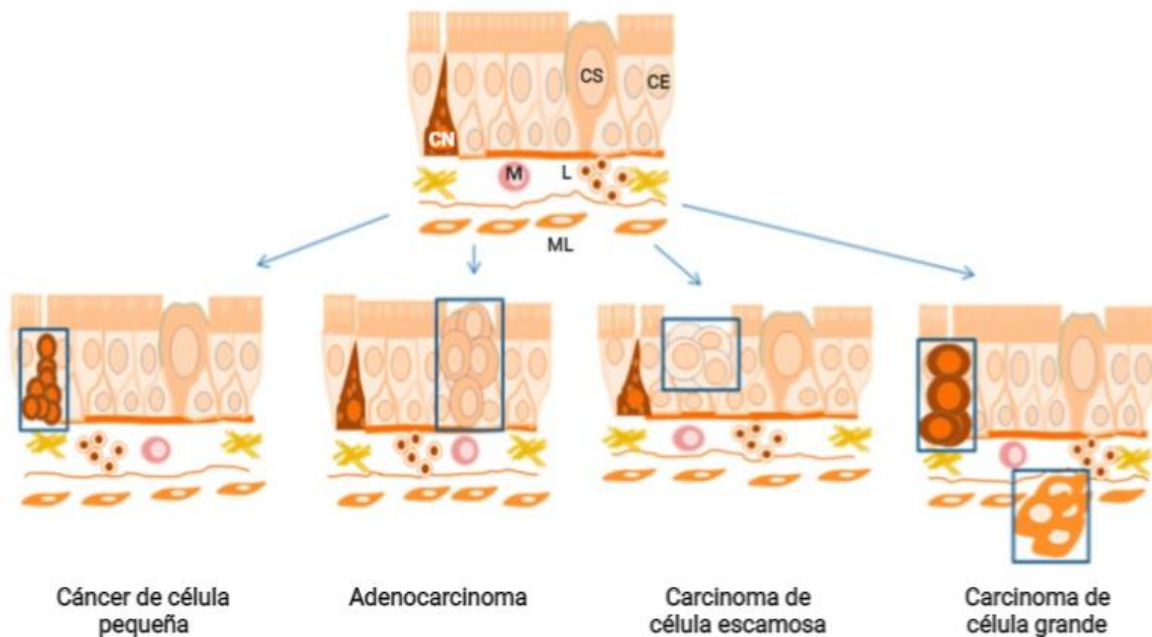
Se da en un 50% del total de casos de cáncer de pulmón. Es el subtipo más común en gente no fumadora (Herbst et al. 2018), aunque también lo padecen los pacientes que fuman (Altmayer et al. 2020). Suele desarrollarse en la periferia del pulmón, con morfología glandular y producción de mucina (Altmayer et al. 2020). Es de crecimiento más lento que el resto, por lo que puede ser detectado antes de que se extienda. Se han identificado unos 15 subtipos, que pueden agruparse en tres categorías en función de su grado de invasividad: pre-invasivo, mínimamente invasivo y adenocarcinoma invasivo (Altmayer et al. 2020). Su diagnóstico se realiza también por la histología de biopsias y citologías, aunque se complementa con inmunohistoquímica de marcadores específicos que distinguen entre subtipos.

### **2) Carcinoma de célula escamosa**

Supone un 30% de todos los cánceres de pulmón. Los pacientes que lo padecen suelen tener antecedentes de tabaquismo (Herbst et al. 2018). Se desarrolla como nódulos o masas centralmente localizadas en el pulmón, envolviendo lóbulos o bronquios. Como indica su nombre, se origina a partir de células escamosas inmaduras que cubren el interior de las vías respiratorias, con una prominente queratinización y un núcleo con una cromatina oscura y nucleolo poco evidente (Altmayer et al. 2020). Se clasifica en 3 subtipos basados en la queratinización: queratinizado, no queratinizado y carcinoma basal (Altmayer et al. 2020). Su diagnóstico se basa en las mismas técnicas que los adenocarcinomas, con utilización de inmunohistoquímica para discernir entre los diferentes subtipos.

### **3) Carcinoma de célula grande**

Supone hasta el 10% de todos los casos. Se desarrolla principalmente en la parte central del pulmón, pero puede aparecer en cualquier zona como una masa grande con márgenes lobulados. Crece y se propaga muy rápido (Altmayer et al. 2020). Se diagnostica en base al descarte de los otros subtipos, ya que es un carcinoma indiferenciado tanto en aspectos inmunohistoquímicos como morfológicos.



**Figura 1. Histogénesis de tipos histológicos de cáncer de pulmón.** ML - Músculo Liso; M - Macrófago; L - Linfocito; CN - Célula Neuroendocrina; CE - Célula Epitelial; CS - Célula Secretora. Imagen modificada a partir de (Zamay et al. 2017).

## 1.2. Factores de riesgo del cáncer de pulmón

El principal factor de riesgo de padecer cáncer de pulmón es el tabaquismo (Molina et al. 2008; Torre et al. 2015; Langevin et al. 2015). El 80% de las muertes se relacionan con el hábito tabáquico, e incluso fumadores pasivos tienen altas probabilidades de desarrollar esta enfermedad (Nasim et al. 2019).

Los factores genéticos también juegan un papel relevante (Molina et al. 2008). La existencia de antecedentes familiares de cáncer pulmonar incrementa el riesgo de padecer la enfermedad aún en no fumadores.

La contaminación ambiental es otra de las principales causas de padecer cáncer de pulmón, especialmente relevante en grandes ciudades y núcleos industriales. Un contaminante de origen natural, el radón, se ha relacionado con esta patología (Torre et al. 2015; Langevin et al. 2015; Nasim et al. 2019). Este gas noble, inodoro e incoloro que se origina por la desintegración del uranio, puede producir alteraciones en el ADN de las células pulmonares en las personas expuestas y provocar el desarrollo de tumores. Los agentes contaminantes ambientales, junto con el consumo de alcohol, el tipo de dieta y la falta de ejercicio se han relacionado en numerosos estudios con la etiopatogenia de esta enfermedad (Molina et al. 2008; Torre et al. 2015).

Tabla I. Clasificación de los diferentes tipos de cáncer de pulmón.

TIPO	NEUROENDOCRINOS			NO MICROCÍTICO		
	MICROCÍTICO	CARCINOMA NEUROENDOCRINO DE CÉLULA GRANDE	TUMORES CARCINOIDES	ADENOCARCINOMA	CARCINOMA DE CÉLULA ESCAMOSA	CARCINOMA DE CÉLULA GRANDE
% INCIDENCIA	10-15%	<5%	<1%	50%	30%	10%
CARACTERÍSTICAS	Fumadores principalmente  Células pequeñas, de forma redonda, escaso citoplasma granulado  Límites mal definidos  Vías aéreas principales y zonas periféricas del pulmón  Forman grandes masas con zonas de necrosis	Fumadores principalmente     Masa larga con áreas de necrosis	No relación con hábito tabáquico  Citoplasma granulado  Células tumorales uniformes  Periferia del pulmón principalmente	Fumadores y no fumadores  Morfología glandular y producción de mucina  Periferia del pulmón	Fumadores principalmente  Células escamosas inmaduras, con queratinización  Nódulos o masas centralmente localizadas	Fumadores principalmente  Masa larga con márgenes lobulados  Parte central del pulmón principalmente
DIAGNÓSTICO	Biopsia Citología	Biopsia Citología	Biopsia  Inmunohistoq.	Biopsia Citología  Inmunohistoq.	Biopsia Citología  Inmunohistoq.	Por descarte del resto
TRATAMIENTO	Quimioterapia  Cirugía (menos del 5%)  Radioterapia	Cirugía en estadios tempranos con adyuvancia de quimioterapia  Radioterapia  Inmunoterapia	Cirugía en estadios tempranos con adyuvancia de quimioterapia  Radioterapia  Inmunoterapia	Cirugía en estadios tempranos con adyuvancia de quimioterapia  Radioterapia  Inmunoterapia	Cirugía en estadios tempranos con adyuvancia de quimioterapia  Radioterapia  Inmunoterapia	Cirugía en estadios tempranos con adyuvancia de quimioterapia  Radioterapia  Inmunoterapia

### 1.3. Tratamiento del cáncer de pulmón

Los tratamientos para el cáncer de pulmón incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. Los protocolos de tratamiento (con intención curativa o paliativa), como en otros tipos de cáncer, están determinados para cada caso en función del tipo histológico y/o molecular del tumor (**Tabla I**), de su extensión en el momento del diagnóstico, de la existencia de patologías concomitantes y de los antecedentes personales y familiares del paciente.

Los principales abordajes terapéuticos del cáncer de pulmón son:

### **a) Cirugía**

Está indicado en pacientes con cáncer no microcítico en estadíos tempranos hasta estadio III, y en pacientes con cáncer microcítico en estadio I, aunque son menos del 5% (Nasim et al. 2019). Para que se pueda aplicar, el tumor debe tener un tamaño que permita la resección completa, y el paciente debe ser capaz de tolerar la operación (Molina et al. 2008). Se retira un lóbulo completo o una sección del pulmón que contenga el tumor.

Se puede aplicar terapia adyuvante (quimioterapia, radioterapia y/o inmunoterapia), ya que es habitual entre los protocolos terapéuticos (Nasim et al. 2019).

### **b) Quimioterapia**

Se utiliza un platino (cisplatino o carboplatino) combinado con otros fármacos, siendo la combinación platino-etopósido la más empleada. Se realiza como adyuvante de la cirugía (Nasim et al. 2019) y en los pacientes en los que se descarta la cirugía debido al estado avanzado del tumor, lo que ocurre en un 70% de los casos (Molina et al. 2008). La mayoría de los pacientes con cáncer no microcítico son tratados con quimioterapia (Pendharkar et al. 2013). Con este tratamiento se pretende mejorar la supervivencia y reducir los efectos adversos que causa la enfermedad.

### **c) Radioterapia**

Se emplea en pacientes con cáncer no microcítico y microcítico que tienen el tumor localizado pero no se puede operar (Nasim et al. 2019), y se utiliza sola o en combinación con quimioterapia (Vinod and Hau 2020).

### **d) Medicina personalizada. Inmunoterapia**

El análisis de las alteraciones moleculares de los tumores es fundamental en oncología. Este conocimiento permite practicar medicina personalizada en la que la decisión terapéutica depende de las características de cada tumor en cada paciente. En los últimos años, se han descubierto una serie de proteínas que se encuentran alteradas en diferentes patologías y son indicadores de enfermedad (Karimpour et al. 2021). Los biomarcadores más utilizados en cáncer de pulmón son EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), KRAS (Kirsten Rat Sarcoma virus), MET (Mesenchymal Epithelial Transition), TP53 (Tumor Protein p53), BRAF (B Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), RET (Rearranged During Transfection) y PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), entre otros (Karimpour et al. 2021; Molina et al. 2008; Pendharkar et al. 2013; Herbst et al. 2018; Altmayer et al. 2020). Estas alteraciones, además de su utilidad como biomarcadores tumorales para la clasificación molecular del tumor, constituyen nuevas y esperanzadoras dianas

terapéuticas. Sin embargo, a pesar de que se han conseguido incrementos significativos en el tiempo hasta la recidiva de los tumores, la enfermedad sigue siendo mortal. No obstante, estas terapias dirigidas consiguen un tiempo de supervivencia con mayor calidad de vida para el paciente (Eisenstein 2020).

## **2. PROCESOS EPIGENÉTICOS: EL CONTEXTO DE HAT1**

### **2.1. Epigenética y cáncer**

Además de las alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos juegan un papel fundamental en la etiopatogenia de las enfermedades oncológicas. La epigenética se define como todas aquellas modificaciones en el ADN que influyen en su expresión pero que no conllevan cambios en su estructura (Brownell and Allis 1996). Este fenómeno regulado por enzimas, comprende muy diversos procesos que actúan en sincronía para conseguir una adecuada regulación de la transcripción y de la estructura de la cromatina. Sin embargo, cualquier alteración en alguno de estos procesos puede conllevar a una desregulación de esa transcripción y, por tanto, desencadenar enfermedades (Poziello et al. 2020). Descifrar el entramado que supone cualquiera de estas alteraciones para evitar o controlar la enfermedad no supone una tarea sencilla, pero gracias a los grandes avances de las tecnologías denominadas "ómicas", se han conseguido entender situaciones que eran imposibles e incomprensibles hace tan solo unos años, y es por esto que la epigenética cada vez cobra más importancia en la progresión de determinadas patologías.

Los procesos epigenéticos comprenden la metilación del ADN, la remodelación de la cromatina, la regulación de genes por ARNs no codificantes y la modificación de histonas. Todos cooperan para generar estados transcripcionalmente activos o inactivos de la cromatina, generando el código epigenético.

La estructura básica de la cromatina es el nucleosoma, formado por 2 moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4 constituyendo un octámero, al que rodean 147 pares de bases de ADN (Sterner and Berger 2000; Nitsch et al. 2021). Los nucleosomas están unidos por un fragmento variable de ADN e inicialmente por la histona H1, que aumenta la estabilidad (Poziello et al. 2020), y se encuentran más o menos distantes en función del grado de condensación de la cromatina, formando así la eucromatina (forma menos condensada) o la heterocromatina (forma más condensada). Todos estos elementos que componen la cromatina están controlados por su código epigenético, de manera que tendrá marcas epigenéticas que permitan eventos particulares dentro de la célula como, por ejemplo, la expresión de unos determinados genes y el silenciamiento de otros.

## 2.2. Modificaciones postraduccionales de histonas

Las histonas sufren una serie de modificaciones una vez se han sintetizado, algunas de ellas nada más formarse (Poziello et al. 2020). De esta manera, son dirigidas en todo momento por diferentes enzimas y proteínas hasta su ensamblaje en la cromatina, donde forman el nucleosoma y donde continúan sus modificaciones postraduccionales. La mayor abundancia de histonas en la célula ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular (Verreault et al. 1998) en la que aparecen acomplejadas continuamente para evitar la toxicidad que las histonas libres generan (Poziello et al. 2020; Agudelo Garcia et al. 2017; Gunjan and Verreault 2003).

Las modificaciones postraduccionales (PTMs) de histonas incluyen la metilación, la acetilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la succinilación y la sumoilación (Poziello et al. 2020; Xu et al. 2018). De todas ellas, las 3 primeras son las que se han investigado más exhaustivamente (Nitsch et al. 2021), siendo la acetilación el proceso mejor caracterizado (Sternier and Berger 2000; Kelly et al. 2000) y uno de los más implicados en la regulación de la cromatina (Poziello et al. 2020; Kelly et al. 2000).

## 2.3. Acetilación de histonas

La acetilación de histonas es un proceso reversible mediado por el equilibrio entre dos tipos de enzimas, las HATs (Histona AcetilTransferasas) y las HDACs (Histona DesAcetilinas) (Poziello et al. 2020). La acción de las HATs siempre se ha considerado pro-transcripcional y la de las HDACs anti-transcripcional (Sternier and Berger 2000). Las histonas poseen una carga positiva que facilita la unión electrostática al ADN, que tiene carga negativa, haciendo posible la compactación de la cromatina. Cuando una histona es acetilada en un residuo de lisina por las HATs, esa carga positiva se pierde, haciendo que se separe del ADN, descompactándose y facilitando la entrada de la ARN polimerasa, lo que inicia la transcripción de determinados genes (Sternier and Berger 2000; Nitsch et al. 2021). Por el contrario, cuando las HDACs actúan, eliminan la acetilación de la histona, haciendo que tenga de nuevo carga positiva provocando la compactación de la cromatina y, por tanto, el silenciamiento génico (Poziello et al. 2020). Además de generar cambios en la estructura de la cromatina, la acetilación de histonas por determinadas enzimas tiene otras funciones que se describirán más adelante.

La primera clasificación de las HATs se basó en su localización y en el principal sustrato que reconocen, por lo que se propuso que las HAT tipo A reconocen histonas nucleosomales y se localizan exclusivamente en el núcleo, y las HAT tipo B acetilan histonas libres y se encuentran en citoplasma (Poziello et al. 2020; Ruiz-Garcia et al. 1998). Esta clasificación resulta actualmente poco precisa debido al hallazgo de nuevas HATs, funciones y



localizaciones y, aunque se sigue utilizando, agrupar algunas de estas enzimas dentro de estos parámetros resulta confuso (Sternier and Berger 2000).

Otra clasificación basada en su homología estructural y su unión al sustrato se ha desarrollado de manera complementaria a la anterior, para así facilitar la comprensión de este grupo de enzimas. Esta clasificación muestra una alta similitud de secuencias intrafamilia pero poca similitud interfamilia (Marmorstein 2001). Así, se han descrito 3 superfamilias de HATs, como son GNAT (GCN5-Related N-Acetyltransferases), p300/CBP (CREB Binding Protein) y MYST (Llamado así por sus miembros fundadores: MOZ, Ybf2/Sas3 (Levaduras), Sas2 (Levaduras) y Tip60). Fuera de estas 3 superfamilias se encuentran algunos factores de transcripción, coactivadores y receptores nucleares que también tienen actividad HAT (Sternier and Berger 2000; Poziello et al. 2020). En la **Tabla II** se puede ver un resumen de estas clasificaciones.

#### **2.4. Histona acetiltransferasa 1**

La histona acetiltransferasa 1 (HAT1) es una HAT tipo B (Brownell and Allis 1996; Parthun 2007) englobada en la superfamilia GNAT. Fue descubierta en 1995 (Kleff et al. 1995) en *S. cerevisiae*, y desde entonces se ha encontrado en diferentes organismos, tanto plantas como animales (Dutnall et al. 1998; Verreault et al. 1998). Su estructura y función están muy conservadas a lo largo de la evolución, lo que hace pensar que tiene uno o varios cometidos vitales para el desarrollo de los individuos. Sin embargo, su eliminación en levaduras y en moscas no confiere un nuevo fenotipo, motivo por el cual se dedujo que sus funciones no eran esenciales y podían ser sustituidas por otras enzimas (Ruiz-Garcia et al. 1998; Parthun et al. 1996; Kleff et al. 1995; Varga et al. 2019). Además, los esfuerzos de investigación se centraron en las HAT tipo A, ya que acetilan también proteínas no histonas, lo que genera procesos aberrantes relacionados con diferentes patologías (Poziello et al. 2020). Sin embargo, en el año 2013 se describió que HAT1 es indispensable para el desarrollo de mamíferos (Nagarajan et al. 2013) y esto, sumado a los avances que se describen en líneas posteriores, ha despertado el interés en una enzima cuya caracterización molecular está bien descrita, pero sus funciones y mecanismos son todavía poco conocidos (Parthun 2007).

**Tabla II. Clasificación de las principales HATs en mamíferos. Tabla basada en (Poziello et al. 2020) y (Sterner and Berger 2000).**

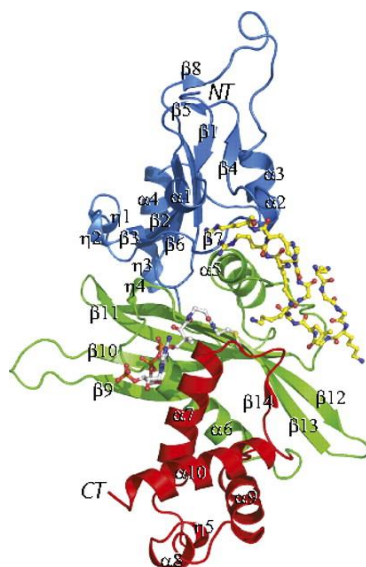
FAMILIA	SUBUNIDAD CATALÍTICA	TIPOLOGÍA	SUSTRATOS	LOCALIZACIÓN
<b>GNAT</b>	HAT1	Tipo B	H4, H2A, MHV, PLZF, CLIC1, Viperina, p53 de ratón	Núcleo, Citosol y Mitochondria
	HAT4	Tipo B	H4, H2A	Citosol
	GCN5	Tipo A-B	H3, H4, H2A, CDC6, CDK9, Ciclina D1, Ciclina E1 y E2F1, HDM2, PTEN, c-myc, TBX5, PLK4, CEBPB	Núcleo
	ELP3	Tipo A	H3, H4, p53, CDK9, c-myc, Foxo1, AR, TBX5, PLK4, ACLY	Núcleo
	Hpa2	Tipo A	H3, H4	
<b>p300/CBP</b>	CBP	Tipo A	$\alpha$ -Tubulina, Cortactina	Núcleo
	p300	Tipo A	NF- $\kappa$ B, c-myc, Foxo1, NCOA3, PCNA, KLF1, MafG, IRF-2	Núcleo
<b>MYST</b>	Tip60	Tipo A	H2A, H2B, H3, NF- $\kappa$ B, c-myc, p53, STAT3, $\beta$ -cat, AR, SIRT2, HDAC1, BCL6, MTA1, XBP1 2, PCNA, MEF2D, ZBTB7B	Núcleo
	MOZ	Tipo A	H4, H2A, ATM, TRRAP, E2F1, c-myc, NR1D2, FOXP3, RAN	Núcleo
	MORF	Tipo A	H3, p53	Núcleo
	HBO1	Tipo A	H3, H4	Núcleo
	MOF	Tipo A	H4, p53	Núcleo
<b>Coactivadores del receptor nuclear</b>	SRC-1		H3, H4	Núcleo
<b>Factores de Transcripción</b>	TAF1/TBP		H3, H4	Núcleo
	TFIIIC90		H3	Núcleo
	HATB3.1	Tipo B	H3 libre	Núcleo
	Rtt109p	Tipo B	H3 libre	

### a) Sustratos y localización de HAT1

Inicialmente, HAT1 se caracterizó por acetilar histonas libres y encontrarse en citoplasma, de ahí su clasificación como HAT tipo B. Es el miembro fundador de este grupo, formado también por algunas enzimas que se localizan en citoplasma y otras que acetilan histonas libres, como son HATB3.1 (Sklenar and Parthun 2004), Rtt109p (Schneider et al. 2006; Driscoll et al. 2007; Han et al. 2007), HAT4 (Yang et al. 2011), o Gcn5p (funciona como tipo A y tipo B) (Sklenar and Parthun 2004; Burgess et al. 2010) (Descritas en la **Tabla II**). Actualmente se sabe que HAT1 acetila otros sustratos no histónicos (Nagamori et al. 2011; Sadler et al. 2015), como se describe en las próximas líneas, y se localiza mayoritariamente en núcleo (Verreault et al. 1998; Imhof and Wolffe 1999; Barman et al. 2006), y en menor

medida en citoplasma (Ruiz-Garcia et al. 1998), e incluso presenta localización mitocondrial (Agudelo Garcia, Nagarajan, et al. 2020).

El sustrato principal de HAT1 es la histona H4 (Dutnall et al. 1998). Esta enzima realiza la transferencia de un grupo acetilo desde la Acetil Coenzima A (AcCoA) a los residuos de lisina de la histona H4 de nueva síntesis (Ruiz-Garcia et al. 1998). Esta acetilación ocurre gracias a la estructura de HAT1, formada por 3 partes: un extremo N-terminal, una región central y un extremo C-terminal, como se muestra en la **Figura 2**. Entre las dos últimas partes existe una hendidura donde se inserta el sustrato (Histona H4) y el cofactor (AcCoA), y se realiza la transferencia (Dutnall et al. 1998; Parthun 2007; Wu et al. 2012).



**Figura 2. Estructura del cristal de HAT1.** La estructura se representa con los dominios NT, central y CT en color azul, verde y rojo, respectivamente. El péptido de H4 y la AcCoA se muestran en modelo de palo y bola con átomos de carbono en amarillo y gris, respectivamente. Figura extraída de (Wu et al. 2012).

HAT1 acetila a la histona H4 en el citoplasma y de los 4 residuos de lisina que tiene la histona (en posición 5, 8, 12 y 16 (Adams and Kamakaka 1999)), acetila las lisinas 5 y 12 (Ruiz-Garcia et al. 1998; Verreault et al. 1998; Barman et al. 2006; Poveda and Sendra 2008), aunque tiene preferencia por acetilar la lisina 12 antes que la 5 (Dose et al. 2011; Makowski et al. 2001). La histona H4 tiene que estar recién sintetizada, sin otras marcas epigenéticas, ya que se ha descrito que si se anula previamente la carga positiva en las lisinas 8 y 16, HAT1 no se une (Makowski et al. 2001; Benson et al. 2007). Para evitar esas marcas epigenéticas previas a la acetilación de HAT1, se describió un complejo que se asocia a la histona e inhibe la actividad de otras HATs que pudieran acetilarla (Saavedra et al. 2017). Este proceso está muy conservado a lo largo de la evolución (Poziello et al. 2020; Dutnall et al. 1998; Richman

et al. 1988; Adams and Kamakaka 1999; Benson et al. 2007; Parthun 2012). De hecho, HAT1 podría evitar la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 ya que, si se mantiene unida a la histona, las lisinas 8 y 16 son inaccesibles para otras HATs. La lisina 16 tiene un papel importante en la transcripción de la cromatina, por lo que el complejo HAT1 es necesario para mantener los patrones propios de la herencia epigenética, previniendo la acetilación de este residuo hasta después de su ensamblaje en la cromatina (Shahbazian and Grunstein 2007).

Como se ha comentado previamente, la histona H4 no es el único sustrato de HAT1, ya que también acetila la lisina 5 de la histona H2A (Verreault et al. 1998; Tafrova and Tafrov 2014), y recientemente se han descubierto otras 5 proteínas no histonas que son acetiladas por HAT1: MHV (Mouse Vasa Homologue), proteína expresada en células germinales (acetilada en la lisina 405) (Nagamori et al. 2011); PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger protein), implicada en procesos inflamatorios (acetilada en la lisina 277) (Sadler et al. 2015); viperina, proteína que participa en la infección viral (acetilada en la lisina 197) (Yuan et al. 2020); CLIC1 (Chloride Intracellular Channel 1), proteína prooncogénica (acetilada en la lisina 131) (Wang et al. 2021); y p53 de ratón, proteína supresora de tumores (acetilada en la lisina 381) (Agudelo Garcia, Nagarajan, et al. 2020).

Se han descrito dos isoformas de HAT1 producidas por *splicing* alternativo: la isoforma a, más larga y exclusivamente nuclear que tiene 418 aminoácidos y pesa 49.5 KDa; y la isoforma b, más corta, citoplasmática y nuclear que tiene 334 aminoácidos y pesa 39.78 KDa (Lebel et al. 2010; Wu et al. 2012). Esta última ha perdido los primeros 84 aminoácidos, pero sigue manteniendo su función debido a que la unión a su sustrato y cofactor se produce en la parte carboxilo terminal de la proteína. Al ser la isoforma a exclusivamente nuclear y la isoforma b nuclear y citoplasmática, la pérdida de estos aminoácidos se puede entender como una estrategia para poder entrar y salir del núcleo (Lebel et al. 2010).

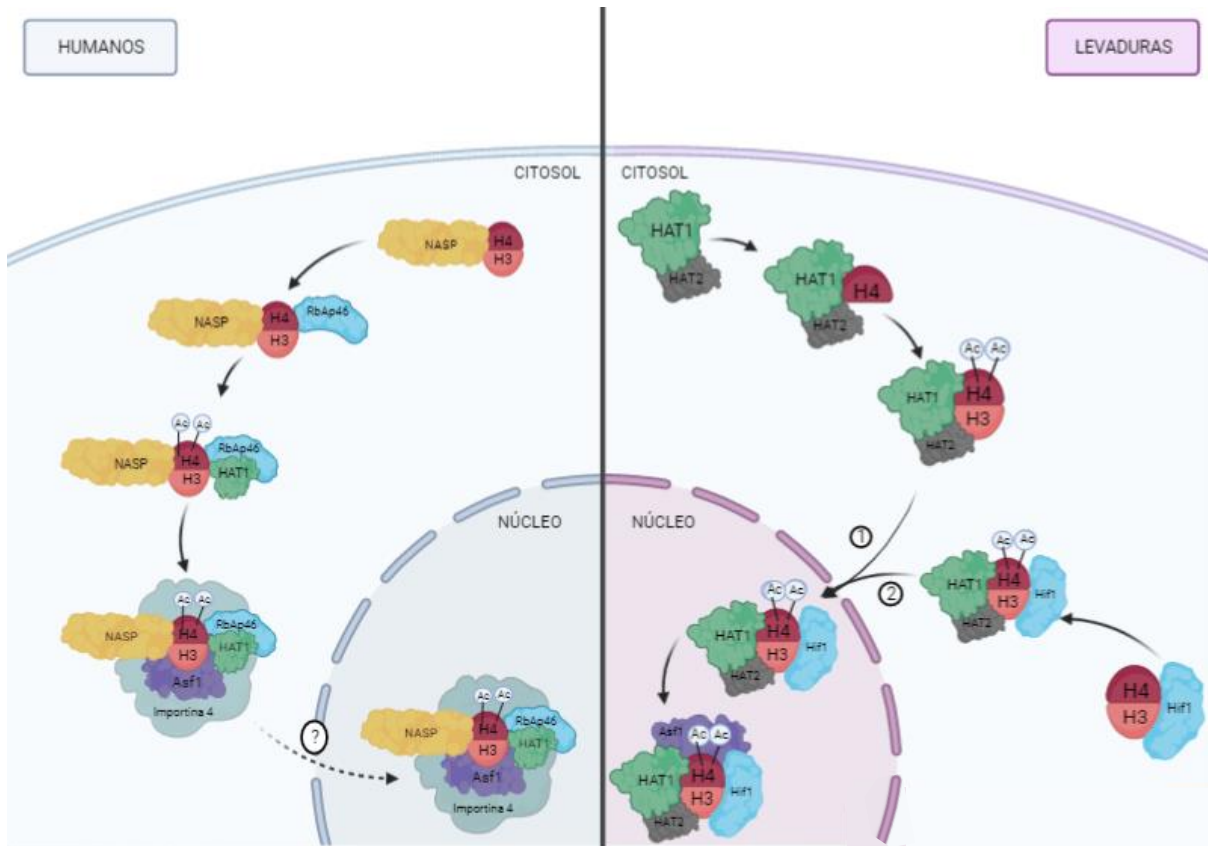
La versatilidad de esta enzima sugiere que tiene un papel importante dentro de la célula (Lebel et al. 2010). De hecho, cada vez se va conociendo más información sobre HAT1, por lo que no sería descartable que, próximamente, sean descritos nuevos sustratos y localizaciones que impliquen a esta proteína en nuevos procesos.

### **b) Complejos que forma HAT1**

Hasta la fecha se han descrito en levaduras dos complejos principales, uno en el citoplasma y otro en el núcleo (Ruiz-Garcia et al. 1998; Ge et al. 2011) (**Figura 3**). En el citoplasma está el complejo HAT B (Ge et al. 2011) formado por HAT1 y la chaperona HAT2 (Ruiz-Garcia et al. 1998), que se unen a la histona H4 y al que posteriormente se incorpora la histona H3 (Wu et al. 2012; Li et al. 2014). Esta unión está muy conservada a lo largo de la evolución, con proteínas homólogas a HAT2 (Mis 16 en *Schizosaccharomyces pombe*, HATB

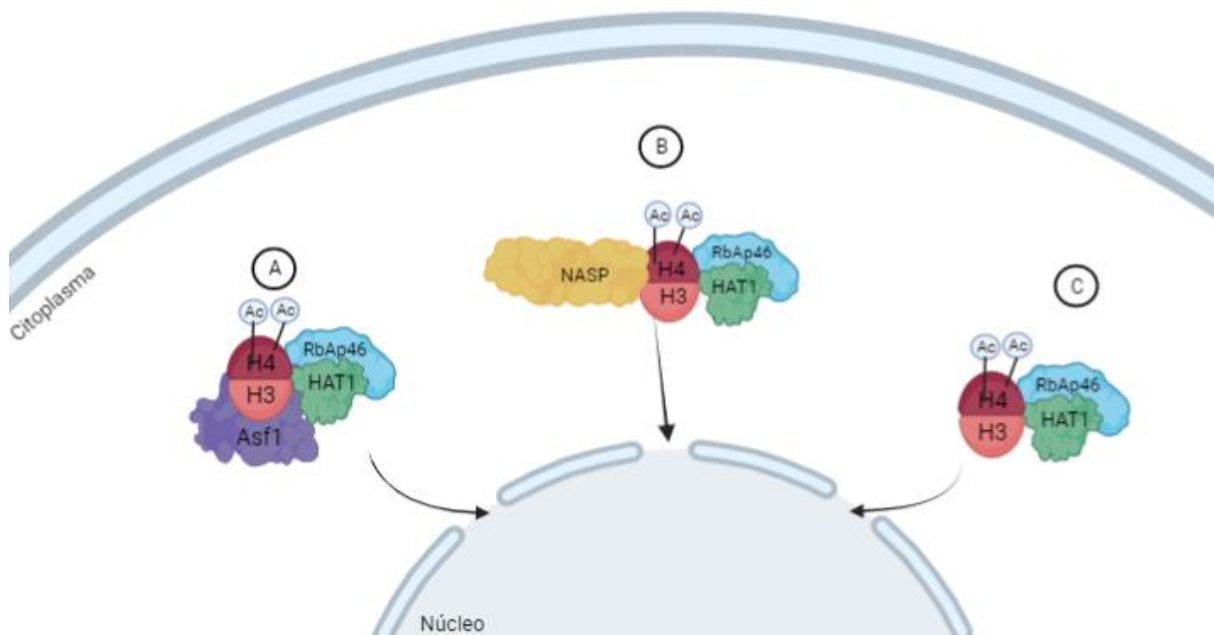
en maíz, Caf1 en moscas, RbAp48 en rana, chp46 en pollo y RbAp46 o RBBP7 en humanos) (Parthun et al. 1996; Eberharter et al. 1996; Adams and Kamakaka 1999; Ahmad et al. 2000; Parthun 2007; Wu et al. 2012; Saade et al. 2009; Tong et al. 2012; Klingberg et al. 2015; Boltengagen et al. 2016; Marin et al. 2017). Esta chaperona da soporte y aumenta 10 veces la actividad de HAT1 (Ruiz-Garcia et al. 1998; Verreault et al. 1998; Parthun 2007), entre otras funciones (Rosaleny et al. 2005). Después de esta unión, HAT1 acetila la histona H4 y todo este complejo se dirige hacia el núcleo (**Figura 3, complejo 1**). Una vez allí, forma el segundo complejo llamado NuB4 (Nuclear HAT1 containing type B histone acetyltransferase complex) (Parthun 2007; Ge et al. 2011), constituido por un heterotrímero HAT1, HAT2 y otra proteína chaperona, Hif1 (HAT1 interacting factor 1), unidos a H3/H4. Este complejo también se puede formar en el citoplasma y entrar pasivamente al núcleo (Dannah et al. 2018) (**Figura 3, complejo 2**). Aunque no se encontró ningún homólogo de Hif1 en eucariotas superiores (Poveda et al. 2004), Ai y Parthun (Ai and Parthun 2004) demostraron que NASP (Nuclear Autoantigenic Sperm Protein) es una proteína chaperona similar a esta en mamíferos. Este heterotrímero es reclutado en sitios de rotura del ADN para participar en su reparación (Qin and Parthun 2006). Hif1 podría facilitar la unión de HAT1-HAT2 con histonas nucleares para cambiar el estado epigenético de la cromatina (Liu et al. 2014). Recientemente se ha descrito que este complejo puede interactuar con otros factores como Hsm3 (enhanced spontaneous mutability), otra proteína chaperona que participa en la reparación de mutaciones espontáneas (Evstyukhina et al. 2021).

En humanos también existen complejos similares, pero éstos no tienen nombres ni localización específica (**Figura 3**). La chaperona NASP se une al dímero H3/H4, que presenta a RbAp46 (Retinoblastoma-Associated protein 46) a la histona H4 y posteriormente se une HAT1 para acetilar esta histona (Wu et al. 2012; Verreault et al. 1998; Adams and Kamakaka 1999). Después de esta acetilación, se une otra proteína, ASF1 (Anti-Silencing Function protein 1) que se asocia con la importina 4 para facilitar la entrada al núcleo y el ensamblaje de las histonas a la cromatina (Barman et al. 2008; Campos et al. 2010; Saavedra et al. 2017). En levaduras también hay ASF1, y HAT1 interactúa con él en el núcleo (Fillingham et al. 2008; Haigney et al. 2015) para participar en el intercambio de histonas en el nucleosoma (Verzijlbergen et al. 2011; Yang et al. 2013).



**Figura 3. Complejos que forma HAT1.** Descripción de la formación de los complejos identificados en humanos (izquierda) y levaduras (derecha). La entrada al núcleo se desconoce. Los números 1 y 2 corresponden a los dos complejos que se pueden formar en levaduras descritos en el texto. Figura realizada en BioRender.

Tampoco se conoce con exactitud la entrada de HAT1 al núcleo. Hay 3 teorías principales que podrían explicar este mecanismo (**Figura 4**): la primera sugiere que HAT1/RbAp46/H3/H4 entra al núcleo unido a ASF1 (Campos et al. 2010; Fillingham et al. 2008) (**Figura 4A**). Esta importación se cree que ocurre con dímeros de H3/H4 y no con tetrámeros, ya que ASF1 se une estrictamente a dímeros en el citoplasma, por lo que la entrada de un tetrámero requeriría de dos complejos iguales. La segunda teoría propone que el complejo HAT1/RbAp46/H3/H4 se transfiere a NASP y se une al ADN (Campos et al. 2010; Ai and Parthun 2004; Parthun 2012) (**Figura 4B**), y la tercera sugiere que el complejo HAT1-RbAp46 entra al núcleo por sí solo con las histonas (Parthun 2012; Agudelo Garcia, Lovejoy, et al. 2020) (**Figura 4C**).



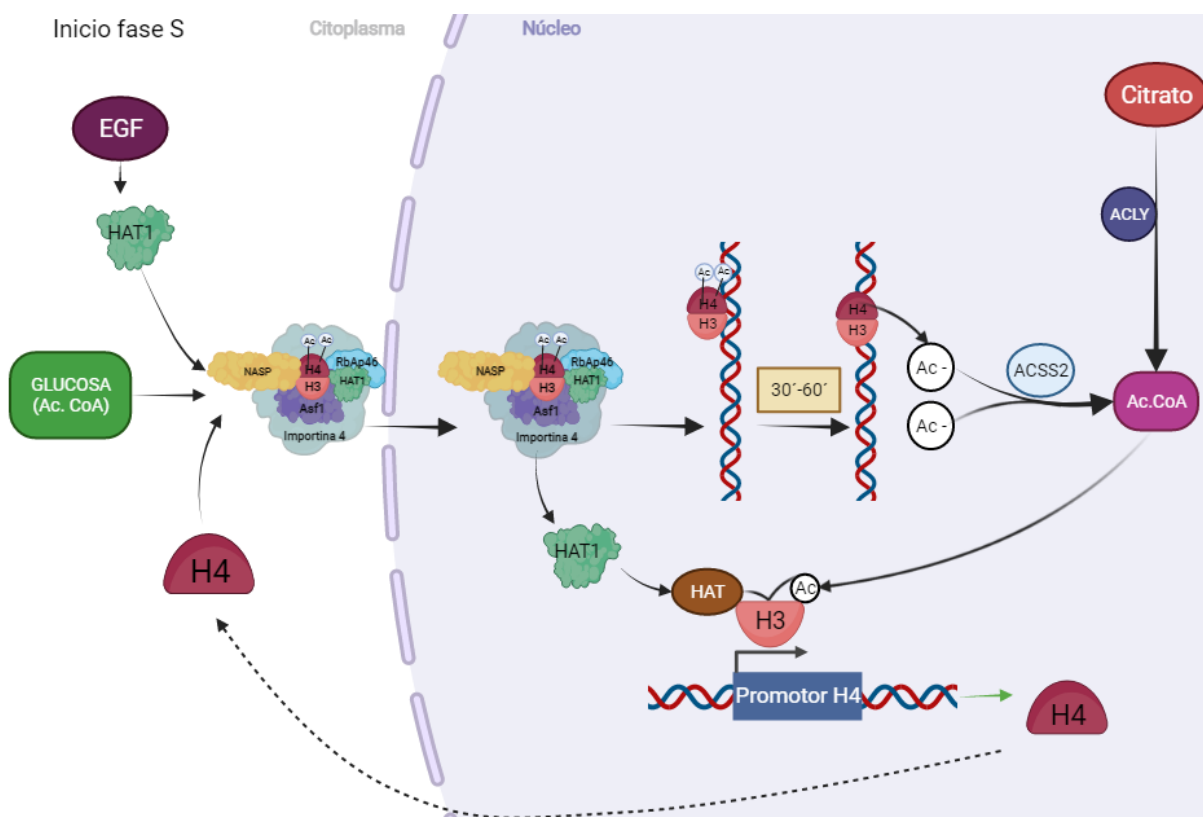
**Figura 4. Entrada de HAT1 en el núcleo.** Esquema de los 3 diferentes complejos que podría formar HAT1 para su entrada en el núcleo. Figura realizada en BioRender.

### c) Funciones de HAT1

Además de tener función acetiltransferasa, HAT1 también actúa como una proteína chaperona, ya que no se desensambla de H3/H4 cuando lo acetila, como suelen hacer este tipo de enzimas (Parthun 2012; Agudelo Garcia et al. 2017; Poziello et al. 2020). Se mantiene unida y acompaña a las histonas hasta su ensamblaje con la cromatina, momento en que se libera (Dutnall et al. 1998; Ejlassi-Lassallete et al. 2011; Shahbazian and Grunstein 2007; Agudelo Garcia et al. 2017), ya que no acetila histonas nucleosomales (Parthun et al. 1996; Verreault et al. 1998; Adams and Kamakaka 1999; Imhof and Wolffe 1999; Marin et al. 2017)

Durante la fase S del ciclo celular hay una abundancia de histonas y de HAT1 (Ruiz-Garcia et al. 1998; Suter et al. 2007), además de otras muchas proteínas y enzimas, debido a que en esta fase el ADN tiene que replicarse. Para poder realizar este proceso es necesario que la célula tenga energía suficiente, generada por los nutrientes disponibles. Así, la disponibilidad de AcCoA para HAT1 depende de la disponibilidad de glucosa. Por otro lado, la expresión de HAT1 aumenta en respuesta al EGF y es necesaria para el aumento de la proliferación celular inducida por EGF (Gruber et al. 2019). Cuando la célula comienza la fase S, se induce la expresión de altos niveles de HAT1 por parte de EGF (**Figura 5**). Esta enzima acetila la histona H4 de nueva síntesis y participa en su traslocación al núcleo con el complejo antes mencionado. Una vez allí, las histonas H3/H4 se ensamblan a la cromatina y HAT1 se separa de ellas para dirigirse al promotor del gen que codifica para la histona H4. Paralelamente la histona H4, 30-60 minutos después de su ensamblaje, se desacetila (Benson et al. 2007),

generando en el núcleo grupos acetato que, con ayuda de la enzima ACSS2 (AcCoA Short chain Synthetase 2), se transforman de nuevo en AcCoA. Esta enzima participa en condiciones de estrés de nutrientes, de hipoxia y es requerida para el crecimiento de tumores (Bulusu et al. 2017; Kamphorst et al. 2014; Comerford et al. 2014; Schug et al. 2015). La formación de AcCoA en el núcleo normalmente se produce a través de la enzima ACLY (ATP Citrate Lyase), que utiliza el citrato para producir AcCoA (Zaidi et al. 2012). Mientras tanto, HAT1 se encuentra en el promotor de la histona H4 e interviene en la llegada de otra histona acetiltransferasa que estimula la acetilación la lisina 9 de la histona H3, cogiendo el grupo acetilo de la AcCoA formada previamente. Se sabe que HAT1 no interacciona con la histona H3, por lo que se cree que interviene en que otra enzima la acetile. Esta acetilación provoca que se transcriba el gen de H4 (Gruber et al. 2019).



**Figura 5. Papeles de HAT1 durante la fase S del ciclo celular.** Esquema de la implicación de HAT1 en la disponibilidad de grupos acetilo en el citoplasma y en la formación de la histona H4 durante la fase S del ciclo celular. Figura realizada en BioRender.

En este circuito de producción y ensamblaje de la histona H4, HAT1 participa en dos puntos, primero ayudando a la traslocación al núcleo y posteriormente uniéndose al promotor de H4. Este proceso es muy dependiente de glucosa ya que, si ésta no está disponible en el medio, HAT1 no tiene a su cofactor disponible y no se puede formar histona H4 de nueva síntesis (Gruber et al. 2019). Una de las teorías derivadas de este descubrimiento es que el



motivo principal por el que HAT1 acetila la histona H4 de nueva síntesis es tener disponibilidad de AcCoA en el núcleo. Unido a esta hipótesis, Agudelo García y colaboradores (Agudelo Garcia et al. 2017) sugieren que la acetilación de H4 puede ser insuficiente para su traslocación al núcleo y, por tanto, HAT1 no es imprescindible para la importación nuclear (Varga et al. 2019).

Otra de las funciones nucleares que se han propuesto para HAT1 es su participación en la maduración de la cromatina (Ge et al. 2011; Agudelo Garcia et al. 2017), tema contradictorio ya que este proceso ocurre una vez que H4 se ha desacetilado (Nagarajan et al. 2013). Sin embargo, se ha observado que HAT1 está implicada en el reclutamiento de ciertas proteínas necesarias para la maduración del ADN, como proteínas asociadas a bromodominios (dominios proteicos que reconocen residuos de lisina acetilados) (Agudelo Garcia et al. 2017).

También se ha descrito la presencia de HAT1 en el Complejo de Reconocimiento del Origen de Replicación (ORC, Origin Recognition Complex) (Agudelo Garcia, Lovejoy, et al. 2020), y se han descrito interacciones con él, alterando la estructura de la cromatina de un subconjunto específico de proteínas del ORC, reclutando cofactores de iniciación de la replicación y contribuyendo a la eficiencia de este proceso (Suter et al. 2007). Siguiendo en el núcleo, HAT1 participa en el silenciamiento telomérico (Ruiz-Garcia et al. 1998; Kelly et al. 2000; Mersfelder and Parthun 2008; Tong et al. 2012), regulando la heterocromatina (Popova et al. 2021) y en la reparación del ADN (Qin and Parthun 2002; Barman et al. 2006; Tscherner et al. 2012; Nagarajan et al. 2013; Yang et al. 2013). Qin y Parthun proponen que HAT1, en levaduras, facilita el proceso de reparación del ADN, pero sin restaurar la estructura de la cromatina (Qin and Parthun 2006). Aunque la depleción de HAT1 en levaduras no genera daño en el ADN, este hecho sí se aprecia en otros organismos, incluidos mamíferos (Barman et al. 2006; Nagarajan et al. 2013; Yang et al. 2013; Benson et al. 2007; Tong et al. 2012).

Algunos autores apuntan también a que HAT1 está implicada en senescencia, demostrando una disminución de los niveles de HAT1 en tejidos envejecidos frente a tejidos más jóvenes (Nagarajan et al. 2019). De hecho, la progresión de una célula hacia la senescencia está asociada con un aumento de HAT1 citoplasmático y una reducción de HAT1 nuclear (Lebel et al. 2010).

Además, HAT1 participa en la incorporación de una variante de la histona H3, CENP-A (Centromere Protein A) en el centrómero, ya que la acetilación de la histona H4 en la lisina 12 permite que se de este proceso (Hoffmann et al. 2018; Shang et al. 2016; Kim et al. 2014; Liu et al. 2020)

También se ha descrito que HAT1 puede acetilar proteínas mitocondriales que regulan la función de la mitocondria (Agudelo Garcia, Nagarajan, et al. 2020). Esta teoría se basa en que

HAT1 es una de las pocas HATs citosólicas, y puede acetilar esas proteínas mitocondriales previamente a su importación a la mitocondria (Nagarajan et al. 2019).

#### d) Desregulación de HAT1

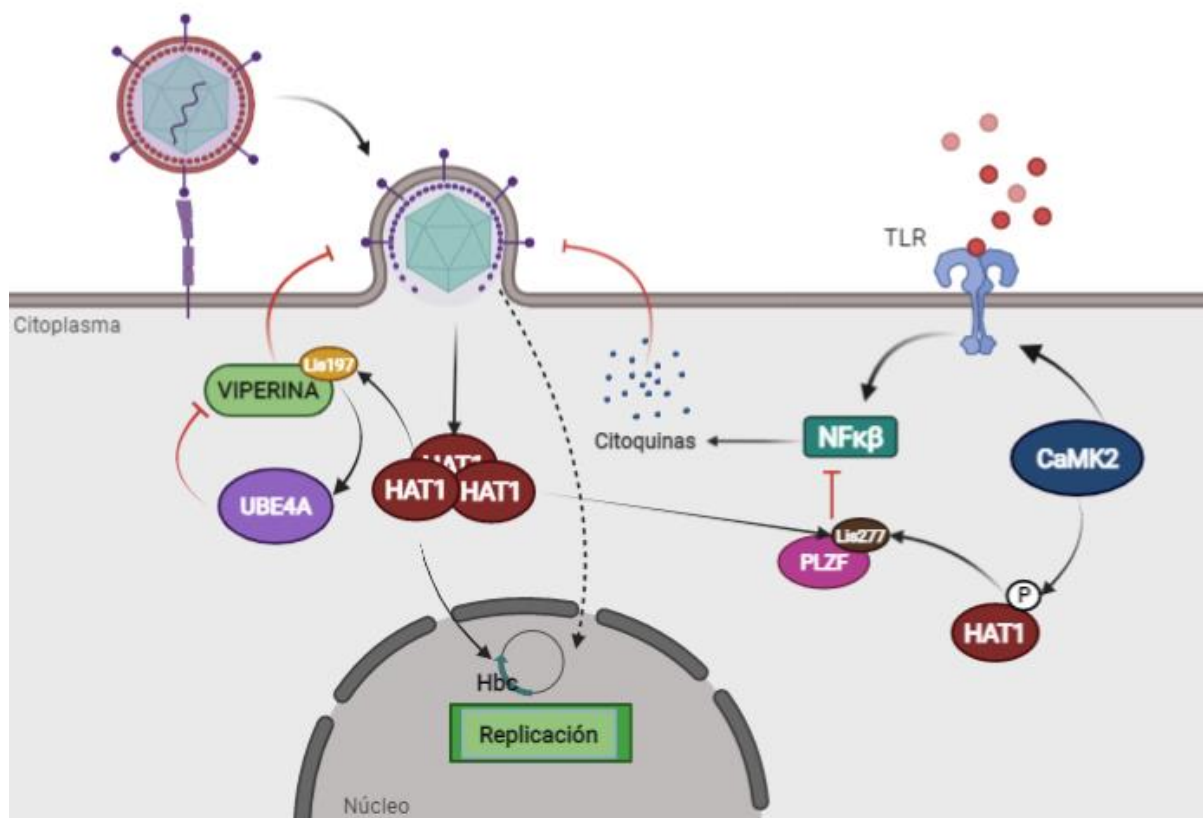
Como se puede apreciar, HAT1 es una enzima con papeles fundamentales en la célula, y su desregulación puede ocasionar problemas en sus funciones vitales. La alteración de los niveles de HAT1 está relacionada con varias enfermedades, como pueden ser enfermedades inflamatorias, infecciones virales o cáncer, entre otras.

El papel de HAT1 en el proceso inflamatorio viene asociado con uno de sus sustratos no histónicos, PLZF. Cuando hay un estímulo infeccioso, se desencadena la respuesta inmune primaria, activándose diferentes factores inflamatorios. Existe una proteína, la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK2, Calcium calModulin-dependent protein Kinase II) que inicia la producción de TLRs (Toll Like Receptor) y otros receptores de respuesta inmune innata (Olsen et al. 2006). Los TLRs, junto con TNF- $\alpha$  (Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ) activan NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias. Cuando la respuesta primaria ha cumplido su función, la misma proteína que activaba la respuesta inflamatoria, CaMK2, puede fosforilar a HAT1, activándola y provocando la acetilación de la lisina 277 de PLZF, haciendo que esta proteína integre un complejo que inactiva NF- $\kappa$ B, inhibiendo la respuesta inflamatoria (Sadler et al. 2015) (**Figura 6**).

Este hecho influye también en las infecciones víricas, que tienen un componente inflamatorio. En este sentido, el aumento de HAT1 estimularía la infección, ya que se inhibe la inflamación y esto hace que el virus no encuentre resistencia. También se ha demostrado una relación entre HAT1 y viperina, una proteína antiviral muy potente que se produce en el epitelio y que inhibe la infección de un amplio rango de virus (Helbig et al. 2005; Helbig et al. 2013; Riviaccio et al. 2006; Waheed and Freed 2007; Seo et al. 2011; Nasr et al. 2012; Wang et al. 2012). Yuan y colaboradores (Yuan et al. 2020) describen que la infección viral estimula la expresión de HAT1, la cual induce la acetilación de la lisina 197 de la viperina. Este proceso hace que se active otra proteína, UBE4A (Ubiquitination Factor E4A), que permite la degradación de la viperina, y favorece la infección (**Figura 6**).

Además de estos mecanismos generales en los que interviene, la histona acetiltransferasa 1 participa en otros procesos infecciosos dependiendo del virus que infecte. Por ejemplo, en el Virus de la Hepatitis B (HBV) se ha descrito una interacción entre HAT1 y la proteína HBc (Hepatitis B core protein), un componente estructural del cccDNA (covalently closed circular DNA) (Yang et al. 2019). Se sabe que los niveles de HAT1 aumentan en esta infección, y que

su depleción en células infectadas con HBV ocasiona una desregulación en el cccDNA, además de una disminución de la expresión de algunos factores de transcripción del virus, impidiendo su replicación (Wang et al. 2015) (**Figura 6**).



**Figura 6. Participación de HAT1 en la inflamación y en la infección viral.** Por un lado, a la derecha de la imagen se muestra el papel de HAT1 en inflamación descrito en el texto. Este proceso puede ocurrir en cualquier tipo de infección. El conjunto de la imagen se refiere a una infección viral, en este caso de HBV, y se atisba un esquema de la implicación de HAT1 en todo el proceso, que conlleva 3 puntos: inhibir la inflamación evitando la tormenta de citoquinas, marcar viperina para degradación y favorecer la replicación viral. Las flechas rojas indican inhibición. Figura realizada en BioRender.

HAT1 también tiene relación con la infección viral más importante de los últimos años, el COVID-19. Así, según análisis de correlación realizados, la histona acetiltransferasa 1 podría ser un regulador potencial del receptor ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2), vía de entrada del SARS-COV2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) en las células (Pinto et al. 2020). De hecho, De Oliveira y colaboradores (de Oliveira et al. 2020) sugieren que HAT1 debería ser estudiado para el tratamiento frente al COVID-19.

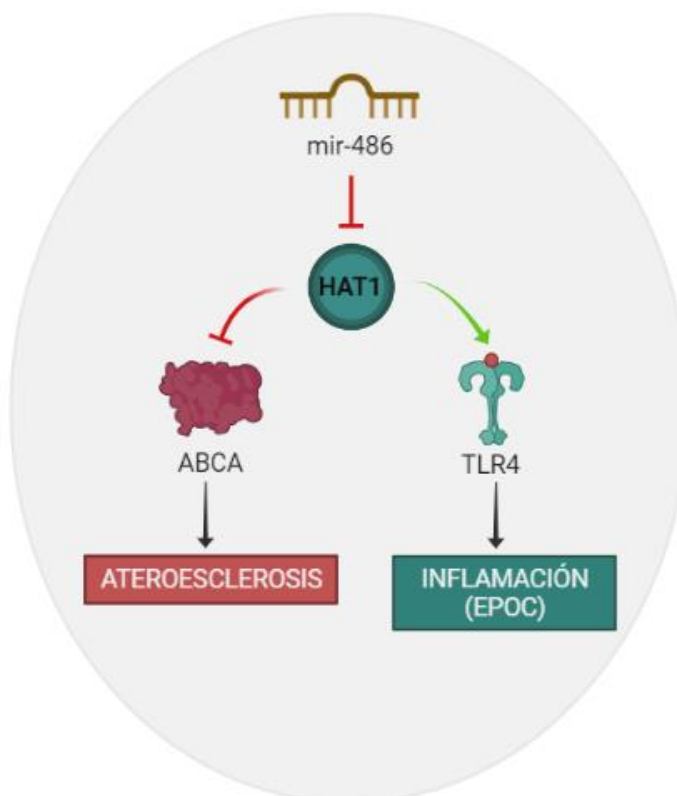
Hay otras enfermedades inflamatorias no víricas en las que también participa HAT1, como es el caso de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). El miR-486-5p, que se encuentra sobreexpresado en pacientes con EPOC y fumadores, se une al ARNm de HAT1 para inhibir su expresión y desencadenar una respuesta inflamatoria, de manera que cuando

HAT1 se inhibe, se sobreexpresa TLR4 (**Figura 7**), y viceversa. Esto también ocurre con otros agentes proinflamatorios, como son IL-6/8, INF- $\gamma$  (Interferon gamma) y TNF- $\alpha$  (Zhang et al. 2020). Otro estudio también revela que los niveles de HAT1 son bajos en ratones con EPOC expuestos al humo del tabaco (Sundar and Rahman 2016).

La inhibición de HAT1 por parte del miR-486 está también relacionada con aterosclerosis (**Figura 7**). La proteína ABCA1 (ATP-Binding Cassette transporter A1) impide el desarrollo de esta enfermedad mediando en la homeostasis del colesterol, y está regulada por HAT1, de manera que, si se inhibe HAT1, se inhibe ABCA1 y se promueve la patología. Por tanto, miR-486 promueve la aterosclerosis bloqueando HAT1 y esta, a su vez, inhibiendo ABCA1 (Liu, Zhang, et al. 2016). Por otro lado, un estudio publicado en 2019 relaciona HAT1 con Nox-5 (NADPH oxidase 5), una enzima que produce especies reactivas del oxígeno (ROS) en aterosclerosis. Sus resultados indican que HAT1 y Nox-5 se encuentran sobreexpresadas en la zona de la lesión y sugieren la existencia de un nuevo mecanismo regulatorio HAT1-Nox5 que podría contribuir a la sobreproducción de ROS en macrófagos durante la inflamación asociada a esta enfermedad (Vlad et al. 2019).

También se ha encontrado una desregulación de HAT1 en isquemia cerebral. Se analizaron los niveles de HAT1 en la zona de penumbra isquémica durante la “ventana terapéutica” (hasta 24 horas después del episodio) de un accidente cerebrovascular fototrombótico en ratas. El nivel de HAT1 en la penumbra aumentó progresivamente más del 88% hasta 24h después de este evento (Demyanenko and Uzdensky 2019; Demyanenko et al. 2020).

Por último, en 2018 Vrtacnik y colaboradores (Vrtacnik et al. 2018) demostraron una relación entre HAT1 y factores reguladores del desarrollo óseo, sugiriendo que la alta expresión de esta enzima está asociada con la formación de hueso, así como de tejido óseo de calidad, proponiendo una nueva función de HAT1 en el mantenimiento de la homeostasis ósea, y una posible diana para los desórdenes óseos, como la osteoporosis y la osteoartritis.



**Figura 7. Regulación de HAT1 por parte de miR-486.** El papel de HAT1 en estas dos patologías está regulado por miR-486, que inhibe HAT1. Esta inhibición, en aterosclerosis, provoca una inhibición de la proteína ABCA y se desarrolla la enfermedad. También, en EPOC, la inhibición de HAT1 provoca una activación de los procesos inflamatorios y, por tanto, de la patología. Las flechas rojas indican inhibición y las verdes activación. Figura realizada en BioRender.

### e) HAT1 en cáncer

Aunque se ha establecido una relación entre HAT1 y el cáncer, aún no se conocen todos los mecanismos en los que podría estar implicada esta proteína.

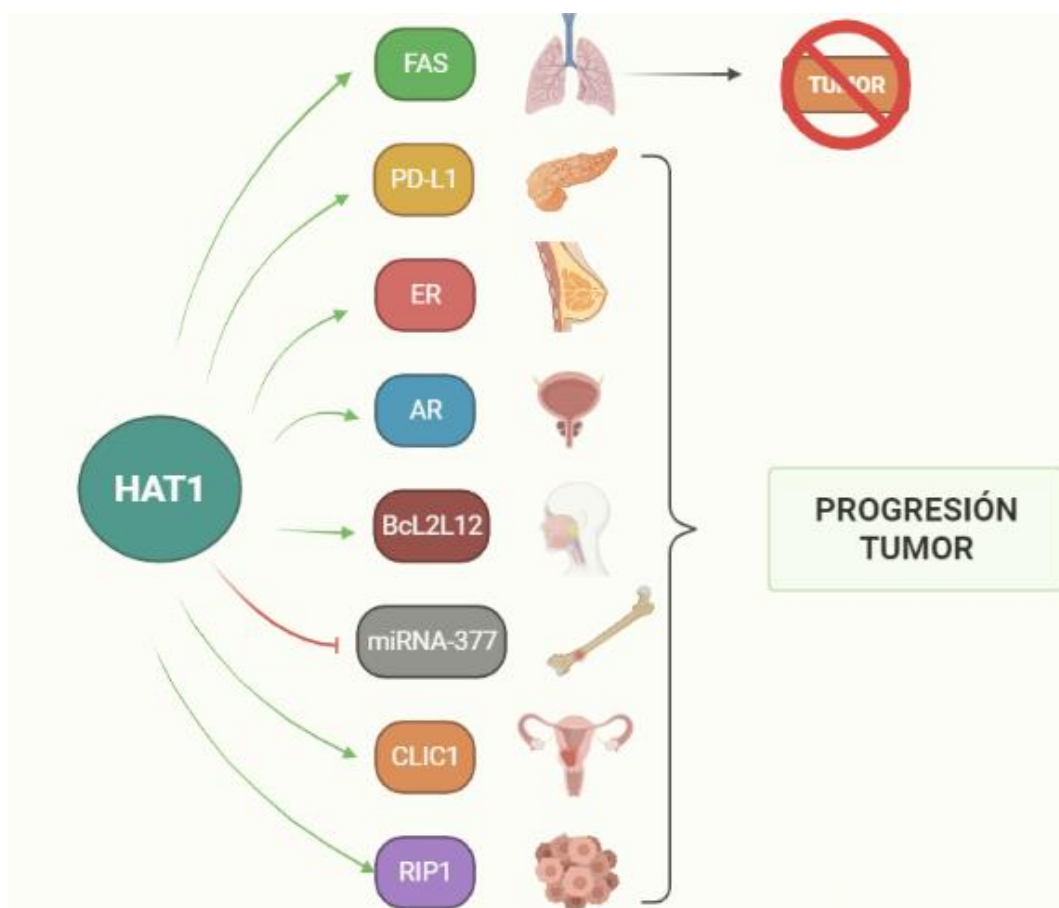
La histona acetiltransferasa 1 tiene un papel contradictorio en carcinogénesis ya que su expresión varía en diferentes tipos de tumores (Poziello et al. 2020). En algunos de ellos, dependiendo del estudio al que se haga referencia, presenta niveles altos y bajos para un mismo tipo de cáncer. Así, HAT1 muestra baja expresión en células de cáncer de pulmón extraídas de tejido comparado con células de tejidos normales (Han et al. 2017), al igual que en una línea celular metastásica de cáncer de mama (Santos et al. 2015). Por el contrario, esta enzima presenta una sobreexpresión, a nivel de ARNm y/o proteína, en tejido tumoral con respecto a no tumoral en cáncer de pulmón (Aran et al. 2017), adenocarcinoma pancreático ductal (Fan et al. 2019), cáncer de próstata (Hong et al. 2021), linfoma difuso de células B grandes, linfoma periférico de células T no especificado y linfoma extraganglionar de células T/NK de tipo nasal (Min et al. 2012), tumores primarios de cáncer de esófago y

tejidos adyacentes (Xue et al. 2014), queratitis actínica y carcinoma de célula escamosa de labio (Chrun et al. 2017), cáncer nasofaríngeo (Miao et al. 2018), osteosarcoma (Xia et al. 2019), leiomiomas uterino y tumor de músculo liso de potencial maligno incierto (Lin et al. 2020), cáncer cervical (Wang et al. 2021), cáncer hepático (Jin et al. 2017; Pogribny et al. 2007), y tanto en tumores primarios como en metástasis de cáncer colorrectal (Seiden-Long et al. 2006). Además, este aumento de los niveles de HAT1 está relacionado con un mal pronóstico, una mala diferenciación del tumor y una baja supervivencia en pacientes con cáncer (Min et al. 2012; Xue et al. 2014; Fan et al. 2019; Lin et al. 2020).

La depleción de HAT1 en células tumorales de adenocarcinoma de pulmón y de cáncer de hígado (Gruber et al. 2019), de páncreas (Fan et al. 2019), de osteosarcoma (Xia et al. 2019) y de cáncer cervical (Wang et al. 2021) provoca una disminución de la proliferación celular y de la formación de colonias y promueven la apoptosis de las células tumorales. En células de cáncer de esófago, este hecho induce una parada de las células en la fase G2/M del ciclo celular (Xue et al. 2014). En modelos murinos de cáncer de páncreas (Fan et al. 2019), de xenoinjerto de cáncer de próstata (Hong et al. 2021), de osteosarcoma (Xia et al. 2019), de cáncer de mama (Gruber et al. 2019) y de cáncer hepático (Jin et al. 2017) esta depleción causa una disminución del tamaño del tumor.

También se han encontrado multitud de interacciones entre HAT1 y diferentes dianas terapéuticas de cáncer (**Figura 8**). De este modo, Han y colaboradores (Han et al. 2017) proponen una correlación positiva entre HAT1 y FAS, una proteína apoptótica, donde una restauración de los niveles de HAT1 provoca también un aumento de los niveles de FAS, induciendo apoptosis en las células tumorales de pulmón. En cáncer de páncreas relacionan a HAT1 con PD-L1, una proteína que induce la apoptosis de células T e inhibe la activación de células T-citotóxicas en tumores. En este estudio sugieren que HAT1 regula PD-L1, de manera que una inhibición de HAT1 inhibe también PD-L1, y esto provoca la reactivación de la respuesta de células T (Fan et al. 2019). Otro tipo de biomarcadores que tienen una correlación positiva con HAT1 son los receptores hormonales como ER (Estrogen Receptor) en cáncer de mama (Sorbello et al. 2003), o AR (Androgen Receptor) en cáncer de próstata. En éste último, HAT1 regula la expresión de las dos variantes más estudiadas del AR, AR-V7 y AR-FL (Hong et al. 2021). Bcl2L12 (Bcl2 Like Protein-12) es una proteína que también está regulada por HAT1 y su expresión confiere a la célula resistencia a la apoptosis. Los niveles altos de HAT1 en cáncer nasofaríngeo hacen que aumente la expresión de Bcl2L12 y se suprima la apoptosis de las células tumorales (Miao et al. 2018). Lo mismo ocurre en osteosarcoma, donde HAT1 bloquea al miRNA-377 evitando así la muerte celular programada de las células tumorales (Xia et al. 2019). También, los niveles de acetilación de la lisina 131 en la proteína CLIC1, una proteína implicada en la progresión tumoral, están elevados en

cáncer cervical, favoreciendo la proliferación celular, la migración, la invasión y la tumorigénesis. HAT1 es responsable de esta acetilación, aumentando la estabilidad de CLIC1 y facilitando la proliferación del tumor (Wang et al. 2021). Además, existe una proteína de bromodominio, BRD4, que varios estudios destacan por su relación con HAT1. BRD4 es una proteína cuya expresión continuada se asocia a varios tipos de cáncer (Mustafi et al. 2018), uniéndose a la histona H4 en el nucleosoma cuando HAT1 acetila las lisinas 5 y 12. De esta manera, BRD4 se puede unir a promotores de diferentes genes, como el de PD-L1 (Fan et al. 2019) o del receptor de andrógenos (Hong et al. 2021) y el bloqueo de HAT1 impide esa unión. Por último, la proteína RIP1 (kinase Receptor-Interacting Protein 1), generalmente sobreexpresada en diferentes tumores, y que juega un papel tanto en la regulación de la supervivencia como en apoptosis, está regulada por acetilación, por lo que se sugiere que HAT1 podría también regular esta diana (Carafa et al. 2018).



**Figura 8. Relación de HAT1 con diferentes biomarcadores en cáncer.** Niveles altos de HAT1 activan o inhiben diferentes biomarcadores que favorecen o frenan la progresión tumoral de los diferentes tipos de cáncer. Las flechas verdes indican activación y la roja inhibición. Figura realizada en BioRender.

Según varias investigaciones, HAT1 está implicada en resistencia a fármacos, de manera que si se bloquea su actividad en células de carcinoma hepatocelular, células de cáncer de colon o células de cáncer de próstata, el tratamiento con cisplatino, con 5-fluorouracilo o con enzalutamida, respectivamente, es más efectivo (Kang et al. 2016; Jin et al. 2017; Hong et al. 2021). Sin embargo, Miyamoto y colaboradores (Miyamoto et al. 2008) sugieren todo lo contrario en células de cáncer epidermoide y de cáncer de próstata resistentes a cisplatino, donde el bloqueo de HAT1 no hace que las células sean sensibles a este fármaco. También, en melanoma metastásico, el tratamiento con inhibidores de BRAF (BRAFi, aprobados por la FDA) aunque es efectivo, tarda muy poco en generar resistencia y este hecho se ha asociado a que provocan una disminución de los niveles de HAT1, lo que sugiere que la pérdida de esta enzima es un mecanismo crucial que conduce a la resistencia a BRAFi en melanoma (Bugide et al. 2020).

En cuanto a la localización subcelular de HAT1 en los diferentes tipos de cáncer también hay controversia. Así, en cáncer colorrectal y de esófago, la localización citoplasmática de esta proteína aumenta drásticamente en tumores primarios y metástasis (Xue et al. 2014; Seiden-Long et al. 2006). También en células HEK293FT de riñón hay una mayor representación en citosol que en núcleo (Carafa et al. 2018). Por el contrario, en adenocarcinoma y carcinoma de célula escamosa de pulmón, se ha descrito su localización como exclusivamente nuclear (Fukuoka et al. 2004).

#### **f) Inhibidores de HAT1**

Vista la importancia creciente de esta enzima, no es de extrañar que la búsqueda de inhibidores de HAT1 haya suscitado un gran interés en la comunidad científica. Sin embargo, no son muchas las moléculas desarrolladas para tal fin. Se han descrito 6 inhibidores y 2 activadores, y de todos ellos solo 2 de los inhibidores se han sintetizado específicamente para bloquear la función de la diana y están aún en fases de desarrollo.

El primero se describió en 2019 y consiste en un inhibidor bisustrato con una parte del sustrato y otra del cofactor. De todos los inhibidores probados, el más efectivo fue H4K12CoA, con una  $K_i$  de 1.1 nM. Sin embargo, no puede atravesar la membrana celular (Ngo et al. 2019). El segundo fármaco potencial frente a HAT1 se desarrolló a mediados de 2021 y consiste en una pequeña molécula análoga de riboflavina identificada mediante análisis *in silico*. Esta molécula, JG-2016, se une a HAT1 en el sitio del cofactor sin competir con las histonas. En células tumorales de cáncer de mama y pulmón inhibe su crecimiento un 69% a 100  $\mu$ M, pudiendo atravesar la membrana celular. En modelos murinos con cáncer de pulmón se ha descrito una inhibición del crecimiento del tumor con relación dosis-respuesta (Gruber et al. 2021).



El resto de inhibidores, a pesar de sintetizarse para otras moléculas, pueden interaccionar con HAT1. La citocalasina B es un inhibidor de la polimerización de actina que puede afectar a la actividad celular y se usa normalmente en estudios de citología. Se observó que disminuye los niveles de HAT1 de manera significativa (Hou et al. 2016). El pazopanib (inhibidor de tirosina quinasa con efectos antiangiogénicos) y la hipertermia actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de células de leiomioma uterino. Estos dos mecanismos provocan la inhibición de HAT1 a nivel de su promotor. Por separado también funcionan, aunque su efecto es mayor si se combinan (Lin et al. 2020). Por último, el ascorbato también disminuye los niveles de HAT1 (Mustafi et al. 2018).

Hasta el momento, solamente se han descrito dos fármacos que aumentan los niveles de HAT1, la genisteína (medicamento utilizado en cáncer de próstata) (Phillip et al. 2012), y la metformina (utilizado en diabetes tipo II) (Bridgeman et al. 2018). Este último induce la fosforilación de HAT1, realizada por AMPK (AMP-activated Protein Kinase), activando la enzima (Marin et al. 2017).

Como sugieren los datos de la literatura, HAT1 está relacionada con diversas patologías, entre ellas, la oncogénesis y progresión tumoral en diversos tipos de cáncer. Aun cuando la relevancia real de este enzima en cáncer está por determinar y son necesarios más estudios al respecto, los datos disponibles son lo suficientemente importantes como para que se haya considerado a HAT1 como potencial diana terapéutica (Tafrova and Tafrov 2014; Poziello et al. 2020; Espindola et al. 2018; Xue et al. 2014; Jin et al. 2017; Miao et al. 2018). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, solamente se han descrito dos inhibidores específicos de HAT1, y no hay más estudios realizados con ellos que los originales de los autores que los sintetizaron. Es, por tanto, necesario el desarrollo de inhibidores específicos que contribuyan al estudio de esta enzima y que puedan servir como base de partida para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

### **3. APTÁMEROS COMO HERRAMIENTAS TERAPEÚTICAS**

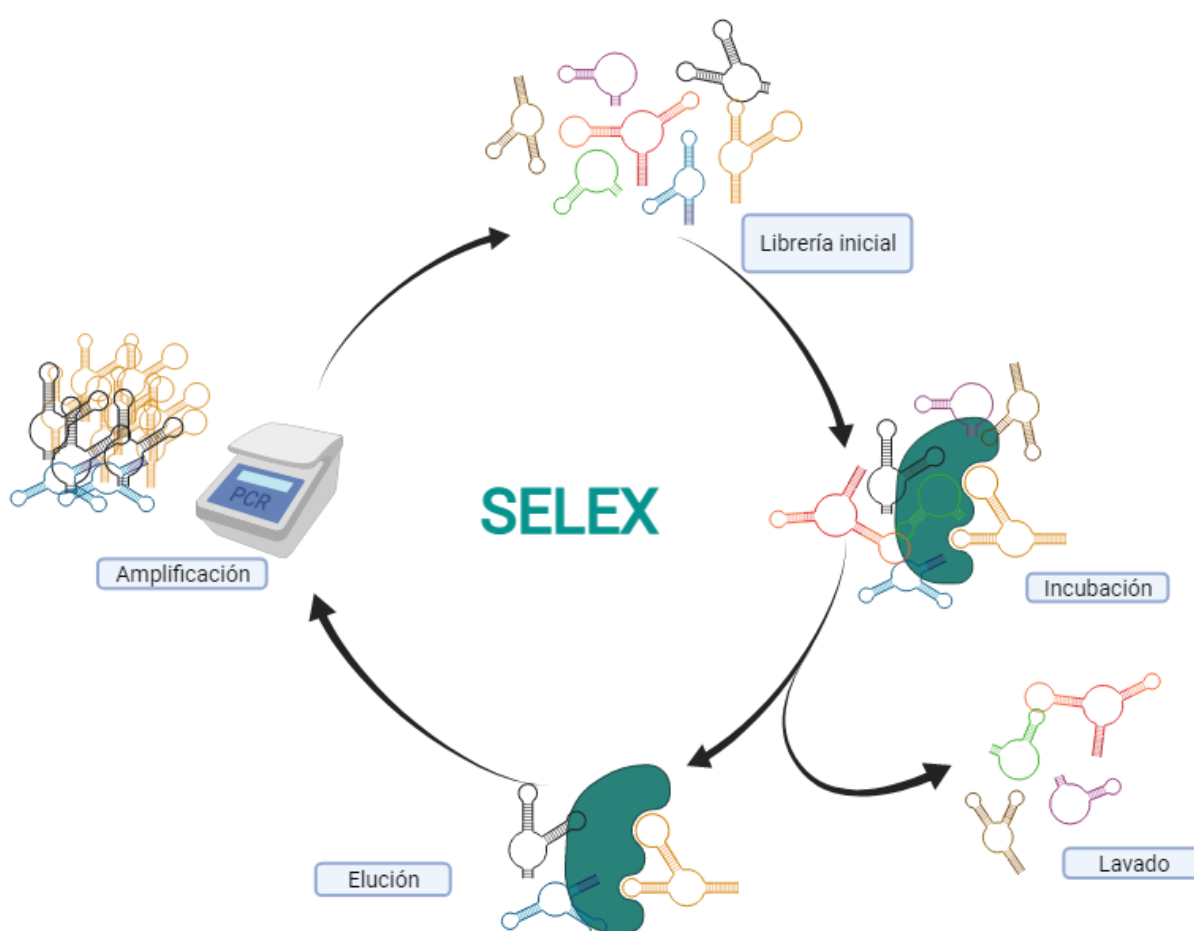
Los aptámeros son oligonucleótidos de ARN o ADN de cadena sencilla que se estructuran con una conformación tridimensional y se unen a una molécula diana con alta especificidad y afinidad (Wan et al. 2021). Fueron descubiertos por dos grupos de investigación independientes en 1990 (Tuerk and Gold 1990; Ellington and Szostak 1990), y desde entonces han despertado un gran interés académico e industrial, dado su gran potencial como herramientas diagnósticas y terapéuticas.

### 3.1. Enriquecimiento exponencial en presencia de ligando. Método SELEX

El procedimiento por el cual se seleccionan estas moléculas se conoce como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk and Gold 1990). Esta técnica consiste en realizar varias rondas de selección en las que una librería inicial de aptámeros se presenta a la molécula de interés, a la que se unen las secuencias que la reconocen y se descartan las demás. Según van avanzando las rondas, las condiciones se hacen más restrictivas, de manera que al final del proceso se obtienen los oligonucleótidos más afines y específicos para la diana. La librería inicial con la que empieza este proceso, tanto para seleccionar aptámeros de ADN como de ARN, la componen secuencias de ADN obtenidas por síntesis química y formadas por una región central y variable de 20-80 nucleótidos, flanqueada por dos regiones de secuencia conocida de 18-20 nucleótidos a los que se unirán los cebadores para poder amplificar por PCR (Devi et al. 2021). En el caso de aptámeros de ARN, la población inicial se debe transcribir previamente a ARN, utilizando una ARN polimerasa específica (Mok and Li 2008). El número de secuencias que hay en la librería inicial depende de la longitud de la región variable. Así, si se trabaja con secuencias de región variable de 40 nucleótidos ( $4^{40}$ ), se tienen  $1.2 \times 10^{24}$  aptámeros diferentes en el pool inicial (Gonzalez et al. 2016). Sin embargo, este dato teórico no es real en términos prácticos, ya que la librería suele estar limitada a  $10^{13}$ - $10^{15}$  secuencias individuales diferentes (Proske et al. 2005; Alshaer et al. 2018; Kaur et al. 2018).

En una selección hay diferentes variables que hay que manejar en función de la naturaleza de la diana (punto isoeléctrico, tamaño, etc.) y del objetivo final del producto (diagnóstico o terapia). Para optimizar una selección hay que hacer un estudio previo de estas características ya que, dependiendo de ellas se elegirá el tampón (ácido, básico), la temperatura (25°C, 37°C), el tiempo de incubación (30 minutos, 1 hora), el soporte sobre el que se realizará la selección (placa, resina, en suspensión) y la relación de concentración aptámero-proteína. Desde su descubrimiento se han desarrollado diferentes estrategias alternativas al método SELEX tradicional como electroforesis capilar, microfluídica, microarrays, HPLC, oro coloidal, etc. (Mendonsa and Bowser 2004; Krylov 2006; Hybarger et al. 2006; Ogawa and Biggin 2012; Kong and Byun 2013; Zhuo et al. 2017; Wang et al. 2008; Huang et al. 2008; Michaud et al. 2003; Muller et al. 2008; Brody et al. 1999; Bock et al. 2004; Moreno et al. 2003), que ayudan a que el proceso sea más eficiente. Con todos los parámetros anteriores bien establecidos se conseguirá que el proceso SELEX ocurra de manera más eficaz y el número de rondas de selección se optimice. Una vez elegidas todas estas características comienza la selección, que se basa en tres pasos principalmente (Ismail and Alshaer 2018). El primero es el proceso de incubación, en el que se pone en contacto la librería de aptámeros con la molécula diana y se incuba un tiempo determinado. Este tiempo puede ir disminuyendo según van avanzando

las rondas para conseguir secuencias más afines. Al finalizar este paso se obtienen aptámeros unidos a la diana y otros libres que no la reconocen y que hay que descartar. Para ello se continua con el segundo paso, el de elución, en el que se hacen varios lavados para descartar las secuencias que no reconocen la diana. En ellos, dependiendo de las características de la selección, sobre todo del soporte en el que se realice, se realizan técnicas físicas de separación como, por ejemplo, la centrifugación o la aspiración del tampón por vacío. Cuando se tienen únicamente los aptámeros unidos a la diana se realiza el último paso, el de amplificación por PCR o RT-PCR, con el que se obtiene una población enriquecida de aptámeros que reconocen la diana objeto de estudio y que se utilizará para la ronda siguiente de selección (Ospina 2020) (**Figura 9**).



**Figura 9. Esquema del proceso SELEX.** Selección de aptámeros *in vitro* que parte de una población inicial de moléculas de ssDNA o ARN con secuencias aleatorias. En este proceso se produce una repetición de las etapas sucesivas de incubación, elución y amplificación. Los aptámeros que se seleccionan en una ronda sirven de población para la siguiente. La ronda final termina tras la amplificación. Figura realizada en BioRender.

El producto de PCR obtenido al final de cada ronda es de cadena doble y, después de purificarlo para eliminar todos los componentes de la PCR no unidos y los restos de la

molécula diana, hay que separar la secuencia de los aptámeros de su cadena complementaria. Para ello se utilizan diferentes técnicas, como desnaturalización a 90°C, PCR asimétrica, digestión enzimática con exonucleasa, electroforesis y posterior elución de la banda correspondiente, o marcaje de una de las cadenas con biotina para separarlas con resina de estreptavidina (Cruz-Aguado and Penner 2008; Svobodova et al. 2012), entre otras.

Dependiendo del tipo de selección y de su evolución, se puede hacer entre las rondas una selección negativa o contraselección (Ruiz Ciancio et al. 2018). Este proceso puede aumentar la especificidad de los aptámeros hasta 10 veces, y consiste en incubar la población de aptámeros con una molécula diana inespecífica, o con el soporte con el que se realiza la selección (por ejemplo, una resina), de manera que los aptámeros que se unan a ella se descartan para la unión a la diana de interés (Ospina 2020). Este proceso es muy conveniente cuando se quieren obtener aptámeros específicos que sean capaces de discernir entre dianas muy similares como, por ejemplo, una mutación puntual de una proteína o una isoforma (Zhang et al. 2009; Li et al. 2015; Kaur et al. 2020).

Cada cierto número de rondas se realiza una prueba para comprobar la evolución de la selección, es decir, si está habiendo enriquecimiento de la población. Los procedimientos utilizados pueden ser, entre otros, inmunoensayos en placa con aptámeros (ELONA), aptaslot blot, aptawestern blot, o PCR a tiempo real (Drolet et al. 1996; Ferreira et al. 2008; Murphy et al. 2003; Toh et al. 2015; Liu et al. 2021). Cuando estas pruebas dan resultados positivos y, por tanto, se deduce que hay aptámeros específicos y afines a la diana, este proceso SELEX se da por finalizado y se procede a aislar esas secuencias para conseguir aptámeros individuales. Para lograrlo se pueden utilizar dos métodos: por un lado, se realizan técnicas de clonaje y posterior secuenciación SANGER, de manera que se obtiene una representación de los aptámeros más abundantes de la selección. Por otro lado, se puede hacer una secuenciación de nueva generación (NGS), con la que se obtiene toda la población de aptámeros que reconoce a la diana y permite ver la evolución de las secuencias en la selección. La NGS combinada con la bioinformática ha supuesto un gran avance en el análisis de poblaciones y de la selección de aptámeros (Ruiz Ciancio et al. 2018).

### **3.2. Estructura de los aptámeros**

Los aptámeros son capaces de adoptar una estructura terciaria bajo unas determinadas condiciones de pH, temperatura y salinidad. Los oligonucleótidos de ARN presentan una mayor plasticidad estructural que los de ADN, lo que les permite tener mayor diversidad de estructuras (Leontis et al. 2006). El plegamiento de esta estructura se puede conocer si se cristaliza la molécula y se analiza por difracción de rayos X, aunque el aptámero tiene que estar acomplejado con su molécula diana, ya que su pequeño tamaño hace imposible su

cristalización por sí solo. Incluso con el complejo, la obtención del cristal es bastante costosa, laboriosa y, hasta la fecha se han obtenido pocos cristales. También se puede conocer su estructura por resonancia magnética nuclear (RMN), pero también existen muchas limitaciones (Morozov et al. 2021). En su lugar se trabaja con la estructura secundaria, que se puede predecir con programas informáticos (Davis et al. 1996) como mFold y QGRS Mapper, entre otros. Estos análisis permiten predecir si un aptámero forma estructuras como tallos, horquillas, pseudoknots, *G-quadruplex*, etc. que permitan atisbar su estabilidad. Estas uniones están reforzadas mediante interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y complementariedad de bases (Hermann and Patel 2000; Buglak et al. 2020; Shigdar et al. 2013), formando la estructura terciaria. Todo este estudio de la estructura permite optimizar la secuencia con modificaciones que hagan al aptámero más estable o más afín a su diana, entre otras cosas. La unión de estas secuencias con su diana es principalmente estructural, es decir, que necesitan de una estructura terciaria para poder encajar en ella. De hecho, la palabra aptámero proviene de una raíz latina “aptus”, que encaja, y otra griega, “mers”, molécula, por lo que el nombre determina su función, “molécula que encaja” (Ellington and Szostak 1990). Para que se pueda dar este reconocimiento estructural, también son necesarias otras interacciones, como relaciones hidrofóbicas, apilamiento de bases, etc. que hagan que la unión del aptámero a su diana sea óptima (Hermann and Patel 2000; Lin et al. 2012; Munzar et al. 2018).

### 3.3. Comparativa Aptámero-Anticuerpo

Desde su descubrimiento, los aptámeros se han comparado con los anticuerpos, ya que el objetivo de ambas moléculas es el mismo, aunque con notables diferencias. Una población enriquecida de aptámeros se asemeja a anticuerpos policlonales y un único aptámero es comparable con un anticuerpo monoclonal (Liss et al. 2002; Darfeuille et al. 2006; Chen et al. 2007; Kalra et al. 2018). La versatilidad estas moléculas confiere diversas ventajas frente a los anticuerpos que se resumen en la **Tabla III** (Keefe et al. 2010; Gonzalez et al. 2016; Alshaer et al. 2018; Kaur et al. 2018; Ismail and Alshaer 2018). Las características que definen a estas moléculas hacen que tengan una gran utilidad en la biomedicina, ya que son moléculas altamente estables a cambios de temperatura y pH, así como a modificaciones de su entorno (Mayer 2009; Ruiz Ciancio et al. 2018; Wan et al. 2021), especialmente los aptámeros de ADN. Además, tienen constantes de disociación en el rango nanomolar (Garcia-Recio et al. 2016; Guerra-Perez et al. 2015). Las dianas que los aptámeros pueden reconocer son muy variables, como iones, toxinas, moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, proteínas, virus, bacterias, parásitos, factores de crecimientos, células, antibióticos, parásitos, órganos completos, animales vivos y hormonas, entre otros (Hofmann et al. 1997; Jayasena 1999; Berens et al. 2001; Grate and Wilson 2001; Masud et al. 2004; Sazani et al. 2004; Stoltenburg

et al. 2005; Shangguan et al. 2006; Chen et al. 2007; Mallikaratchy et al. 2007; Mayer 2009; Balogh et al. 2010; Gonzalez et al. 2016; Alshaer et al. 2018). Asimismo, los aptámeros generan una baja inmunogenicidad y toxicidad, y tienen una alta reproducibilidad, ya que no presentan variaciones entre lotes (Pereira et al. 2018; Wan et al. 2021), con un bajo coste, en especial los aptámeros de ADN (Zhou and Rossi 2014).

Las características de estos oligonucleótidos también les confieren limitaciones, ya que como tienen carga negativa por ser ADN o ARN, pueden interactuar con multitud de proteínas del suero humano y pueden ser sensibles a degradación por nucleasas. Además, pueden acumularse en tejidos causando efectos secundarios, y su estructura terciaria es muy dependiente de las condiciones del medio. Para paliar estas desventajas, estas moléculas se pueden modificar (Ni et al. 2017; Haruta et al. 2017; Maier and Levy 2016; Darfeuille et al. 2004) y evitar así muchas de ellas.

**Tabla III. Listado de las principales ventajas de aptámeros frente a anticuerpos.**

APTÁMEROS	ANTICUERPOS
Se producen por síntesis química con muy baja o nula variación de lote a lote	Suelen sufrir variaciones entre lotes
No requieren del uso de animales	Requieren el uso de animales
Se pueden seleccionar frente a todo tipo de moléculas, incluyendo proteínas no inmunogénicas y toxinas	Solo se pueden obtener frente a proteínas inmunogénicas
Tienen un tamaño pequeño (5-30 KDa), lo que permite una entrada más eficiente en la célula	Su tamaño es mayor que el de los aptámeros (150-180 KDa), lo que limita el acceso a los compartimentos celulares
Pueden renaturalizarse en minutos, y al ser tan estables pueden almacenarse durante mucho tiempo y transportarse a temperatura ambiente	Tienen una vida media limitada, y son sensibles a temperatura sin posibilidad de renaturalización
Pueden modificarse para aumentar su estabilidad, conjugarse con moléculas marcadoras, etc.	Sólo pueden marcarse, pudiendo causar pérdida de afinidad
Las condiciones de la selección son modificables según los diferentes requerimientos de la diana	Obtención sólo bajo condiciones fisiológicas

### 3.4. Usos de los aptámeros

Los aptámeros se descubrieron hace más de 30 años, y siendo unas moléculas tan prometedoras y con un potencial tan grande, resulta inexplicable que hoy en día sigan siendo unos desconocidos. Esto puede ser debido a que el método SELEX ha estado protegido por una patente hasta el año 2013, por lo que no se pudo utilizar esta técnica de manera libre hasta entonces (Ospina 2020). Por tanto, teniendo en cuenta que llevar un fármaco al mercado supone una media de 10 años aproximadamente, es probable que en los próximos años los aptámeros sean más abundantes y conocidos en la vida cotidiana (Kaur et al. 2018). Prueba de ello es que el número de patentes solicitadas y de artículos publicados ha aumentado sustancialmente en los últimos años (Ospina 2020).

Las aplicaciones de los aptámeros van desde el diagnóstico de enfermedades (Park 2018; Wandtke et al. 2015; Tombelli et al. 2005; Ruiz Ciancio et al. 2018; Wan et al. 2021; Aira et al. 2021; Devi et al. 2021; Frezza et al. 2020) hasta su empleo como herramienta terapéutica (Wandtke et al. 2015; Lao et al. 2015; Wan et al. 2021; Devi et al. 2021), aunque también se utilizan para la vehiculización de fármacos (Zhao et al. 2015; Alshaer et al. 2018), como biosensores (Wan et al. 2021; Devi et al. 2021), en la inspección de alimentos (Dong et al. 2014), en el radiomarcaje (Tan et al. 2013) y en la orientación de nanopartículas (Liu, Wei, et al. 2016). Los aptámeros de ARN pueden expresarse en el interior celular, lo que los hace muy versátiles para su uso como agentes terapéuticos (Mayer et al. 2001).

Hasta la fecha, solo un aptámero con aplicación terapéutica ha conseguido llegar al mercado aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), el Pegaptanib o Macugen<sup>®</sup>. Esta molécula de ARN se desarrolló para inhibir una de las isoformas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) que está implicada en la degeneración macular asociada a la edad (AMD, Age-related Macular Degeneration) (Chakravarthy 2006; Ruiz Ciancio et al. 2018), y se utiliza desde 2004 para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado anticuerpos más efectivos frente a esta patología, por lo que este aptámero se está dejando de usar (Ruiz Ciancio et al. 2018).

Actualmente existen 21 aptámeros en ensayos clínicos que se encuentran en distintas fases de estudio, e incluso alguno de ellos participa en varios ensayos (**Tabla IV**). Es de destacar el ensayo clínico del fármaco Aptoll, aptámero desarrollado en nuestro laboratorio y que actualmente se encuentra en fase II, con resultados bastante prometedores. Este aptámero inhibe el receptor de membrana TLR4, proinflamatorio, de manera que se consigue una disminución de la inflamación en la zona afectada por el infarto cerebral (Fernandez et al. 2018).

Tabla IV. Aptámeros con aplicación terapéutica aprobados o en ensayos clínicos.

Tabla basada en (Zhang et al. 2021).

APTÁMERO	DIANA	APLICACIÓN	FECHA DE INICIO	FASE CLÍNICA, ESTADO
ARC1905	C5	Degeneración macular asociada a la edad	Julio 2009	Fase1, completada
		Enfermedad de Stargardt	Julio 2008	Fase 2, completada
Zimura	C5	Vasculopatía coroidea polipoidea	Marzo 2015	Fase 2, completada
		Degeneración macular asociada a la edad	Enero 2016	Fase 2, completada
Fovista	PDGF BB	Degeneración macular asociada a la edad	Abril 2016	Fase 1, terminada
E10030 plus Lucentis	PDGF	Degeneración macular asociada a la edad	Marzo 2010	Fase 2, completada
EYE001	VEGF	Enfermedad de Von Hippel-Lindau	Marzo 2003	Fase 2, completada
		Degeneración macular	Julio 2001	Fase 2, completada
		Neovascularización coroidea	Julio 2001	Fase 3, completada
Macugen	VEGF	Degeneración macular asociada a la edad	ND*	Aprobado (17/12/2004)
NU172	Trombina	Enfermedad cardiaca	Enero 2013	Fase 2, reclutamiento
68Ga-Sgc8	PTK7	Cáncer colorrectal	Enero 2017	Fase 1, desconocido
ARC1779	vWF	Enfermedad Von Willebrand Tipo-2b	Octubre 2008	Fase 2, completada
BT200	vWF	Enfermedad Von Willebrand Hemofilia A	Diciembre 2020	Fase 2, completada
ApTOLL	TLR4	Ictus	Julio 2019	Fase 1, completada
NOX-H94	Hepcidina	Anemia	Mayo 2014	Fase 2, completada
		Enfermedad renal en etapa terminal		
NOX-E36	CCL2	Enfermedad inflamatoria crónica	Mayo 2009	Fase 1, completada
		Diabetes mellitus tipo 2		
		Lupus eritromatoso sistémico		
NOX-A12	CXCL12	Trasplante de células madre autólogas	Octubre 2009	Fase 1, completada
		Trasplante de células madre hematopoyéticas	Agosto 2010	Fase 1, completada
ARC19499	TFPI	Hemofilia	Diciembre 2010	Fase 1, completada
AS1411	Nucleolina	Leucemia mieloide aguda	Enero 2010	Fase 2, terminada
AS1411-GNP	Nucleolina	COVID 19	ND	Fase 1, reclutamiento
ACTGRO-777	Nucleolina	Leucemia mieloide aguda	Enero 2010	Fase 2, reclutamiento
		Cáncer pancreático	No disponible	Fase 1, reclutamiento
RBM-007	FGF2	Degeneración macular asociada a la edad exudativa	Agosto 2018	Fase 2, completada
BC-007	GPCRAAb	Cardiomiopatía dilatada	Marzo 2019	Fase 2, reclutamiento
		COVID 19	ND	Fase 1, reclutamiento
REG1	Factor de coagulación IXa	Enfermedad de la arteria coronaria	Junio 2005	Fase 2, completada

\*ND: No Disponible



Es probable que en los próximos años el número de aptámeros en ensayos clínicos sea mucho mayor, ya que existen multitud de publicaciones científicas que muestran resultados prometedores sobre estas moléculas como agentes terapéuticos. Un ejemplo pendiente de publicación es el de un aptámero desarrollado en nuestro laboratorio, apMKNQ2, seleccionado frente a la proteína MNK1 (MAP Kinase-activated protein kinase 1) con resultados prometedores en el tratamiento del cáncer de mama. En cáncer de pulmón hay varios aptámeros que se han seleccionado frente a diferentes dianas y se han probado en líneas celulares y tejidos tumorales de pulmón con buenos resultados (Hamamoto et al. 2018; Zamay et al. 2015; Zamay et al. 2017; Morozov et al. 2021).



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El estudio de la sobreexpresión de HAT1 en cáncer de pulmón permitirá establecer esta proteína como una posible diana terapéutica en este tipo de cáncer.

Asimismo, la selección de aptámeros frente a la proteína HAT1 para su inhibición, hará posible su uso como herramientas terapéuticas, no solo en cáncer de pulmón, sino incluso en otros tipos de cáncer y/u otras patologías en las que HAT1 se encuentre implicada.

### **Los objetivos del presente estudio son los siguientes:**

1. Analizar la expresión de HAT1 en tumores pulmonares y parénquimas sanos de pulmón y su posible relación con las variables clínico-patológicas.
2. Seleccionar y caracterizar estructural y funcionalmente aptámeros específicos frente a HAT1.
3. Caracterizar la actividad antitumoral de los aptámeros seleccionados en modelos celulares de cáncer de pulmón.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## MATERIALES

### Equipos, reactivos químicos generales y material de laboratorio utilizados

**Análisis de imagen:** Image Lab Software Versión 6.1 (Bio-Rad, EE.UU.), ImageJ Versión 1.8.0\_172 (National Institute of Health, EEUU).

**Análisis de citometría:** Flowing Software 2.5.1 (Bioscience, Finlandia).

**Adquisición y análisis de imagen:** Minibis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel), ChemiDoc MP Imaging Systems (Bio-Rad, EE.UU.), cámara Nikon DS-Fi3 (Nikon, Japón) integrada en el microscopio Olympus, cámara Optikam B5 (Optikamicroscopes, Italia) integrada en el microscopio de luz transmitida Leica.

**Anticuerpos:** Los anticuerpos utilizados y su titulación aparecen detallados en las **Tablas VI** y **VII**.

**Aptámeros:** Los aptámeros que se han utilizado para este trabajo y sus secuencias correspondientes se detallan en la **Tabla VIII**.

**Centrífugas:** Microfuga Mini-Spin® (Eppendorf, Alemania), B4i/BR4i Jouan de DJB (Labcare, Reino Unido), Hitachi CR 22N (Himac centrifuges, Japón), Beckman J2-HS (Beckman Coulter, Alemania).

**Citómetro de flujo:** FACSCanto II™ (BDBiosciences, EEUU).

**Contador de células:** TC20 (BioRad, EEUU).

**Espectrofotómetros:** Infinite® F200 e Infinite® 200PRO (TECAN, Suiza), NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, EEUU), Nanofotómetro GmbH (Implen, Alemania).

**Membranas de transferencia:** PVDF Hybond-P (GE Healthcare, Reino Unido).

**Método de revelado:** ECL™ y ECL-Advance™ (GE Healthcare, Reino Unido); Clarity™ *Western ECL Substrate* (BioRad, EEUU); Sustrato BCIP y NBT (BioRad, EEUU), ECL Select™ *Western Blotting Detection Reagent* (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

**Microscopio:** Olympus IX70 (Olympus, Japón), Microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems S.L.U., Alemania) y Microscopio de luz transmitida Leica DM 1000 (Leica Microsystems S.L.U., Alemania).

**Microtomo:** Microm HM 325 (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

**Oligonucleótidos:** Los oligonucleótidos utilizados y sus secuencias se detallan en la **Tabla V**.

**Papel de transferencia:** Munktell (GE Healthcare, Reino Unido).

**Purificación de proteínas:** ÄKTA prime plus (GE Healthcare, Reino Unido).

**Sistemas de electroforesis y transferencia:** Equipo Mini-Protean II y III para electroforesis y sistema de transferencia húmeda (BioRad, EEUU).

**Termobloque:** ThermoStat plus (Eppendorf, Alemania).

**Termociclador:** iQ5 Multicolor Real-Time PCR detection System (BioRad, EEUU), StepOnePlus™ (ThermoFisher Scientific, EEUU), Applied Biosystems™ SimpliAmp™ (ThermoFisher Scientific, EEUU), Applied Biosystems™ GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific, EEUU).

**Otros productos:** Sales, ácidos y bases inorgánicas, solventes orgánicos, detergentes, inhibidores de proteasas, agarosa, acrilamida, bisacrilamida, y el resto de reactivos para electroforesis, medio LB para bacterias, desoxinucleótidos, etc. fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Panreac (España), Sigma (EEUU), GE Healthcare (Reino Unido) Merck (Alemania), ThermoFisher Scientific (EEUU) y BioRad (EEUU). El suero de ternera fetal, la glutamina, el piruvato sódico, y el antibiótico/antimicótico fueron suministrados por Gibco (ThermoFisher Scientific, EEUU). La lipofectamina 2000 fue suministrada por Invitrogen (Carlsbad, California. EEUU).

Tabla V. Relación de oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia
HAT(BAMHI)	GGGATCCTTCCGTGTTGAATATGCA
HAT(SALI)	GGTCGACTTACTCTTGAGCAAGTCG
HAT(XBAI)	GTCTAGATTCCGTGTTGAATATGCA
HAT(APAI)	GGGGCCCTTACTCTTGAGCAAGTCG
F3	GCGGATGAAGACTGGTGT
R3	GTTGCTCGTATTTAGGGC
5'HAT1	GGATGGAGCTACGCTCTTTG
3'HAT1	GGATGGATCTTCCGCTGTAA
5 $\beta$ -actina	TGGA CTTCGAGCAAGAGATG
3 $\beta$ -actina	GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG

Tabla VI. Relación de anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Casa comercial	PM (kDa)	Tipo	Título
$\beta$ -actina	Sigma Aldrich, EEUU	45	Monoclonal ratón	1/10000
Cleaved PARP (Asp <sup>214</sup> )	Cell Signaling, EEUU	89	Policlonal conejo	1/1000
HAT1	Genetex, EEUU	50	Policlonal conejo	1/5000
Acetyl-Histone H4 (Lys5, Lys8, Lys12, Lys16)	Invitrogen, EEUU	15	Policlonal conejo	1/5000
Histona H4	Abcam, Reino Unido	11	Policlonal conejo	1/1000

**Tabla VII. Relación de anticuerpos secundarios empleados.**

Anticuerpo/Especificidad	Casa Comercial	Título
Frente a digoxigenina conjugado con peroxidasa (ELONA)	Roche, Suiza	1/1000
Frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa	GE Healthcare, Reino Unido	1/2000
Frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa	GE Healthcare, Reino Unido	1/2000
Frente a IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000
Proteína A conjugada con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000

**Tabla VIII. Relación de aptámeros utilizados.**

Aptámero	Secuencia
apHAT63	GCGGATGAAGACTGGTGTCTGAGGGGGGGGGCGGGCGGGTGGGTTGGCTCTTC ATGCCTGTGCCCTAAATACGAGCAAC
apHAT63T	GCGGATGAAGACTGGTGTCTGAGGGGGGGGGCGGGCGGGTGGGTTGGCTCTTC ATGCCTGTGCCC
apHAT610	GTTGCTCGTATTTAGGGCGGGGGGGCGGGGGAGGAGGTGGCGGGAATATCC ATTGTCTACACCAGTCTTCATCCGC
apHAT610T	GGGCGGGGGGGCGGGGGAGGAGGTGGCGGGAATATCCATTGTCTACACCAG TCTTCATCCGC
20AT	GCGGATGAAGACTGGTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTT TTGCCCTAAATACGAGCAAC

La procedencia del resto de los materiales se detalla en el texto.

## **METODOLOGÍA**

### **1. INMUNOHISTOQUÍMICA DE TEJIDOS DE PULMÓN**

En el presente trabajo se estudiaron tejidos de 15 tumores de pulmón, 15 zonas adyacentes al tumor y 15 parénquimas sanos, procedentes del biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, obteniéndose muestras incluidas en parafina de tejido tumoral y peritumoral de cada paciente y parénquima sano de otros 15 pacientes.

Se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$ , que se montaron en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropiltriétoxissilano. Las secciones se desparafinaron con xilol, se rehidrataron con etanol a concentraciones decrecientes y se lavaron con agua bidestilada. El desenmascaramiento de antígenos se realizó empleando tampón Tris-EDTA a pH 9, en olla exprés a temperatura y presión máximas, durante 2 minutos, seguido de un enfriamiento lento en el mismo tampón de 20 minutos. Después de realizar dos lavados rápidos con agua destilada, se inhibió la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% en agua durante 15 minutos, y se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con TBS pH 7.5. Más tarde se incubaron las secciones con Tritón X-100 al 0.1% en TBS, y posteriormente con el anticuerpo primario anti-HAT1 obtenido en conejo a una dilución 1:1000 (**Tabla VI**) a temperatura ambiente durante toda la noche. Al finalizar la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS, y se amplificó y detectó la señal del anticuerpo primario mediante el kit Master Polymer Plus Detection System Peroxidase (Master Diagnóstica, España), con diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, según las especificaciones del fabricante. Por último, después de 2 lavados de 5 minutos en TBS pH 7.6, las muestras se tiñeron con hematoxilina y se montaron en portas con medio de montaje DEPEX, se observaron con un microscopio de luz transmitida y se tomaron micrografías a 200 y 400 aumentos con una cámara digital.

Se realizó un análisis doble de la inmunoreacción, mediante la observación y valoración subjetiva y mediante el empleo del software libre ImageJ. Primero, las muestras fueron observadas y valoradas por dos observadores de forma independiente, sin acceso en ese momento a la información clínica de los pacientes, y se gradaron de forma subjetiva. Se valoró la intensidad de la señal en núcleo y citoplasma. Se consideró una señal baja cuando el marcaje se determinó como poco intenso y en menos del 10% de células, moderada con un marcaje moderado-alto entre el 10 y el 20% y alta cuando se marcaban intensamente más del 20% de las células tumorales. A efectos de estadística, se determinaron dos rangos: señal nula/baja y moderada/alta.

El análisis cuantitativo del número de células marcadas y de la inmunoreacción en los núcleos celulares se realizó mediante el uso de ImageJ sobre micrografías. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo 40x (apertura numérica 0,65) a una resolución de 1280x960 pixels. Los ajustes empleados para todas las muestras fueron los siguientes: luz 6,8 (escala del potenciómetro), ISO100, Gamma: 0, Contraste: 3, Saturación: 1, Bordeado: Sharp, 50Hz y corrección del RGB: 56, 62, 133. Se capturaron entre 3 y 4 campos tumorales para cada muestra, para contabilizar un mínimo de 200 células, y las imágenes digitalizadas se archivaron en formato Tiff. El análisis de las imágenes se realizó empleando el software ImageJ. La escala global para el análisis de cada imagen fue de 6,6192 pixels/micra. Para realizar la deconvolución óptica y la determinación de los rangos de marcaje (threshold) en RGB, se utilizó el plugin IHC profiler. Sobre las imágenes en el canal rojo (DAB), se contaron manualmente los núcleos marcados y sobre las imágenes en el canal azul (hematoxilina) se contó el número total de células. El valor medio de la inmunoreacción (f) se obtuvo restando la media del rango (i) al nivel máximo posible (255). Se utilizó el plugin "Immunoratio" (IR) sobre imágenes calibradas para determinar la superficie nuclear marcada con respecto a la superficie nuclear total. El índice de inmunohistoquímica corregido por el IR (IHC-IR Score) se obtuvo mediante la fórmula  $(f \times IR)/100$ .

## **2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE HAT1 RECOMBINANTE**

### **2.1. Subclonaje del cDNA de HAT1 en un plásmido pQE-30**

La expresión y purificación de la proteína HAT1 se inició a partir de un ADN copia de HAT1 en un vector de clonación (SinoBiological, Alemania), que se subclonó en un plásmido pQE-30 de expresión en bacterias (Qiagen, Alemania) para poder expresar la proteína y añadir al inserto de HAT1 una cola de histidinas. Este paso se realizó diseñando unos primers (**Tabla V**) que permitieran añadir al amplicón la secuencia diana de dos enzimas de restricción (BAMH I y SAL I) que también estuvieran en el plásmido pQE-30 y no en la secuencia codificante de HAT1. La digestión del amplicón y de pQE-30 con estas enzimas permitiría ligar ambos ya que tendrían extremos cohesivos para poder unirse. Por tanto, se realizó una PCR con los cebadores diseñados a 1  $\mu$ M cada uno (IBA, Alemania), dNTPs a 0.25 mM, 2 mM de  $MgCl_2$  y 1 U de Taq Polimerasa (Biotools, España), en tampón PCR y un volumen final de 50  $\mu$ l. Se calculó la temperatura de anillamiento óptima de los primers para un buen rendimiento de la PCR gracias al software informático (Tm Calculator | Thermo Fisher Scientific-ES). El programa de PCR utilizado se detalla en la **Tabla IX**.

Después de la PCR, el producto subsecuente se cargó en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, EEUU) al 1.2% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 0.112% y EDTA 1 mM, pH 7.4 (AccuGENE, EEUU)) y una dilución 1/10000 de Gel Red (Biogen, EEUU), que se

intercala entre las cadenas de ADN y permite observar las bandas cuando el gel se expone a la luz ultravioleta en un transiluminador. Las muestras se cargaron en tampón de carga (ThermoFisher Scientific, EEUU) acompañadas del marcador de peso molecular  $\lambda$  hind III (ThermoFisher Scientific, EEUU). La electroforesis se desarrolló en el mismo tampón del gel, a un voltaje constante de 100 V durante 1 h. Se realizó una extracción de ADN del gel de agarosa para así descartar los artefactos resultantes de la PCR. Una vez cortado el trozo de agarosa que contenía el inserto de HAT1 se realizó la extracción del ADN con el kit de NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. La muestra se concentró en 30  $\mu$ l y se cuantificó en el nanodrop.

**Tabla IX. Programa de PCR utilizado para amplificar HAT1.**

95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	1 minuto	30 ciclos
57°C	1 minuto	
72°C	2 minutos	
72°C	10 minutos	Ext. final

Posteriormente se subclonó el inserto purificado anteriormente en un plásmido pGEM®-T (Promega, EEUU) para que, al digerirlo con las enzimas de restricción, éstas tuvieran un sitio un poco más extenso donde apoyarse para poder cortar el inserto, y así poder tener los extremos cohesivos para ligarlo con pQE-30. La reacción de ligación se optimizó a una relación molar 10:1 (inserto:vector) en un volumen de reacción de 10  $\mu$ l, con 3 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega, EEUU), en tampón T4 DNA ligasa. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 h, o bien toda la noche a 4°C. La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* JM109 (Promega, EEUU) y las colonias fueron analizadas mediante PCR para la identificación de los clones positivos. Para el aislamiento de dichos clones se realizó miniprep utilizando un kit de purificación de ADN según indica el protocolo del fabricante (Promega, EEUU).

Una vez realizado este proceso, se procedió a digerir tanto el inserto HAT1 con las secuencias de las enzimas de restricción en el plásmido pGEM®-T, como el plásmido pQE-

30. Primero se realizó la digestión con una de las enzimas de restricción, SAL I (ThermoFisher Scientific, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Más tarde se procedió con la segunda enzima de digestión, BAMH I (ThermoFisher Scientific, EEUU), siguiendo de nuevo las instrucciones del fabricante. El plásmido que contenía HAT1 requería separar el inserto del pGEM®-T, y para realizarlo se hizo de nuevo una electroforesis en gel de agarosa y una extracción del ADN con el kit de NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. La muestra se concentró en 15 µl y se cuantificó en el nanodrop. El plásmido pQE-30 únicamente requería que las enzimas de restricción cortaran el plásmido en el sitio correspondiente, ya que el inserto que no servía era de pequeño tamaño y se despreció del ensayo. Una vez digeridos tanto el inserto HAT1 como el plásmido pQE-30, se ligaron ambos con una relación molar 3:1 (inserto:vector) en un volumen de reacción de 20 µl, con 6 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega, EEUU), en tampón T4 DNA ligasa. El proceso de transformación, identificación de clones positivos y purificación de ADN fue igual que el descrito anteriormente.

## **2.2. Expresión de His-HAT1 en bacterias**

El siguiente paso fue expresar la proteína His-HAT1 en bacterias. Se decidió transformar bacterias de expresión Rosetta con el plásmido HAT1-pQE-30. Las bacterias transformadas se crecieron en 10 ml de medio LB y ampicilina a 50 µg/ml durante 16 h a 37°C y en agitación. Al día siguiente, se añadieron los 10 ml del preinóculo a 200 ml de medio LB con la misma concentración de antibiótico y se incubó a 37°C y en agitación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5-0.6 a una longitud de onda de 600 nm. La inducción de la expresión de las proteínas se realizó añadiendo IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich, EEUU) a una concentración final de 1 mM y creciendo el cultivo en agitación. En ocasiones se pueden producir en la célula cuerpos de inclusión, que son agregados de proteína inactiva. Son habituales en bacterias que producen proteínas heterólogas bajo el control de promotores fuertes, y pueden representar un problema en procesos de producción de proteínas. Por esta razón, previamente se realizaron pruebas de tiempo de inducción con IPTG (1-4 h) y de temperatura (25 o 37°C) y se prepararon las fracciones solubles e insolubles de las bacterias (como se describe más abajo), observándose que las condiciones óptimas para la mayor recuperación de proteína en la fracción soluble fueron 2 h de inducción con IPTG a 25°C (**Figura 10A**).

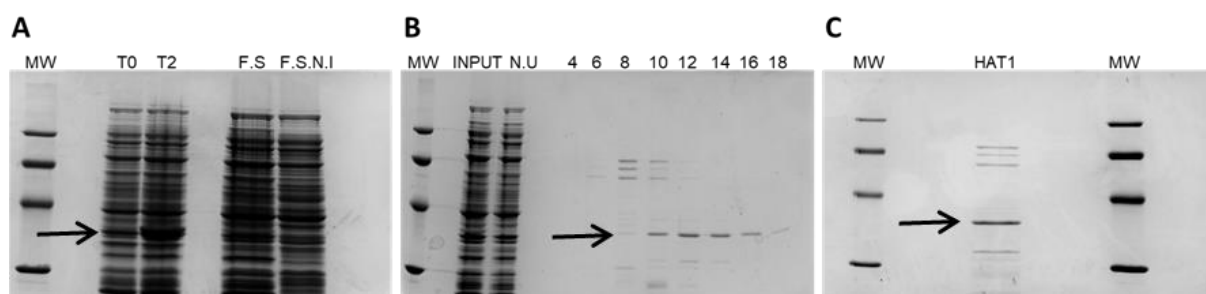
Las bacterias se centrifugaron a 2500 g durante 20 min a 4°C tras la inducción con IPTG y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 4 ml de tampón de unión (Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, pH 7.8), se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó durante 30 min en hielo. Transcurrido este tiempo, las bacterias se



sonicaron en 4 ciclos con pulsos de 15 segundos parando 10 segundos en hielo entre cada ciclo para su lisis. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10000 g durante 30 min a 4°C, obteniéndose el sobrenadante (fracción soluble) y el sedimento (fracción insoluble).

### 2.3. Purificación de la proteína His-HAT1

La proteína His-HAT1 presente en la fracción soluble se purificó utilizando la columna Histrap™ FF (GE Healthcare, Reino Unido) con un sistema de purificación de proteínas ÄKTA y el programa His-Trap. Los lavados se realizaron con el tampón de unión y se eluyó con el tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM, pH 7.8). Las distintas fracciones se resolvieron en geles de poliacrilamida (**Figura 10B**), y se tiñeron con el colorante azul de Coomassie (Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich, EEUU)) 0.2%, ácido acético 10% y metanol 40%. Después se destiñeron con la solución de desteñido para Coomassie (ácido acético al 7% y etanol al 20%) el tiempo y las veces necesarias, y finalmente se mantuvieron en etanol al 30%. Las fracciones en las que eluyó His-HAT1 se unieron (**Figura 10C**), se determinó su concentración cuantificando en el gel con el programa informático Image Lab, se alicuotaron y se congelaron a -80°C.



**Figura 10. Expresión y purificación de la proteína His-HAT1 recombinante.** Geles de poliacrilamida SDS-PAGE 12% teñidos con azul de Coomassie en los que se muestran: **(A)** Expresión de HAT1 en bacterias Rosetta antes de la inducción (T0) y después de la inducción (T2) donde se aprecia que se ha inducido la expresión de His-HAT1. Los carriles de la derecha muestran la Fracción soluble (F.S.) y la Fracción soluble no inducida (F.S.N.I.) como control. **(B)** Distintas fracciones de la purificación de His-HAT1. El input es el control de carga y el no unido sirve para ver si la proteína se ha pegado bien a la columna. **(C)** Unión de las fracciones para cuantificar la cantidad de proteína purificada. MW corresponde al marcador de peso molecular. La flecha en las 3 imágenes indica la altura de His-HAT1 recombinante purificada.

## 3. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS

### 3.1. Selección *in vitro* (SELEX)

La primera ronda de selección comenzó con una librería de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla, denominada RND40, formada por moléculas diferentes con una región central variable de 40 nucleótidos de secuencia aleatoria flanqueada por dos regiones de 18 nucleótidos de secuencia conocida. En la selección, 1 nmol de la librería fue desnaturalizado

durante 10 min a 90°C en un volumen de 1 ml de tampón de selección (PBS (Tampón fosfato salino; fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 140 mM y cloruro potásico 2.68 mM, pH 7.4) (Gibco, Reino Unido) y MgCl<sub>2</sub> 1 mM), y se mantuvo a 4°C durante 10 min para promover la formación de las estructuras terciarias de la hebra de ADN. La proteína diana His-HAT1 (2 µg, 50 pmol), purificada según se detalla en el apartado 2.3, se mezcló con BSA (0.2%) y con MgCl<sub>2</sub> (1 mM) hasta 1 ml de PBS. Esta mezcla se incubó con el RND40 (Relación aptámeros:proteína 20:1) en un volumen final de 2 ml durante 1 h a 37°C en una noria. Para la purificación de los complejos aptámero-proteína se añadieron a la mezcla 50 µl de resina Ni-NTA agarosa (Qiagen, Alemania) previamente equilibrada, y se incubó durante 1 h a 4°C en noria. Después se realizaron 3 lavados con 1 ml de tampón de selección centrifugando a 12000 g durante 5 min y los complejos HAT1-aptámero se resuspendieron en 100 µl de mezcla de PCR caliente (90°C) para separar los aptámeros de la proteína. Las secuencias de ADN monocatenarias se amplificaron mediante PCR en el termociclador con los cebadores denominados F3 y R3 (**Tabla V**) a 0.8 µM cada uno, dNTPs a 200 µM, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 U de Taq Polimerasa (Biotools, España), en tampón PCR en un volumen final de 50 µl. El programa de PCR utilizado se detalla en la **Tabla X**.

**Tabla X. Programa de PCR utilizado durante la selección.**

95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	30 segundos	10 ciclos
57°C	20 segundos	
72°C	30 segundos	

Para llevar a cabo una nueva ronda de selección se utilizaron 60 pmol (1.5 µg) del producto de PCR de la ronda anterior con 6 pmol de proteína (Relación molar aptámeros:proteína 10:1), y se repitió todo el proceso descrito anteriormente. Si no había cantidad de aptámero suficiente para continuar con la siguiente ronda se realizaba una nueva amplificación por PCR, haciendo previamente una PCR a modo de prueba para ver los ciclos óptimos de amplificación.

Para favorecer la selección, a partir de la ronda 4, la incubación del complejo aptámeros-His-HAT1 se redujo a 30 min a 37°C, en lugar de 1 h. A lo largo de las rondas, para comprobar

si la amplificación del aptámero se había efectuado correctamente, se realizaron electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (MS8 Conda-Pronadisa, España) al 3% en tampón TAE. Las muestras se cargaron en tampón de carga acompañadas del marcador de peso molecular pUC19 DNA/Msp I (ThermoFisher Scientific, EEUU). Las electroforesis se desarrollaron en el mismo tampón del gel, a un voltaje constante de 100 V durante 1 h.

Los oligonucleótidos resultantes de cada amplificación se purificaron pasando el producto de la PCR por columnas de NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, según las instrucciones del fabricante. La muestra se concentró en 30 µl.

### **3.2. Clonaje de aptámeros y secuenciación Sanger**

Con la finalidad de obtener aptámeros individuales, la población de la ronda 6 se clonó en el plásmido pGEM®-T. Para ello, se ligaron inserto y plásmido utilizando el kit de Promega (EEUU) como indicaban las instrucciones del fabricante (relación aptámero:vector 10:1), se transformó en bacterias *E. coli* JM109 y las colonias fueron analizadas mediante PCR para la identificación de los clones positivos como se indica en el punto 2.1.

Posteriormente, los aptámeros individuales se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid para obtener la secuencia de cada molécula por secuenciación Sanger.

### **3.3. Secuenciación masiva**

Se prepararon 300 ng de las rondas 3 y 6 purificadas en agua libre de nucleasas. Estas muestras se enviaron a la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) para realizar una secuenciación de nueva generación (NGS). Los archivos resultantes de la secuenciación se analizaron para comprobar la evolución de la población en la selección de aptámeros, utilizando el programa informático Phyton para realizar un alineamiento de secuencias y así poder ver similitudes dentro de cada población. Previamente se ordenaron las secuencias, se pusieron en el mismo sentido de lectura (se transformaron todas las secuencias en Forward) y se hizo un cribado para evitar duplicidades y concatámeros de primers.

### **3.4. Ensayo enzimático en placa con aptámeros (ELONA)**

La técnica ELONA (Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay) consiste en un ensayo cuantitativo que se basa en la interacción entre una molécula diana y un aptámero que está conjugado a una enzima, cuya actividad es capaz de generar productos que se pueden detectar por fluorescencia o colorimetría. Para llevarla a cabo, se añadieron 100 ng de proteína o lisado celular por pocillo, diluidos en solución *coating* (KPL, EEUU) en un volumen

final de 100 µl/pocillo a una placa de ELISA de 96 pocillos *Maxisorp Nunc* (ThermoFisher Scientific, EEUU). La placa se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente se retiró el contenido de los pocillos para eliminar el exceso de proteína no unida a la placa, se hicieron 3 lavados con 200 µl/pocillo de PBS-TWEEN 0.1% y después del último se añadieron 200 µl/pocillo de tampón de selección con BSA 0.2% para bloquear los sitios que pudieran existir de unión inespecífica. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y en agitación. A continuación, se volvieron a realizar 3 lavados con PBS-TWEEN 0.1% y se añadieron los aptámeros a la concentración correspondiente según el ensayo, en un volumen final de 100 µl/pocillo de tampón de selección durante 1 hora a 37°C con agitación. Todos los aptámeros utilizados, ya fueran poblaciones, clones o aptámeros sintéticos, estaban marcados con digoxigenina o biotina y habían sido previamente estructurados como se indica en el apartado 3.1. Transcurrido el periodo de incubación, el exceso de ADN no unido se eliminó con otros 3 lavados con PBS-TWEEN 0.1%. Para poder detectar la unión del aptámero a la proteína, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo anti-digoxigenina conjugada con peroxidasa o estreptavidina-peroxidasa (Sigma Aldrich, EEUU) a una dilución 1/1000 en tampón de selección con BSA 0.2% a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación. Posteriormente, se eliminó el exceso de estos anticuerpos con otros 3 lavados. El revelado de la placa se hizo añadiendo 100 µl/pocillo de solución ABTS (Roche, Suiza) y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente, realizando medidas de absorbancia cada 10 minutos a una longitud de onda de 405 nm en el espectrofotómetro.

### **3.5. Análisis de la evolución de la población por PCR a tiempo real**

Se realizó un ensayo para ver la evolución de las poblaciones a lo largo de la selección. Este experimento se basó en realizar una PCR a tiempo real de la población inicial (RND40) y las 6 rondas de selección en un termociclador IQ5 con el kit Quantimix Easy Kit (Biotools, España). Los primers utilizados fueron F3 y R3, descritos en la **Tabla V**. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl cuyo contenido fue: Quantimix Easy Master Mix, cebadores 0.03 µM, 2 µl de molde (aproximadamente 1 ng) y agua hasta completar el volumen. El protocolo de PCR que se utilizó se refleja en la **Tabla XI**.

**Tabla XI. Programa de PCR a tiempo real para ver la evolución de la población.**

95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	20 segundos	25 ciclos
57°C	5 segundos	
72°C	15 segundos	
55°C	10 segundos	81 ciclos (Melting)

### 3.6. Western blot y aptawestern blot

#### 3.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se utilizó el sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas Miniprotean II y III Cell y geles de poliacrilamida del porcentaje correspondiente para cada experimento en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE). Como agentes polimerizantes se utilizó persulfato amónico a una concentración final de 0.45 mg/ml y N-N-N'-N'-tetrametilendiamina (TEMED) al 0.86%. Para la electroforesis se utilizó dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0.1%, y tampón de electroforesis (Tris-HCl 250 mM, SDS al 0.1% y Glicina 192 mM, pH 8.3). Las muestras fueron preparadas con tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 180 mM, 15% de glicerol, 9% de SDS, 6% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.025% de azul de bromofenol, pH 6.8) y se resolvieron a 200 V durante 1 h, junto con el marcador de peso molecular (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, ThermoFisher Scientific, EEUU para western blot; Low Molecular Weight SDS Marker Kit, GE Healthcare, Reino Unido para Coomassie). A continuación, dependiendo del tipo de ensayo, el gel fue transferido a una membrana donde se detectaron las proteínas por inmunodetección (western blot), aptadetección (aptawestern blot) o directamente se tiñó con azul de Coomassie.

#### 3.6.2. Transferencia de proteínas e inmunodetección

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF).

El método de transferencia utilizado para la electroforesis SDS-PAGE fue un sistema continuo y húmedo en Tris-Glicina/Metanol (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20%, pH 8.3). Las membranas de PVDF fueron activadas antes de su uso sumergiéndolas durante 1 minuto en metanol y posteriormente 3 minutos en agua. Sobre el soporte del cátodo se colocó una esponja, 4 papeles humedecidos, el gel, la membrana previamente activada, 4 papeles, otra esponja y el soporte del ánodo hacia donde se desplazan las proteínas. La transferencia de proteínas se realizó a 100 V durante 1 hora.

Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 hora con PBS-Blotto (leche descremada) al 5% a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-TWEEN 0.05%, antes de añadir el anticuerpo primario, que se preparó en PBS-TWEEN 0.1%, y se dejó incubando en agitación a 4°C toda la noche. En el caso de un aptawestern blot, la membrana se dejó incubando con la solución de bloqueo, también en agitación a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, después de realizar 3 lavados de 10 minutos con PBS-TWEEN 0.05%, se añadió el anticuerpo secundario o la proteína A conjugados con peroxidasa o fosfatasa alcalina, y se incubó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. En el caso del aptawestern blot, después del bloqueo y de los 3 lavados de 10 minutos con PBS-TWEEN 0.05%, la membrana se incubó con el aptámero correspondiente marcado con biotina previamente estructurado en tampón de selección y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Posteriormente se realizaron de nuevo lavados y se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa a una dilución 1/5000, incubando de nuevo 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

El revelado de las membranas, en función del anticuerpo a utilizar, se efectuó de dos maneras diferentes:

- Con fosfatasa alcalina: se añadió azul de nitrotetrazolio/x-fosfato (NBT) 30 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 15 mg/ml, diluidos 1/100 en tampón AP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9.5).

- Quimioluminiscencia: se utilizaron los kits de revelado ECL™, ECL-Advance™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent y Clarity™ Western ECL Substrate según las instrucciones de los fabricantes, y posteriormente se revelaron con el sistema de adquisición de imagen.

Las diluciones y los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados se describen en la **Tabla VI** y en la **Tabla VII**. Para cuantificar las bandas se utilizó el software Image Lab

proporcionado por el fabricante del analizador de imágenes. Los datos fueron obtenidos en unidades de densidad óptica/mm<sup>2</sup>.

La membrana se reutilizó cuando se necesitó detectar dos proteínas que se encontraban a alturas parecidas con dos anticuerpos diferentes y también cuando se valoraron los niveles acetilados y totales de una proteína. Para ello se tuvieron que eliminar el anticuerpo primario y secundario antes de realizar la segunda inmunodetección. Esta eliminación tuvo lugar incubando la membrana durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución *Re-Blot Plus Strong Solution* (Millipore, EEUU) según las indicaciones del fabricante.

### 3.7. Ensayos de actividad HAT1 *in vitro*

La actividad acetiltransferasa de la proteína His-HAT1 *in vitro* se realizó en ausencia o presencia de los aptámeros. Para ello, 100 ng (2.5 pmol) de proteína His-HAT1 se incubaron con los aptámeros, previamente estructurados en tampón de selección, o con el mismo volumen de tampón de selección durante 30 minutos a 37°C en agitación. A continuación, se añadieron 10 µl/tubo de resina Ni-NTA previamente equilibrada, y se incubó a 4°C durante 1 hora en agitación para unir los complejos aptámero-proteína y descartar así al aptámero no unido a His-HAT1. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 1 ml de tampón de selección, centrifugando a 12000 g durante 5 min. Finalmente, se añadió a la resina 27 µl de mezcla de reacción que contenía 100 mM de Tris-HCl pH 7.6 y 250 ng de histona H4 (Abcam, Reino Unido), y se incubó 1 minuto a 37°C en agitación. La reacción se inició con la adición de 3 µl/tubo de AcCoA 10 mM (Roche, Suiza) en un volumen final de 30 µl y se añadieron 15 µl de tampón de carga de electroforesis a tiempo 0 y 2 horas para detener la actividad enzimática. La cantidad de Histona 4 acetilada se determinó por western blot tal como se describe en el apartado 3.6, utilizando el anticuerpo anti-Acetyl-Histone H4 (Lys5, Lys8, Lys12, Lys16) (Tabla VI).

### 3.8. Ensayo de estabilidad en plasma humano

La realización de este ensayo permite conocer si el aptámero resiste la acción de las enzimas presentes en el plasma humano y, por tanto, si se necesitarán modificaciones posteriores que mejoren su resistencia, teniendo en cuenta su posible aplicación en terapia. El ensayo se basó en incubar 3.6 µg de los diferentes aptámeros previamente estructurados en un volumen de 30 µl de tampón de selección con 60 µl de plasma humano a 37°C. Se sacaron alícuotas de 15 µl de la solución aptámero-plasma, a tiempos 0, 6, 24, 48 y 72 horas. Dichas alícuotas se calentaron a 65°C durante 10 minutos para inhibir la actividad de las nucleasas y otras enzimas presentes en el plasma, y después se dejaron en hielo 10 minutos. Se conservaron a -20°C hasta obtener todas las alícuotas y por último se cargaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión del 3% como se indica en el epígrafe 3.1.

## **4. CULTIVOS CELULARES**

### **4.1. Líneas celulares eucariotas**

Las líneas celulares eucariotas empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

**A549 (ATCC® CCL-185™):** Línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de pulmón humano. Verificadas en mayo de 2019 mediante el Sistema GenePrint® 10 System.

**SW900 (ATCC® HTB-59™):** Línea celular epitelial derivada de carcinoma de célula escamosa de pulmón humano. Verificadas en mayo de 2019 mediante el Sistema GenePrint® 10 System.

**H1650 (ATCC® CRL-5883™):** Línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de pulmón humano. Tienen el receptor EGFR constitutivamente activo. Verificadas en junio de 2020 mediante el Sistema GenePrint® 10 System.

Las células A549 se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio completo DMEM (Biowest SAS, Francia) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina, en un incubador a 37°C en ambiente saturado de humedad y con 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>.

Las células SW900 y H1650 se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio RPMI (Lonza, Suiza) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de piruvato, 1% de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina, en un incubador a 37°C con ambiente saturado de humedad y con 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>.

El sembrado de las células se hizo a diferentes densidades en función del ensayo a realizar, de la placa y de la línea celular. Así, se sembraron 1x10<sup>4</sup> células/pocillo o 6x10<sup>3</sup> células/pocillo para placas de 96 pocillos (p96), 3x10<sup>4</sup> células/pocillo para placas de 24 pocillos (p24), y 5x10<sup>5</sup> células/pocillo para placas de 6 pocillos (p6). En los ensayos de formación de colonias, la densidad fue de 1x10<sup>3</sup> células/pocillo en una placa de 6 pocillos.

El proceso para levantar las células se realizó químicamente utilizando Tripsina-EDTA (0.25%) (Gibco, Reino Unido) lavando previamente con PBS (tampón fosfato salino: fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2.7 mM, pH 7.4) (BioMerieux, Francia) para eliminar los restos de suero del medio que podrían interferir con la actividad de la tripsina. Las células se recogieron en su medio correspondiente, y se cogió una alícuota de 90 µl que se mezcló con 10 µl de azul tripán (Sigma-Aldrich, EEUU) para su conteo utilizando



el contador de células, y se consideraron vivas aquellas que excluyeron el colorante. Los resultados se expresaron como número de células vivas/ml.

El almacenamiento y conservación de las células se realizó a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido o a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un congelador, en suero bovino fetal con un 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EEUU) a densidad entre  $3\text{-}5 \times 10^6$  células/ml. Los viales se descongelaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron a 400 g durante 5 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 8 ml del medio de cultivo correspondiente según la línea celular y se sembraron en frascos de  $25\text{ cm}^2$ .

#### **4.2. Localización intracelular de los aptámeros por microscopía confocal**

Para estudiar la localización subcelular de los aptámeros se utilizaron estos conjugados con biotina (IBA, Alemania), y posteriormente, se reveló utilizando estreptavidina conjugada con fluoresceína (BD Biosciences, EEUU) para que pudieran ser detectados en el microscopio.

Para la realización de este ensayo se sembraron  $3 \times 10^4$  células/pocillo de las líneas A549 y SW900 en placas p24 sobre cubres de cristal previamente tratados con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich, EEUU). Tras 24 horas, se transfectaron los aptámeros conjugados con biotina estructurados en tampón de selección a una concentración de 400 nM, como se indica en el apartado 4.3.1. Transcurridas otras 24 horas más, las células se fijaron con metanol frío durante 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se lavaron con PBS y se bloquearon con FBS (Suero Bovino Fetal) diluido al 10% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió estreptavidina marcada con fluorescencia a una dilución 1/200 en tampón TBS y se tiñeron y montaron en portas con medio de montaje Prolong™ que contiene Hoechst  $30\mu\text{M}$ . Posteriormente los portas se miraron y se fotografiaron con el microscopio confocal.

#### **4.3. Transfección y procesamiento celular**

##### **4.3.1. Transfección de células**

El tratamiento de las células con los diferentes aptámeros utilizados en este trabajo se ha realizado con el sistema de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, EEUU). La transfección de las células se llevó a cabo 16-24 horas después de haber sido sembradas y habiendo alcanzado el 70-80% de confluencia.

Una vez alcanzada la confluencia deseada, se utilizó la lipofectamina según las indicaciones del fabricante, ajustando los reactivos a cada densidad celular, el tipo de placa y el ensayo realizado. El complejo ADN-lipofectamina se preparó diluyendo primero por separado la lipofectamina y los aptámeros en opti-MEM (Gibco, EEUU), que se dejaron

incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se mezclaron para formar los complejos lipofectamina-aptámero y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se añadió la mezcla sobre las células previamente lavadas dos veces con medio sin antibiótico para evitar interferencias con la lipofectamina. Las células se incubaron a 37°C durante 4 horas, tras las cuales se retiró el reactivo y se añadió medio completo.

#### **4.3.2. Obtención de lisados celulares**

Las células se recogieron químicamente y se resuspendieron en su medio de cultivo como se ha descrito en el apartado 4.1. Posteriormente se centrifugaron a 400 g durante 5 min, con la finalidad de retirar las células muertas. A continuación, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado del sedimento con PBS, y se volvió a centrifugar a 400 g durante 5 minutos. Las células se lisaron con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, NP 40 1%, Deoxicolato Na 0.5%, SDS 0.1%, pH 7.4) en proporción 1:4 en volumen (el volumen de las células se cuenta como el que ocupa el sedimento tras la centrifugación) y se congelaron a -80°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, las células se dejaron descongelar en hielo y se sonicaron dando 3 pulsos de 15 segundos con intervalos de 10 segundos sin sonicar. Finalmente se centrifugaron a 12000 g durante 10 min y se recogió el sobrenadante (lisado celular) para determinar la concentración de proteínas de la muestra mediante el kit BCA (Pierce™ ThermoFisher Scientific, EEUU), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### **4.4. Ensayos de viabilidad celular. Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT)**

Para poder medir la viabilidad celular se determinó la actividad de enzimas oxidoreductasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H en células, analizando la capacidad que poseen éstas para reducir las sales de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, EEUU) a un producto de azul formazán (Denizot and Lang 1986) bajo distintas condiciones experimentales. Las células se sembraron en placas p96 y dependiendo de la línea celular, transcurridas 48, 96 o 120 horas después de la transfección, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl/pocillo de MTT a 1 mg/ml en medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 1.5-3 horas en incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> y después se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de lisis (10% SDS y 10 mM HCl) para la disolución de los cristales. Tras 16-24 horas, la reducción de MTT se determinó por espectrofotometría a 540 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto al control.

#### 4.5. Determinación de la citotoxicidad celular por LDH

Con el objetivo de medir la muerte celular por necrosis en las células, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad midiendo la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Esta enzima, que cataliza la reacción de  $\text{NAD}^+$  a NADH en presencia de L-lactato, está presente en el citoplasma de las células, y se libera en el medio de cultivo cuando se permeabiliza la membrana de las células muertas que se han visto afectadas por un agente tóxico. Así, el aumento de la actividad de la enzima en el sobrenadante es proporcional al número de células lisadas.

Las células se sembraron en p96 y se transfectaron a las 16-24 horas después de la siembra. Transcurridas 48, 96 o 120 horas postransfección, los sobrenadantes celulares se recogieron y se añadió el reactivo LDH del kit Citotoxicity Detection kit (LDH) (Roche, Suiza) según las especificaciones del fabricante. Después se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y posteriormente se detuvo la reacción con HCl 1M. Por último, se realizó una medida en el espectrofotómetro a 490 nm. Para poder cuantificar la muerte celular por necrosis, se mide la actividad de toda la LDH máxima que se puede liberar (LDH<sub>high</sub>) mediante lisis de las células con 0.2% de Tritón X-100 y la actividad LDH liberada al medio por las funciones celulares normales (LDH<sub>low</sub>). Todo esto, junto con la actividad de la LDH liberada al medio (LDH<sub>m</sub>) después del tratamiento, permite calcular el % Citotoxicidad =  $((\text{LDH}_m - \text{LDH}_{low}) / (\text{LDH}_{high} - \text{LDH}_{low}) \times 100)$ , de cada punto experimental con respecto al del control.

#### 4.6. Ensayos de ciclo celular

Para realizar estos ensayos, se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pocillo en una placa p6 que se recogieron a las 24 y 72 horas de haber sido transfectadas con el aptámero apHAT610. Se realizaron dos lavados con PBS centrifugando a 400 g durante 5 minutos a 4°C entre ellos. Posteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron con 1mL de etanol frío al 70% durante 30 minutos a -20°C. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS a 4°C centrifugando a 400 g durante 5 minutos, y las células se resuspendieron en 1 ml de una solución con Ioduro de propidio 50 µg/ml y RNAsa 100 µg/ml. Los tubos se incubaron durante 1 hora a 37°C en oscuridad y se pasaron por el citómetro de flujo. Por último, los datos fueron analizados mediante el programa Flowing software.

#### 4.7. Ensayos de formación de colonias

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron  $5 \times 10^5$  células/pocillo en placas p6. A las 16-24 horas, las células se transfectaron con el aptámero apHAT610 y 16-24 horas post-transfección las células se recogieron, se contaron y tras realizar las diluciones adecuadas,

se sembraron  $1 \times 10^3$  por duplicado en placas p6. Estas placas se incubaron con ambiente saturado de humedad a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$  durante 6-12 días. Transcurrido este tiempo, cuando las células habían formado colonias de al menos 50 células, se fijaron con 1 ml/pocillo de metanol (Merck, Alemania) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron con giemsa al 0.02% (Sigma-Aldrich, EEUU) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y por último se lavaron con agua para eliminar restos del colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para contar las colonias se escaneó la p6 con el sistema de adquisición de imagen y se analizó con el software ImageJ. Los resultados se expresaron en número de colonias.

#### 4.8. Análisis de los niveles de ARN mensajero

Para la extracción de ARN total las células se recogieron químicamente, se centrifugaron y el sedimento de las células se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de reactivo NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, Alemania). Posteriormente se continuó el protocolo según las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ARN se cuantificó en el nanodrop y las muestras se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

A partir de 1  $\mu\text{g}$  del ARN extraído se obtuvieron los ADN copia en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  con el kit SensiFAST™ cDNA synthesis kit (Bioline, Reino Unido) siguiendo el protocolo que indica el fabricante. Posteriormente se llevó a cabo una PCR a tiempo real en un termociclador StepOnePlus™ con el kit AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix – Vazyme (Quimigen, España). Como control se midieron los niveles del ARN mensajero de la  $\beta$ -actina. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla V**. La reacción se realizó en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  que contiene: Mix FastGene® IC Green, las parejas de oligonucleótidos a una concentración final de 0.2  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{l}$  de cDNA. El protocolo de PCR utilizado se detalla en la **Tabla XII**.

**Tabla XII. Programa de PCR a tiempo real para analizar los niveles a ARNm.**

95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	10 segundos	45 ciclos
60°C	30 segundos	
95°C	15 segundos	(Melting)
60°C	60 segundos	
95°C	15 segundos	

Para cuantificar los niveles de ARN mensajero se calculó el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  siguiendo la siguiente fórmula, utilizando como gen de referencia  $\beta$ -actina:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{en células control}} - \Delta Ct_{\text{en células transfectadas con apHAT610/con aptámero control (20AT)}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen HAT1}} - Ct_{\text{gen referencia}}$$

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos analizados se calcularon como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas entre la media de los distintos grupos experimentales con respecto a las muestras control, se realizó mediante el análisis estadístico de la “t” de Student para el estudio de dos grupos, y el análisis de la varianza (ANOVA) para más de dos grupos. Cuando este análisis resultó significativo, se realizaron a continuación los test de múltiples comparaciones de Sidak’s, Bonferroni y Newman-Keuls. La significación estadística se expresó como: \*,  $p < 0.05$  (significativo); \*\*,  $p < 0.01$  (muy significativo); \*\*\*,  $p < 0.001$  (altamente significativo). El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático GraphPad Prism® versión 8.0.



# **RESULTADOS**





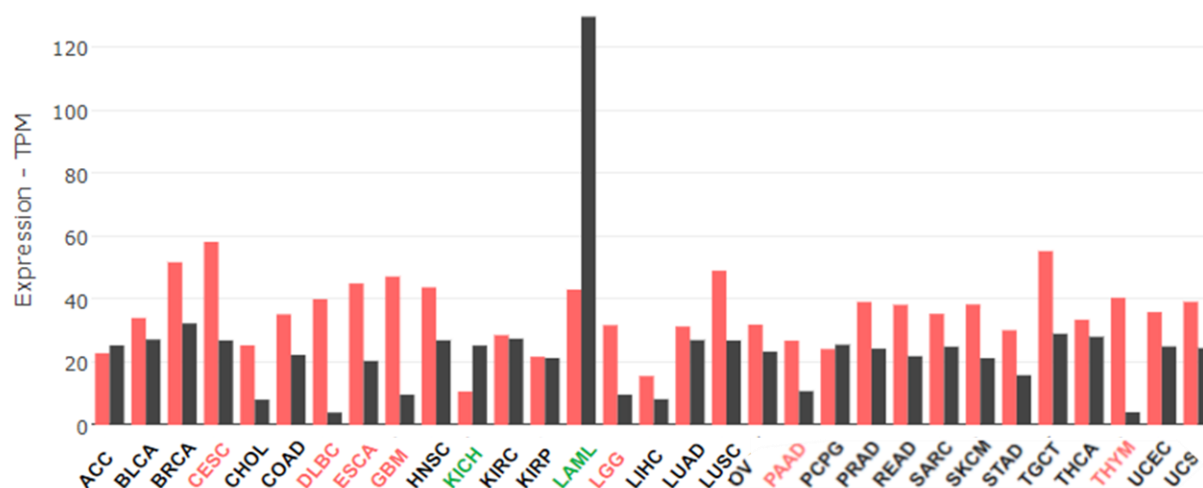
## RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HAT1 EN CÁNCER DE PULMÓN

#### 1.1. Expresión de la proteína HAT1 en tumores pulmonares

##### 1.1.1. Análisis bioinformático

Uno de los objetivos de este estudio fue examinar el papel de la proteína HAT1 en la tumorigénesis y su potencial uso como diana terapéutica. Inicialmente se realizó un análisis bioinformático utilizando GEPIA 2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) o Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), que permiten estudiar la expresión de un determinado gen en diferentes tipos de tumores. Según GEPIA 2 (**Figura 11**), HAT1 (ARN mensajero) se encontró sobreexpresado en tumores comparado con tejidos no tumorales en 26 de 31 tipos de tejidos diferentes (casi un 84%), en 7 de ellos de manera estadísticamente significativa (22.5%). Por el contrario, HAT1 estaba sobreexpresado en tejido no tumoral frente a tumoral en 4 de los 31 tipos mencionados (casi un 13%), en 2 de ellos de manera estadísticamente significativa (6.5%). El carcinoma de célula papilar de riñón (KIRP) (**Tabla XIII**) fue el único en el que no hubo diferencias entre la expresión de HAT1 en tejido tumoral y no tumoral (3%).



**Figura 11. Expresión de HAT1 en diferentes tipos de tumores.** Niveles de expresión de ARN mensajero, en Tránscrios por millón, de HAT1 en 31 tipos de tejidos. Las barras rojas corresponden a muestras tumorales y las barras negras a no tumorales. Las siglas en el eje x marcadas en rojo indican que la sobreexpresión de HAT1 en el tumor es mayor que en tejido no tumoral de manera estadísticamente significativa. Las siglas marcadas en verde muestran que la sobreexpresión de HAT1 en tejido no tumoral es mayor que en tumor de manera estadísticamente significativa. Datos tomados de GEPIA 2.

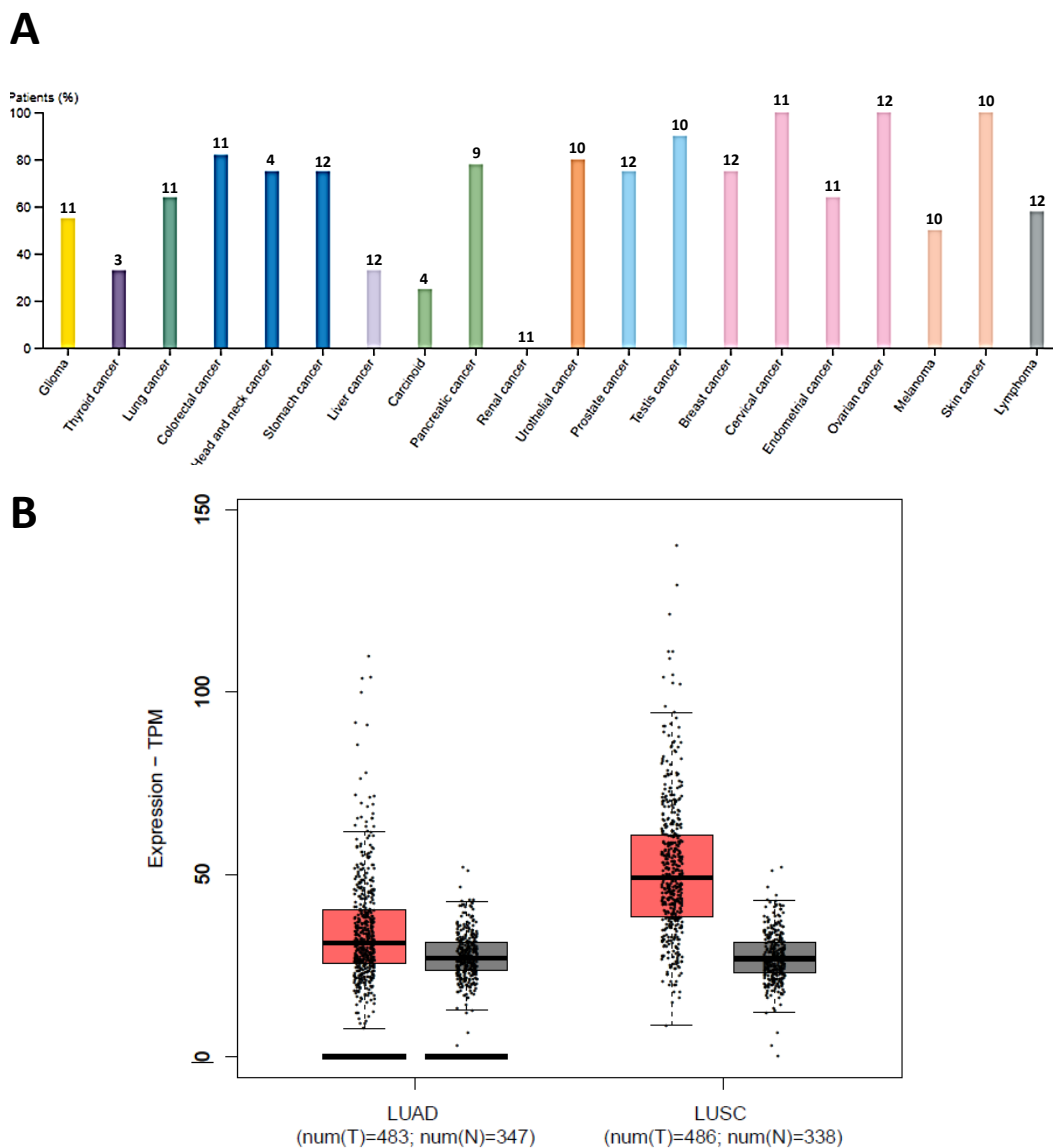
**Tabla XIII. Siglas de los diferentes tipos de tumor. La n corresponde a la figura 11.**

SIGLAS	TIPO DE CÁNCER	MUESTRA (n)	SIGLAS	TIPO DE CÁNCER	MUESTRA (n)	SIGLAS	TIPO DE CÁNCER	MUESTRA (n)
ACC	Adrenocortical carcinoma	Tumor: 77 No tumor: 128	KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma	Tumor: 523 No tumor: 100	READ	Rectum adenocarcinoma	Tumor: 92 No tumor: 318
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma	Tumor: 404 No tumor: 28	KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma	Tumor: 286 No tumor: 60	SARC	Sarcoma	Tumor: 262 No tumor: 2
BRCA	Breast invasive carcinoma	Tumor: 1084 No tumor: 291	LAML	Acute Myeloid Leukemia	Tumor: 173 No tumor: 70	SKCM	Skin Cutaneous Melanoma	Tumor: 461 No tumor: 558
CESC	Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma	Tumor: 306 No tumor: 13	LGG	Brain Lower Grade Glioma	Tumor: 518 No tumor: 207	STAD	Stomach adenocarcinoma	Tumor: 408 No tumor: 211
CHOL	Cholangio carcinoma	Tumor: 36 No tumor: 9	LIHC	Liver hepatocellular carcinoma	Tumor: 369 No tumor: 160	TGCT	Testicular Germ Cell Tumors	Tumor: 137 No tumor: 165
COAD	Colon adenocarcinoma	Tumor: 275 No tumor: 349	LUAD	Lung adenocarcinoma	Tumor: 483 No tumor: 347	THCA	Thyroid carcinoma	Tumor: 512 No tumor: 337
DLBC	Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma	Tumor: 47 No tumor: 337	LUSC	Lung squamous cell carcinoma	Tumor: 486 No tumor: 338	THYM	Thymoma	Tumor: 118 No tumor: 339
ESCA	Esophageal carcinoma	Tumor: 182 No tumor: 286	OV	Ovarian serous cystadenocarcinoma	Tumor: 426 No tumor: 88	UCEC	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma	Tumor: 174 No tumor: 91
GBM	Glioblastoma multiforme	Tumor: 163 No tumor: 207	PAAD	Pancreatic adenocarcinoma	Tumor: 179 No tumor: 171	UCS	Uterine Carcinosarcoma	Tumor: 57 No tumor: 78
HNSC	Head and Neck squamous cell carcinoma	Tumor: 519 No tumor: 44	PCPG	Pheochromocytoma and Paraganglioma	Tumor: 182 No tumor: 3			
KICH	Kidney Chromophobe	Tumor: 66 No tumor: 53	PRAD	Prostate adenocarcinoma	Tumor: 492 No tumor: 152			

También se analizó la expresión de la proteína HAT1 utilizando Human Protein Atlas en 198 inmunohistoquímicas en muestras de pacientes con diferentes tipos de cáncer observándose que 134 de ellos presentaban niveles medios o altos de HAT1 (67.7%), 84 tenían niveles altos (42.5%) y 50 niveles medios (25.2%). Las 64 inmunohistoquímicas restantes (32.3%) mostraron niveles bajos o no se detectó HAT1. Como muestra la **Figura 12A**, en 16 tipos de tumores diferentes al menos el 50% de los pacientes con cáncer tenían niveles medios o altos de HAT1. De entre ellos, en todos los casos de cáncer cervical, de ovario y de piel se observaron niveles medios o altos de HAT1. En 2 tipos de tumores (cáncer de tiroides y de hígado) en el 33% de los casos se observaron dichos niveles. Solo el 25% de los pacientes poseían niveles medios o altos de HAT1 en tumor carcinoide, y en cáncer renal no había ningún paciente con niveles medios o altos de HAT1.

Se analizaron los niveles de HAT1 en cáncer de pulmón, y se pudo ver que 7 de los 11 pacientes (casi el 64%) tenían niveles medios o altos de proteína HAT1 en tejido (4 tenían niveles altos de HAT1, 3 tenían niveles medios) (**Figura 12A**). Por otra parte, los niveles de ARN mensajero analizados en GEPIA 2 eran más altos en los dos tipos de tumores de pulmón

estudiados, adenocarcinoma y carcinoma de célula escamosa, que en tejido no tumoral, por lo que había mayor expresión de HAT1 en tumor que en tejido sano, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa (**Figura 12B**).

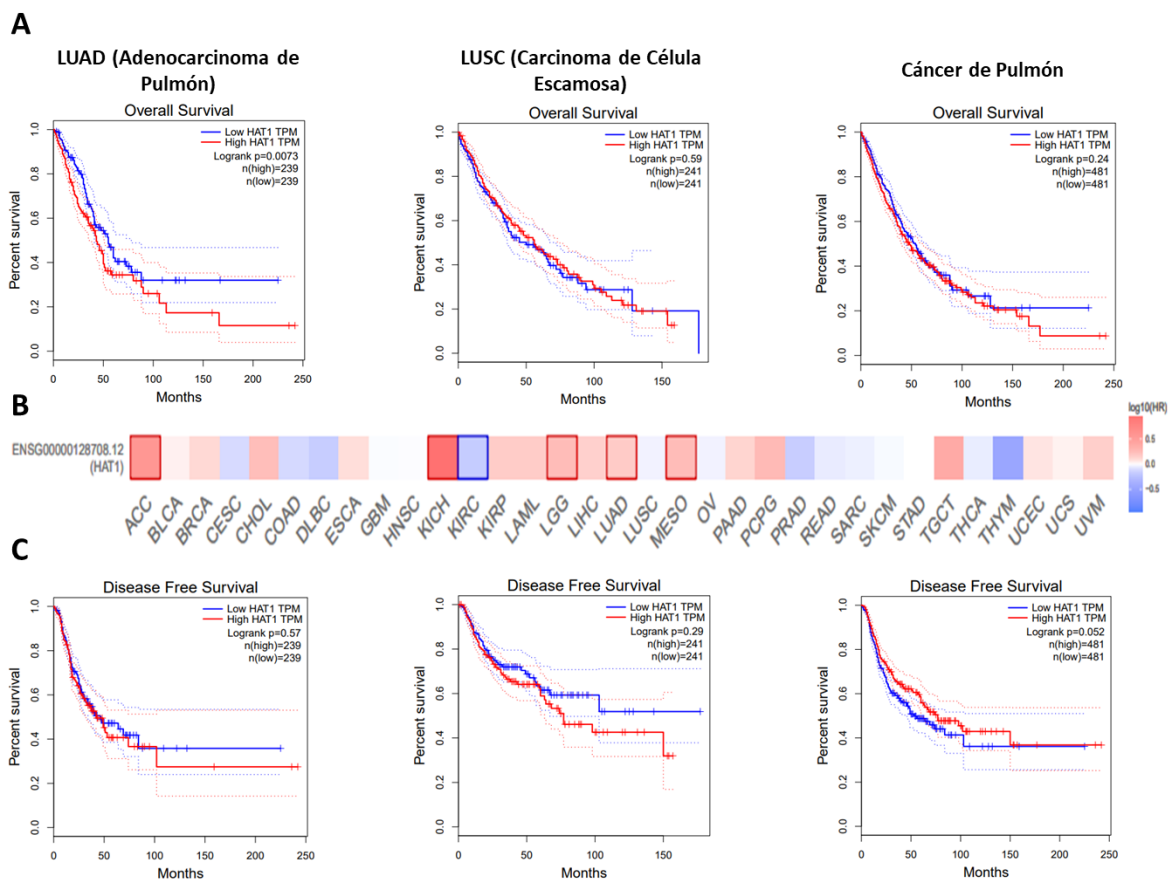


**Figura 12. Expresión de HAT1 en cáncer de pulmón. (A)** Porcentaje de pacientes con cáncer que presentan niveles medios o altos de proteína HAT1, clasificados por tipos de tumor. Encima de las barras se observa el tamaño de la muestra. Datos tomados de Human Protein Atlas. **(B)** Niveles de expresión de ARN mensajero, en Tránscrios por millón, de HAT1 en cáncer de pulmón. Las cajas rojas muestran la expresión en tumor, y las grises en tejido sano. LUAD corresponde a adenocarcinoma pulmonar, y LUSC a carcinoma de célula escamosa de pulmón. Datos tomados de GEPIA 2.

También se estudió la relación de los niveles de HAT1 con la supervivencia de pacientes con cáncer. Como se puede apreciar en la **Figura 13B**, en 16 de 33 tipos de cáncer (48.5%) niveles altos de HAT1 se relacionaban con una menor supervivencia, siendo esta relación estadísticamente significativa en carcinoma adenocortical (ACC), cáncer de riñón cromóforo

(KICH), glioma cerebral de bajo grado (LGG), adenocarcinoma de pulmón (LUAD) y mesotelioma (MESO). En 9 casos (27.3%) niveles bajos de HAT1 se relacionaban con una menor supervivencia, siendo estadísticamente significativo en cáncer renal de célula clara (KIRK). En los 8 casos restantes (24.2%) no había relación entre HAT1 y la supervivencia.

Seguidamente se analizaron las curvas de supervivencia y de tiempo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de pulmón. En la **Figura 13A** se puede apreciar que, en pacientes con adenocarcinoma, la sobreexpresión de HAT1 se relacionaba con una menor supervivencia de manera estadísticamente significativa. En carcinoma de célula escamosa de pulmón, sin embargo, esta relación no se observó. Si se engloban estos dos subtipos dentro del cáncer de pulmón, no se vislumbró una relación de la sobreexpresión de HAT1 con una menor supervivencia del paciente. En cuanto al tiempo libre de enfermedad, no existía una relación significativa entre niveles altos o bajos de HAT1 en pacientes con cáncer de pulmón, ya fuera atendiendo a cada subtipo o a la mezcla de ambos (**Figura 13C**).



**Figura 13. Relación de la sobreexpresión de HAT1 con la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón.** Curvas de supervivencia (A) y de tiempo libre de enfermedad (C) que relacionan niveles altos o bajos de HAT1 por análisis de Kaplan-Meier. La significación estadística está calculada por el test log-rank. (B) Mapa de supervivencia de varios tipos de tumores en el que los tonos rosas y rojos indican que niveles altos de HAT1 se relacionan con una baja supervivencia y tonos azules muestran que niveles bajos de HAT1 se relacionan con una baja supervivencia. Los tonos cercanos al blanco no tienen relación entre HAT1 y supervivencia. Los tipos de tumor que están enmarcados muestran significación estadística. Datos tomados de GEPIA 2.

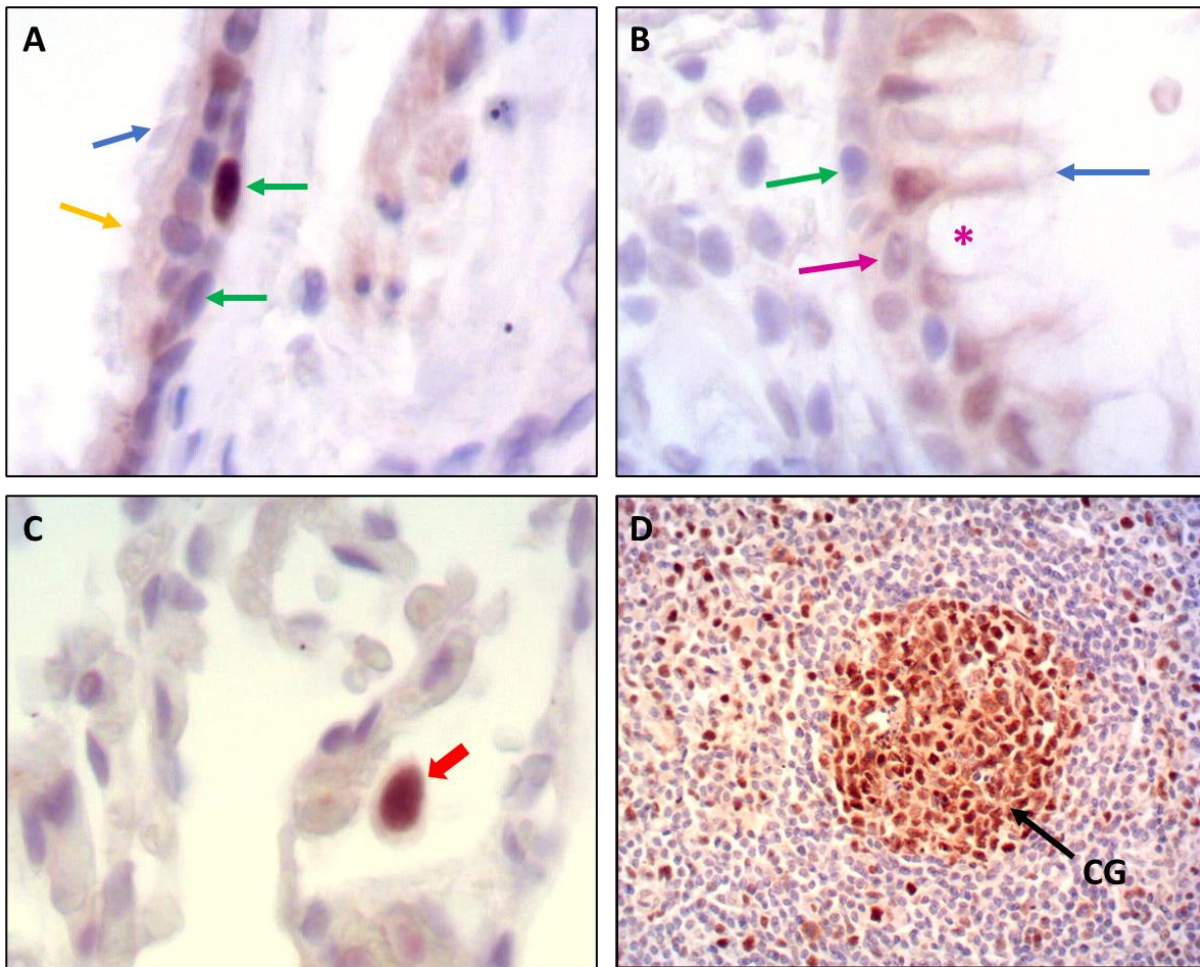
En resumen, se puede decir que HAT1 se encontró sobreexpresado en la mayor parte de los tumores estudiados comparados con tejidos sanos. Asimismo, la mayoría de los pacientes con cáncer estudiados tenían niveles medios o altos de HAT1 en el tumor, y en casi la mitad de los tipos de cáncer analizados esos niveles se relacionaron con una menor supervivencia de los pacientes. En cáncer de pulmón se vio también una sobreexpresión de HAT1 en tumor frente a tejido no tumoral, pero no fue estadísticamente significativa. La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón estudiados tenían niveles medios o altos de HAT1. Además, en adenocarcinoma de pulmón los niveles altos de HAT1 se relacionaron con una baja supervivencia de manera estadísticamente significativa. Por último, no se observó relación entre los niveles de HAT1 y el tiempo libre de enfermedad para el cáncer de pulmón.

### 1.1.2. Análisis inmunohistoquímico

Para contrastar el análisis bioinformático realizado, se analizó la expresión de la proteína HAT1 en diferentes tipos de tumores pulmonares mediante inmunohistoquímica, (apartado 1 de Materiales y Métodos), y se comparó con tejidos sanos de pulmón.

Se estudiaron 30 muestras, depositadas en el Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, 15 de ellas procedentes de tumores de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón, y otras 15 de parénquima sano de pulmón. Las muestras tumorales correspondían a 8 hombres y 7 mujeres, con un rango de edad entre 40 y 79 años en el momento de recogida de la muestra. Para estas muestras se analizaron 2 zonas: zona tumoral y zona adyacente al tumor. Catorce de ellas se referenciaron a cáncer de célula no pequeña, y la restante a cáncer de célula pequeña. Las muestras de parénquima sano pertenecían a 7 hombres y 8 mujeres, con un rango de edad entre 50 y 80 años (**Tabla XIII**).

Para este estudio se valoró mediante ImageJ el inmunomarcaje nuclear para HAT1, y la señal citosólica se clasificó como positiva o negativa por observación directa. Como muestra la **Figura 14**, en muestras de pacientes sin antecedentes de cáncer de pulmón, se observó señal nuclear para HAT1 en células epiteliales de bronquiolos y bronquios terciarios. En los epitelios pseudoestratificados de los bronquios, se observó HAT1 nuclear en células principales (**Figura 14A y B**), donde la señal se determinó como moderada-baja. Excepto macrófagos alveolares y algún neumocito tipo II, no se observó señal para HAT1 en epitelio alveolar (**Figura 14C**). En la mayoría de los casos, se observó una señal citosólica débil de patrón difuso, y frecuentemente punteado de disposición supranuclear. En bronquiolos terminales, se observó un patrón similar en células club (anteriormente denominadas células de Clara) y en las células ciliadas de la porción más proximal de estos bronquiolos.



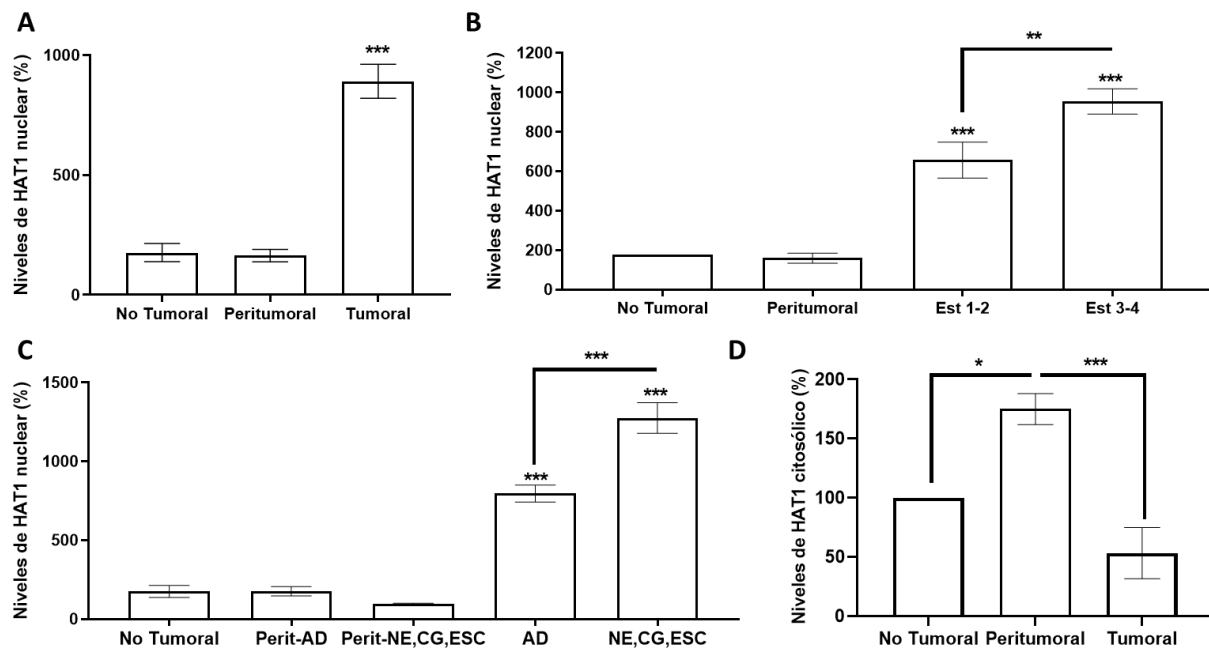
**Figura 14. Inmunohistoquímica para HAT1 en muestras de pacientes sin antecedentes de cáncer de pulmón y en muestras de tejido peritumoral. (A)** Bronquiolo, **(B)** bronquio terciario, y **(C)** alveolos pulmonares de pacientes sin cáncer. **(D)** Nódulo linfóide, ganglio linfático en una muestra de resección pulmonar de tejido peritumoral de un paciente con cáncer escamoso de pulmón. CG: centro germinativo. Flechas azules: células principales (ciliadas); flechas verdes: células basales; flecha amarilla: células club; flecha morada: célula caliciforme; asterisco: cáliz de la célula caliciforme; flecha roja: macrófago intra-alveolar. Las imágenes A,B,C se tomaron a 400x; la imagen D se tomó a 200X.

En muestras de tejido peritumoral se observó mayor señal para HAT1 en citoplasma, tanto en bronquios como en bronquiolos, con significación estadística según el test de Newman-Keuls aunque no con el test de Bonferroni (**Figura 15D**). Casi todas las muestras mostraban infiltrados inflamatorios. Se observó señal para HAT1 en macrófagos intraalveolares, frecuentemente nuclear, en linfocitos dispersos en el estroma y en centros germinales de algunos nódulos linfoides hallados en algunas muestras (**Figura 14D**). Si bien no se realizó análisis estadístico de estas últimas observaciones, el marcaje en linfocitos y centros germinales se consideró como control positivo interno, dato que apoya la literatura (Min et al. 2012). Entre los tejidos de pacientes sin tumor y tejidos peritumorales no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de la proteína en núcleo(**Figura 15**).

Tabla XIV. Casuística de los tejidos pulmonares disponibles.

TEJIDO PULMONAR (muestras, n=45, casos, n=30)			
TEJIDO PULMONAR NO NEOPLÁSICO (n=30)			
CLASE	TIPO	GRADO	n
PARÉNQUIMA PULMONAR	No tumor, no neoplásico	0	15
PARÉNQUIMA PULMONAR	Peritumoral, no neoplásico	0	15
TUMORES PULMONARES (n=15)			
CLASE	TIPO	GRADO	n
CÉLULA NO PEQUEÑA (n=14)	Adenocarcinoma	I	2
		II	2
		III	4
		IV	4
	Carcinoma escamoso	III	1
	Carcinoma de células grandes	III	1
CÉLULA PEQUEÑA (n=1)	Carcinoma mixto	I	1

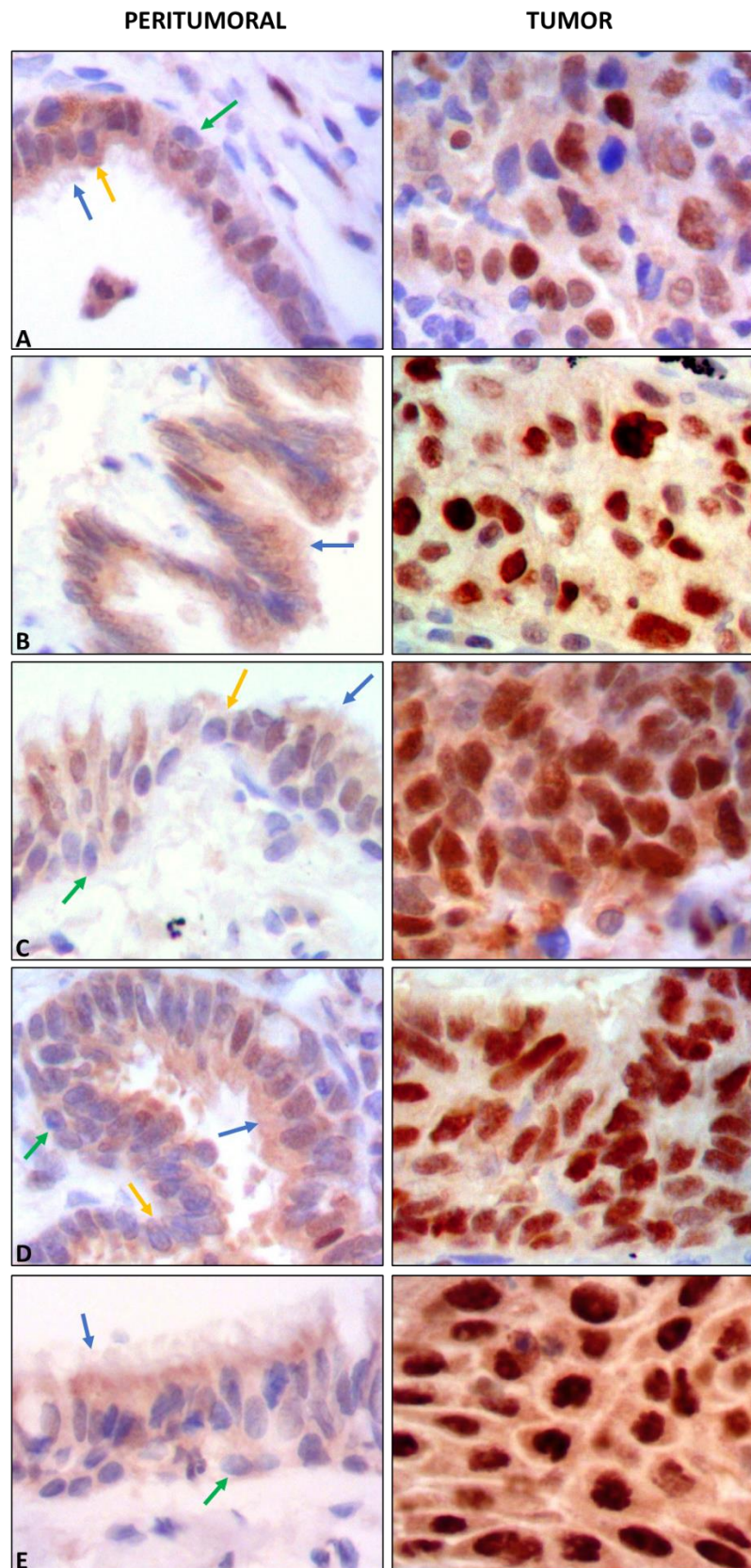
En muestras de pacientes con cáncer, se observó señal nuclear para HAT1 en todos los casos (**Figura 16**). El análisis de los datos mostró un aumento significativo de la señal nuclear en tumores con respecto a tejido sin cáncer (**Figura 15A**). Esta señal es significativamente más alta en tumores en estadios más avanzados (III-IV) con respecto a tumores en estadios I-II (**Figura 15B**). De las muestras analizadas, los que mostraron los niveles significativamente más altos de HAT1 fueron el componente neuroendocrino del carcinoma mixto, el carcinoma de célula grande y el carcinoma escamoso, como se aprecia en la **Figura 15C**. Cabe destacar que los dos primeros son tumores de peor pronóstico por su tipo histológico, independientemente del estadio clínico. La **Figura 15D** muestra que la señal citosólica para HAT1 fue significativamente menor que en tejido peritumoral y no se halló diferencia significativa con el marcaje citosólico de epitelios en pacientes sin cáncer.



**Figura 15. Niveles de HAT1 en tejidos pulmonares.** Niveles de HAT1 nuclear presentes en los diferentes tejidos, **(A)** agrupados en no tumoral, peritumoral y tumoral (\*\* $p < 0.001$  respecto a no tumoral y peritumoral); **(B)** agrupados en función del estadio según la casuística descrita (\*\* $p < 0.01$  respecto al estadio 1-2; \*\*\* $p < 0.001$  respecto a no tumoral y peritumoral); **(C)** agrupados según el tipo tumoral. Perit - Peritumoral; AD - Adenocarcinoma; NE - Neuroendocrino (Carcinoma mixto de célula pequeña); CG - Carcinoma de células grandes; ESC - Escamoso (\*\* $p < 0.001$  respecto a no tumoral y peritumoral o respecto a adenocarcinoma). **(D)** Niveles de HAT1 citosólico presente en los diferentes tejidos y agrupados en no tumoral, peritumoral y tumoral (\* $p < 0.05$  respecto a no tumoral; \*\*\* $p < 0.001$  respecto a tumoral).

En resumen, se observó un aumento significativo de la señal citosólica para HAT1 en tejido peritumoral con respecto al tumor y al tejido de pacientes sin cáncer. En los tumores, aumentó significativamente la señal nuclear para HAT1, especialmente en tumores de grado más avanzado y peor pronóstico. En la **Figura 16** se muestran algunas de las micrografías capturadas con el microscopio donde se pueden apreciar las diferencias en los niveles de HAT1 entre los tejidos de peritumorales y tumores de pacientes con cáncer de pulmón.



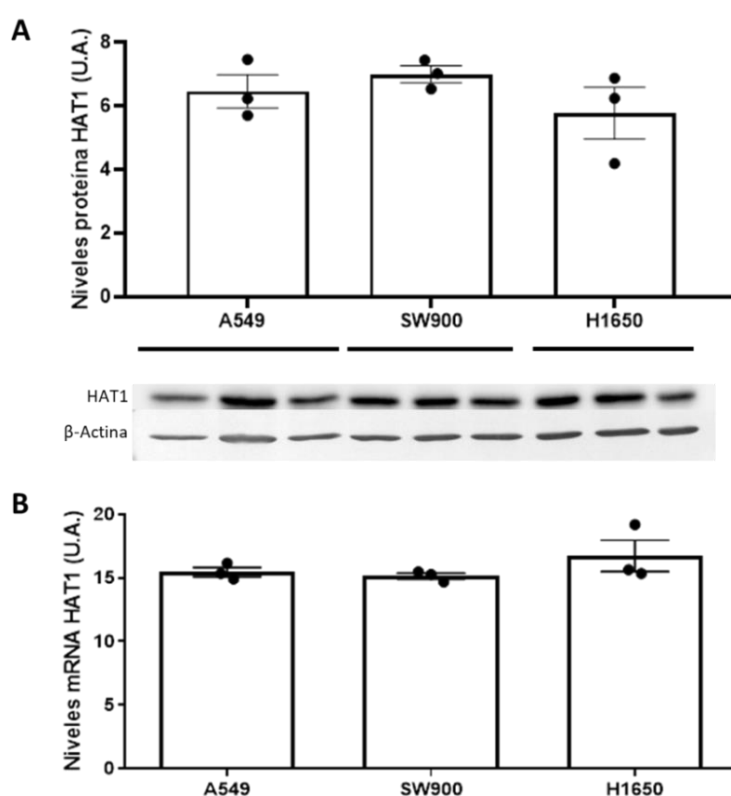


**Figura 16. Inmunohistoquímica para HAT1 en tumores pulmonares y tejido peritumoral de cada paciente. (A) Adenocarcinoma Estadío I. (B) Adenocarcinoma Estadío IV. (C) NE, mixto Estadío I. (D) Célula grande Estadío III. (E) Escamoso Estadío III. Flechas azules: células principales, ciliadas; flechas amarillas: células club (antes células de Clara); flechas verdes: células basales. Las imágenes fueron tomadas a 400X.**

## 1.2. Niveles de expresión de la proteína HAT1 en 3 líneas celulares de pulmón

Las células utilizadas en este estudio pertenecen a dos subtipos de cáncer de pulmón: adenocarcinoma y carcinoma de célula escamosa, ambos dentro del cáncer de célula no pequeña o no microcítico. Se escogieron estas líneas como ejemplo representativo de los tipos mayoritarios más diagnosticados. Las líneas A549 y H1650 son representativas de adenocarcinoma pulmonar. La diferencia entre ellas radica en que la línea celular H1650 tiene EGFR constitutivamente activo. Teniendo en cuenta que, como se comentó previamente en la introducción, la expresión de HAT1 aumenta en respuesta de EGF (Gruber et al. 2019), sería interesante ver las variaciones existentes entre esta línea celular y la línea A549. Por otra parte, la línea celular SW900 es representativa de carcinoma pulmonar de célula escamosa.

En primer lugar, se determinaron los niveles de proteína HAT1 mediante western blot en las tres líneas celulares de cáncer de pulmón. Para ello, se obtuvieron lisados de 3 pases diferentes de células como describe el apartado 4.3.2 de Materiales y Métodos, en los que se analizaron los niveles de la proteína con el anticuerpo específico frente a HAT1 (**Figura 17A**).



**Figura 17. Niveles de HAT1 en líneas celulares de pulmón. (A)** Inmunodetección (SDS-PAGE 15%) de HAT1 en células A549, SW900 y H1650. Los valores obtenidos tras la cuantificación se corrigieron con la  $\beta$ -actina, que se utilizó como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. **(B)** Cuantificación de los niveles de ARN mensajero de HAT1 mediante qRT-PCR. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

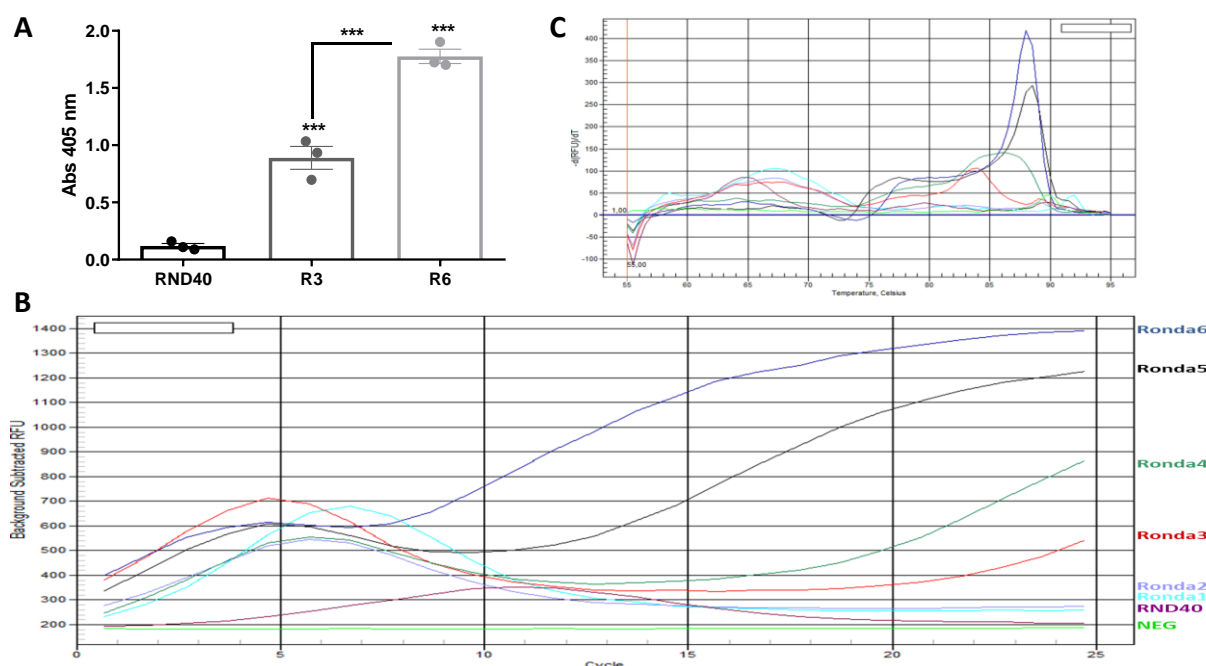
Los resultados obtenidos mostraron que no había cambios evidentes en los niveles de proteína HAT1 entre las 3 líneas celulares. Para verificar este hecho se procedió a examinar si había diferencias en los niveles de ARN mensajero, y se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la expresión de dicho ARN mediante qRT-PCR, como se indica en el apartado 4.8 de Materiales y Métodos. Como muestra la **Figura 17B**, tampoco existían grandes diferencias a nivel de ARN mensajero entre las 3 líneas.

## 2. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE APTÁMEROS FRENTE A HAT1

### 2.1. Selección *in vitro* de aptámeros frente a HAT1

Una vez fijados los parámetros del método SELEX que se iba a utilizar, se procedió a seleccionar aptámeros que reconocieran la proteína HAT1 purificada previamente (Materiales y Métodos apartado 2.3). La población de oligonucleótidos de ADN que se utilizó fue una librería con secuencias de 76 nucleótidos de longitud que contenían una región variable de 40 nucleótidos, flanqueada por dos secuencias conocidas de 18 nucleótidos cada una. La selección se efectuó como se detalla en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos. Se llevaron a cabo 6 rondas sucesivas de selección utilizando una resina Ni-NTA a la que se une la proteína, ya que al purificarla se fusionó con una cola de 6xHIS. Para conocer la evolución de la selección y confirmar el enriquecimiento de las poblaciones obtenidas, se realizaron ensayos de ELONA tras sucesivas rondas de selección, como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. Como se observa en la **Figura 18A**, los resultados mostraron un aumento de la señal en las poblaciones obtenidas en las rondas 3 y 6, respecto a la población inicial (RND40), de manera estadísticamente significativa.

Para utilizar un método alternativo al ELONA que permitiera ver la evolución de la población, se procedió a hacer un ensayo de PCR a tiempo real analizando el enriquecimiento de la población de las 6 rondas realizadas. Como indican Luo y colaboradores, en las selecciones exitosas se produce una caída de la fluorescencia en las rondas iniciales debido a la gran variabilidad de secuencias que hay, y según va avanzando la selección y aumentando el enriquecimiento hacia la diana, disminuye dicha variabilidad y la fluorescencia aumenta. Lo mismo ocurre con la curva de melting de estos ensayos, donde hay una evolución hacia  $T_m$  superiores y picos de fluorescencia más altos para las rondas con menos variabilidad de secuencias (Luo et al. 2017). Como se puede apreciar en las **Figuras 18B y 18C**, la evolución del ensayo indicó una disminución de la variabilidad de secuencias según se avanzó en las rondas de selección, lo que resultó en un enriquecimiento de aptámeros frente a la proteína HAT1.



**Figura 18. Estudio de la evolución de la selección. (A)** ELONA de las rondas 3 y 6. 100 ng/pocillo (2.5 pmol/pocillo) de la proteína HAT1 unida a una placa se incubaron con 200 ng/pocillo (80 nM) de la población inicial (RND40), de la ronda 3 (R3) o la de la ronda 6 (R6) marcadas con digoxigenina. Las barras muestran la media  $\pm$  SEM. Los datos mostrados corresponden a 3 experimentos independientes (\*\*\*) $p < 0.001$  de la R3 y la R6 respecto a la población inicial, y de la R6 respecto a la R3). **(B)** PCR a tiempo real de la población inicial (RND40) y las 6 rondas de selección. NEG corresponde al control negativo, que contiene la mezcla de la qPCR y agua estéril. Experimento representativo. **(C)** Curva de Melting del ensayo (B). La leyenda de colores coincide con la imagen anterior.

A la vista de los resultados, en los que existió un enriquecimiento de la población según avanzaron las rondas de selección, y en los que el valor de la absorbancia de las dos rondas de selección comprobadas en ELONA fue más del doble que el de la población inicial, se dio por finalizada la selección y se procedió a la obtención de secuencias únicas.

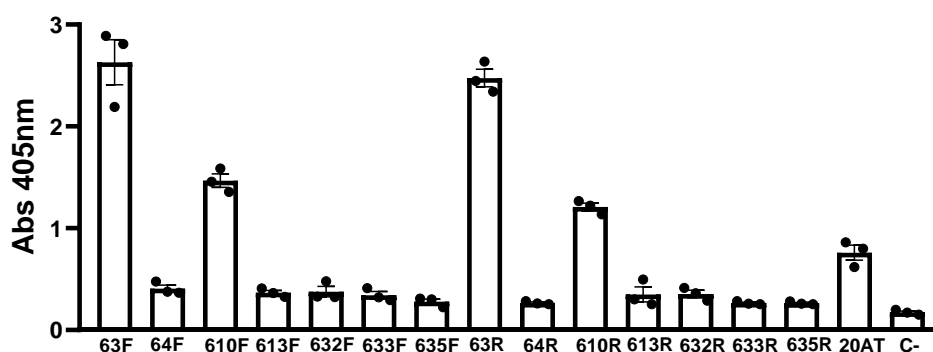
## 2.2. Obtención de secuencias únicas con reconocimiento específico de HAT1

Este proceso se realizó de dos maneras diferentes. Por un lado, se realizó un clonaje de la ronda 6 y una posterior secuenciación Sanger y, por otro lado, se realizó una Secuenciación de Nueva Generación (NGS) de las rondas 3 y 6 para ver la evolución de la población durante la selección.

### 2.2.1. Clonaje y secuenciación Sanger

Se transformaron bacterias con los plásmidos en los que previamente se habían insertado los aptámeros de la ronda 6, como detalla el apartado 3.2 de Materiales y Métodos. En total se consiguieron 7 secuencias o clones, y como para la selección se habían utilizado las dos cadenas producidas durante la PCR, era necesario analizar ambas (denominadas como cadena F o forward y R o reverse) de cada uno de los clones. De esta manera, las 7

secuencias aisladas y su cadena complementaria se marcaron con digoxigenina por PCR y se comprobó su afinidad por HAT1 mediante ELONA (**Figura 19**).



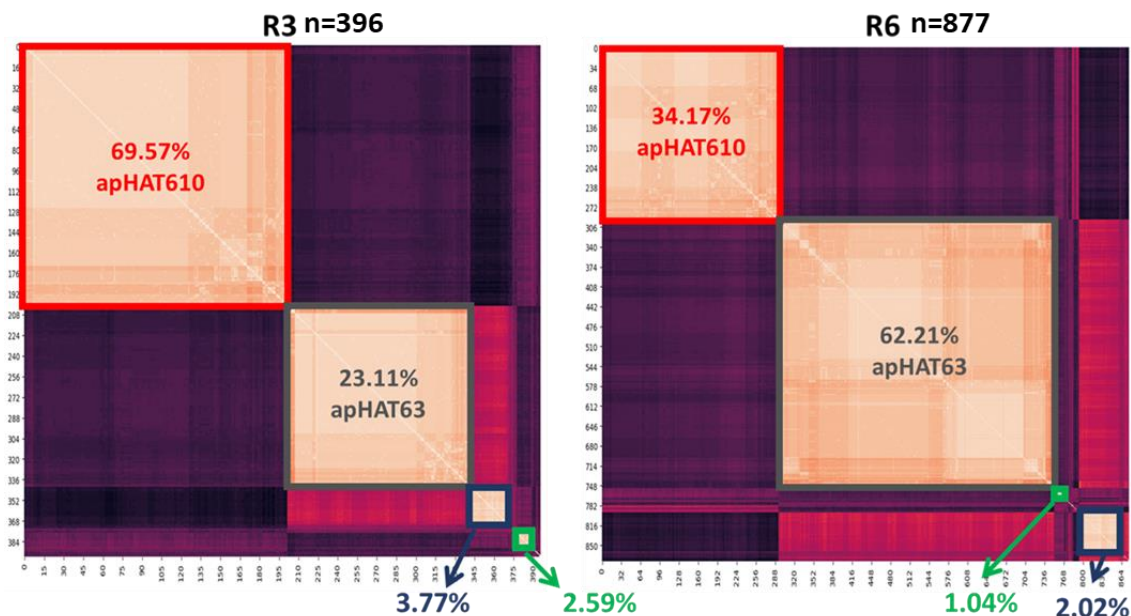
**Figura 19. Estudio de la afinidad de las cadenas F y R de los aptámeros.** 100 ng/pocillo (2.5 pmol/pocillo) de la proteína HAT1 unida a una placa se incubaron con 100 ng/pocillo (40 nM) de cada aptámero (63F, 64F, 610F, 613F, 632F, 633F, 635F, 63R, 64R, 610R, 613R, 632R, 633R, 635R) y del aptámero control inespecífico (20AT) marcados con digoxigenina. El control negativo (C-) no llevaba aptámero. Las barras muestran la media  $\pm$  SEM. Los datos mostrados corresponden a 3 experimentos independientes.

Considerando los resultados obtenidos en este ensayo, se seleccionaron los 4 aptámeros 63F, 610F, 63R y 610R, que daban mayores valores de absorbancia que el aptámero control inespecífico (20AT) para continuar con los siguientes experimentos.

### 2.2.2. Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

Se realizó un estudio de la evolución de la población por NGS. Para ello, se hizo una secuenciación masiva de las rondas 3 y 6 y se analizó la similitud de secuencias dentro de cada población. Las secuencias útiles para el análisis, después de hacer un cribado (descrito en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos), fueron 396 de las 1658 iniciales para la ronda 3, y 877 de 5775 iniciales para la ronda 6. La **Figura 20** corresponde a 2 mapas de calor en los que se representan las secuencias de cada población agrupadas por similitud, de manera que los colores más claros indican secuencias con mayor similitud.

Como se aprecia en la **Figura 20**, tanto en la ronda 3 como en la 6 había 4 grupos o clústeres bien diferenciados, que tenían una alta similitud intraclúster, pero baja similitud interclúster, y que se mantenían a lo largo de la selección. También se puede apreciar una evolución de la selección favorecida hacia el aptámero apHAT63, ya que su enriquecimiento mejoró de la ronda 3 a la 6 en detrimento de apHAT610, lo que podría indicar una mayor afinidad de apHAT63 por HAT1.

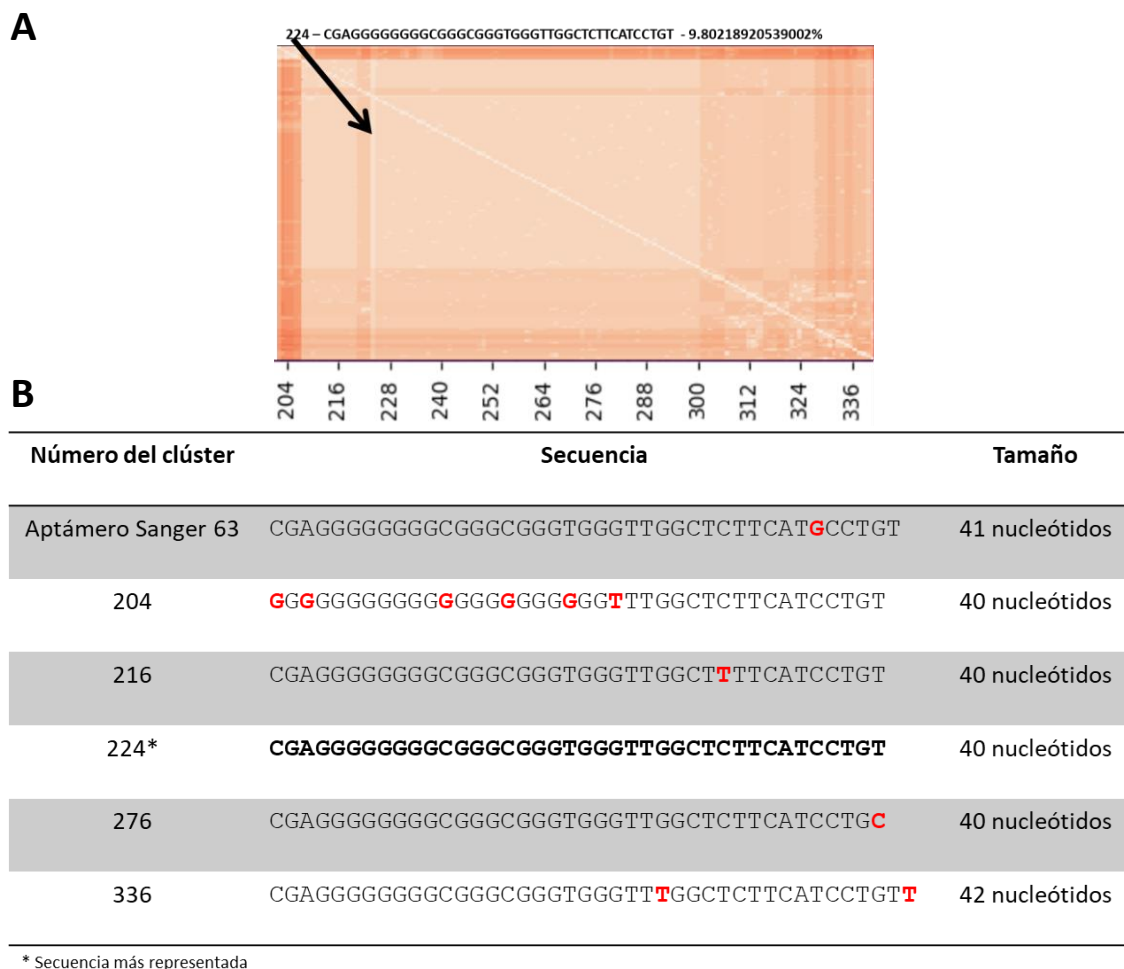


**Figura 20. Análisis de la Secuenciación masiva de las rondas 3 y 6 de la selección de aptámeros frente a HAT1.** Mapa de calor de las rondas 3 (izquierda) y 6 (derecha) secuenciadas por NGS y analizadas por el programa informático Phytion en función de su similitud de secuencia. Los colores más claros indican una alta similitud, y los más oscuros una baja similitud. El porcentaje de representación de cada clúster se ha calculado sumando todos los porcentajes de representación de cada secuencia. Las secuencias del grupo rojo corresponden a las similares a apHAT610 y las secuencias del grupo gris corresponden a las similares a apHAT63 que se vieron en secuenciación Sanger.

Si se analiza cada grupo individualmente, como muestra el ejemplo del clúster de apHAT63 de la ronda 3 en la **Figura 21**, había una secuencia que estaba más representada dentro de cada grupo, y coincidía con la que mayor similitud tenía con el resto de secuencias de su clúster (el color más claro). Dicha similitud intraclúster era muy alta, ya que solo diferían unas de otras en unos pocos nucleótidos de toda la secuencia. Además, esa secuencia más representada dentro del grupo apHAT610 coincidió con el aptámero 610 aislado de la secuenciación Sanger, y la del grupo de apHAT63 coincidió con el aptámero 63, salvo que el de secuenciación Sanger tenía un nucleótido más al final de la región variable, probablemente añadido durante el clonaje o la secuenciación.

A la vista de los resultados obtenidos en NGS, se puede afirmar que los aptámeros elegidos por secuenciación Sanger fueron los dos más representados en secuenciación masiva, en sus formas forward y reverse. Por tanto, los aptámeros apHAT63F, apHAT63R, apHAT610F y apHAT610R fueron las secuencias óptimas para continuar con el estudio. Debido a que el análisis de NGS se realizó de manera posterior al clonaje y secuenciación Sanger, la secuencia del aptámero apHAT63F y R con la que se trabajó fue la obtenida por secuenciación Sanger con un nucleótido más.



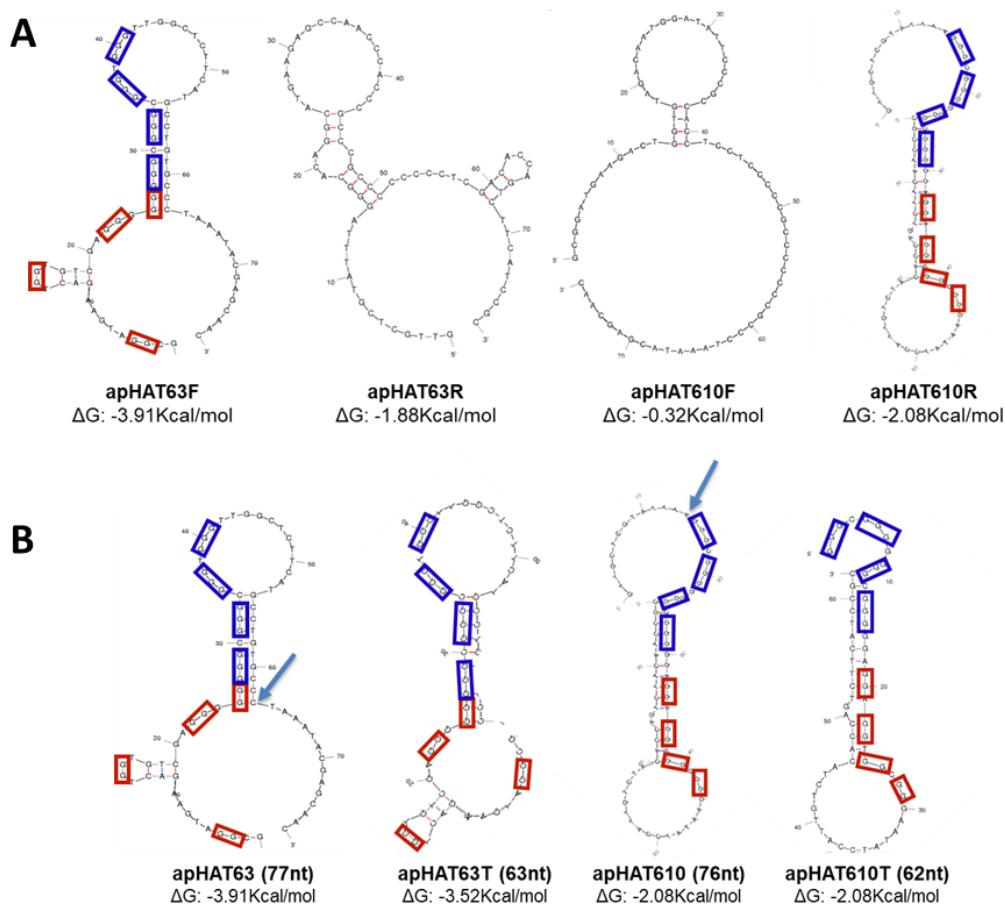


**Figura 21. Ejemplo del clúster de apHAT63 de la ronda 3. (A)** Ejemplo representativo del mapa de calor de la ronda 3 correspondiente al clúster de secuencias de apHAT63. El color más claro corresponde al aptámero que mayor similitud tiene con todos los demás aptámeros de este clúster. La flecha señala al aptámero 224, e indica la secuencia que posee el color más claro de todo este grupo, y que coincide con el aptámero más representado del grupo. **(B)** Tabla en la que se muestran 4 secuencias elegidas al azar representativas del clúster, además de la secuencia más representada, marcada con \* y negrita. La primera fila muestra la secuencia del aptámero obtenido por secuenciación Sanger. Los nucleótidos en rojo indican las modificaciones existentes comparadas con el aptámero más representado. Las secuencias mostradas corresponden a la región variable de los aptámeros.

### 2.3. Caracterización estructural y optimización de los aptámeros seleccionados

La estructura de los aptámeros elegidos fue analizada *in silico* mediante el programa informático mFold, que permite predecir las estructuras secundarias más estables en base a su energía libre ( $\Delta G$ ). También se analizó la composición nucleotídica de los aptámeros, que resulta relevante para su estabilidad debido a la posible formación de estructuras *G-quadruplex*. Así, se calculó la riqueza en GC (%GC) y se utilizó el programa informático QGRS Mapper para predecir si las secuencias podían adoptar estas estructuras. En la **Figura 22** se muestran las estructuras secundarias más probables de los aptámeros apHAT63F, apHAT63R, apHAT610F y apHAT610R, que son aquellas que presentaron una energía libre

menor. De las 4, solamente 2 de ellas presentaron en su predicción posibles estructuras *G-quadruplex*, por lo que los aptámeros apHAT63R y apHAT610F se descartaron del estudio, y los aptámeros apHAT63F y apHAT610R pasaron a denominarse apHAT63 y apHAT610 respectivamente, para facilitar la nomenclatura.



**Figura 22. Estructuras secundarias y *G-quadruplex*.** Posible predicción de estructuras secundarias y *G-quadruplex* de los aptámeros seleccionados mediante el análisis bioinformático de las secuencias con los programas mFold y QGRS Mapper. Los recuadros rojos y azules indican los grupos de *G-quadruplex* en las secuencias **(A)** apHAT63 y apHAT610 F y R; y **(B)** apHAT63 y apHAT610 y sus truncados. Las flechas en los aptámeros parentales indican el sitio de corte de la secuencia.

Gracias a estas predicciones surgió la posibilidad de truncar los dos aptámeros seleccionados para eliminar regiones que, *a priori*, no supondrían un impedimento para su unión a la diana y que a su vez harían de ellos aptámeros más pequeños, más baratos de sintetizar, con mayor facilidad para entrar en las células u otros organismos, etc. Como se muestra en la **Figura 22B**, se eliminaron los últimos 14 nucleótidos del extremo 3' de apHAT63 y los primeros 14 nucleótidos del extremo 5' de apHAT610.

Tras el análisis de las secuencias mediante el programa mFold, se observó que los aptámeros truncados apHAT63T y apHAT610T mantenían la estructura y un valor de energía



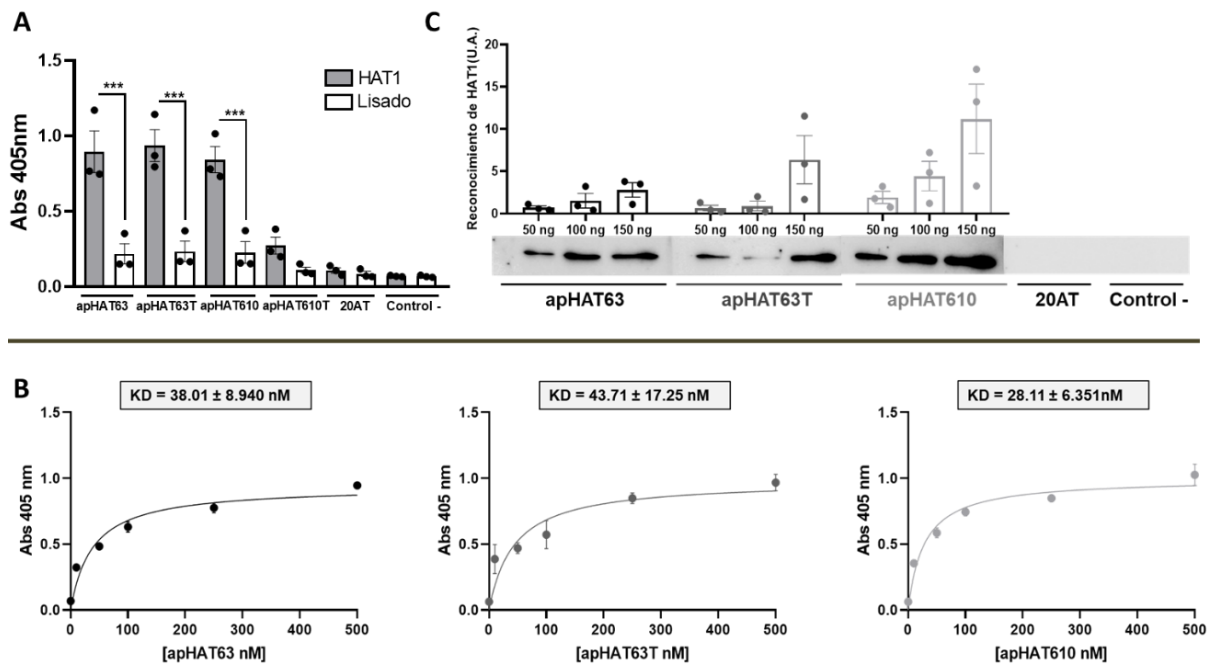
libre de Gibbs muy similar, sino igual, al de sus aptámeros parentales. Además, el análisis con el programa QGRS Mapper indicó que las estructuras *G-quadruplex* presentes en ambos aptámeros parentales se conservaban en sus truncados. Todos estos resultados indicarían que las nuevas moléculas podrían mantener su actividad.

#### 2.4. Caracterización de la interacción de los aptámeros seleccionados con HAT1

Una vez elegidos y sintetizados los aptámeros del estudio, se procedió a comprobar la afinidad y especificidad que tenían éstos por su diana. Para ello, se realizó un ensayo ELONA de los 4 aptámeros sintéticos con la proteína HAT1 y con un lisado celular de células de cáncer de mama MDA-MB-231. Como se aprecia en la **Figura 23A**, 3 de los aptámeros reconocían a su diana con una alta afinidad y especificidad, mientras que no reconocían a las proteínas del lisado celular, con diferencias estadísticamente significativas. El aptámero apHAT610T, sin embargo, presentó un menor reconocimiento de su diana que su aptámero parental apHAT610, por lo que se descartó del estudio.

Para ahondar en el análisis de la afinidad de los aptámeros apHAT63, apHAT63T y apHAT610 por su diana, se realizaron nuevos ensayos de ELONA en los que la proteína HAT1 se incubó con concentraciones crecientes de aptámeros marcados con biotina. Los datos obtenidos se analizaron mediante una regresión no lineal, mostrando que se ajustaban a una curva hipérbola cuya ecuación es  $y = (x \text{ Bmax}) / (x + K_D)$ , donde Bmax es la unión máxima y  $K_D$  (constante de disociación) es la concentración de aptámero requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima. Así, los aptámeros estudiados fueron capaces de detectar la proteína HAT1 de forma dependiente de la concentración con una  $K_D$  en el rango nanomolar bajo (**Figura 23B**).

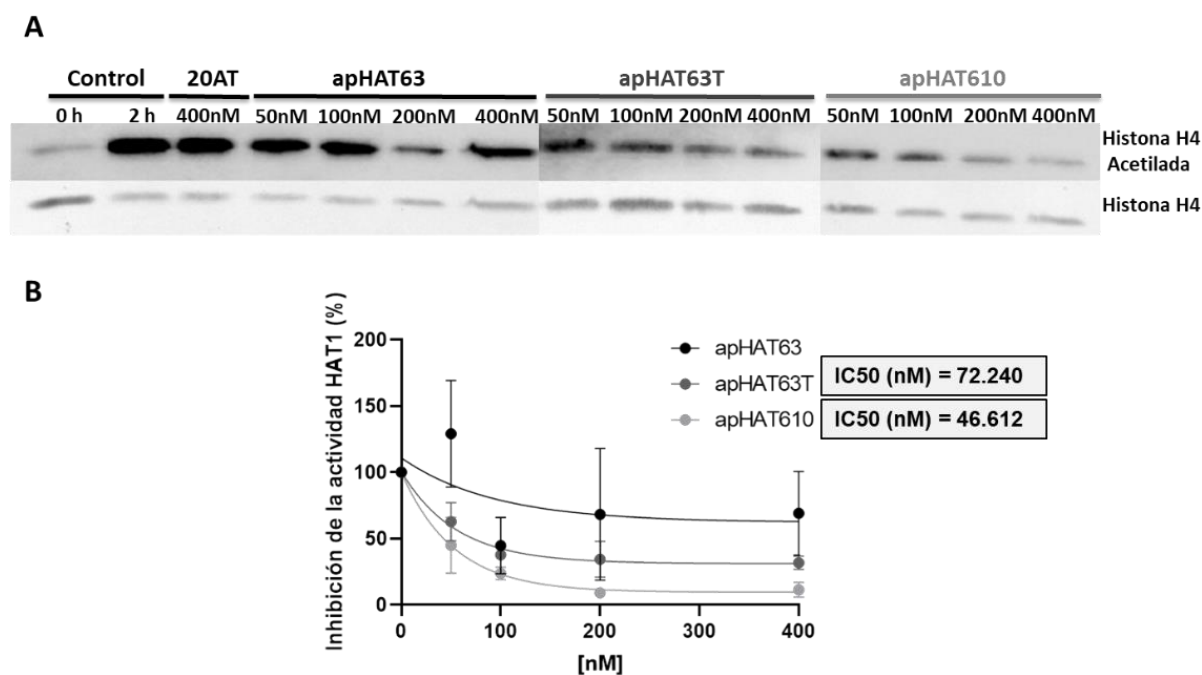
Una vez estudiada la afinidad y especificidad de los aptámeros, se analizó el comportamiento de éstos frente a la proteína en condiciones desnaturalizantes. Para ello, se hizo un apta western blot siguiendo los pasos que se describen en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos mostraron un reconocimiento de la proteína HAT1 desnaturalizada por parte de los 3 aptámeros (**Figura 23C**). En el caso de apHAT63 y apHAT610 el reconocimiento ocurrió de manera dependiente a la concentración, siendo apHAT610 el aptámero que mejor reconoció a la diana desnaturalizada a su concentración más alta.



**Figura 23. Caracterización de la interacción de los aptámeros seleccionados con HAT1. (A)** ELONA de aptámeros sintéticos marcados con biotina a 40 nM (100 ng/pocillo) frente a HAT1 y frente a un lisado celular previamente adsorbidos en p96 a 100 ng/pocillo (2.5 pmol/pocillo). La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (\*\*\* $p$ <0.001 respecto al lisado). **(B)** ELONAs de aptámeros sintéticos marcados con biotina a concentraciones de 0 a 500 nM frente a HAT1 previamente adsorbida en p96 a 100 ng/pocillo (2.5 pmol/pocillo). La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. **(C)** Apta western blot con concentraciones crecientes de proteína HAT1 recombinante a 50, 100 y 150 ng (1.25, 2.5 y 3.75 pmoles) que se incubaron con una concentración 50 nM de cada aptámero. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. La imagen corresponde a un experimento representativo.

## 2.5. Ensayos de inhibición de la actividad HAT1 *in vitro* por parte de los aptámeros seleccionados

Una vez verificado que los aptámeros reconocían a la diana para la que habían sido seleccionados, se quiso comprobar si los aptámeros eran capaces de ejercer algún efecto sobre la diana, ya fuera activador o inhibidor. Para ello, se realizó un ensayo *in vitro* de actividad HAT1 con aptámeros, como se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. Con este ensayo se pretendía comprobar si la proteína purificada tenía actividad enzimática, y si los aptámeros conseguían inhibir la proteína HAT1, objetivo para el que habían sido seleccionados. Por tanto, la enzima (HAT1) se incubó con su sustrato (Histona H4) y su cofactor (AcCoA) para que se produjera la reacción enzimática. De esta manera, HAT1 cogería el grupo acetilo de la AcCoA y se lo pasaría a la Histona H4, que quedaría acetilada en las lisinas 5 y 12. Previamente se añadieron los aptámeros, que se unirían a HAT1, impidiendo que ésta acetilara a la histona H4.

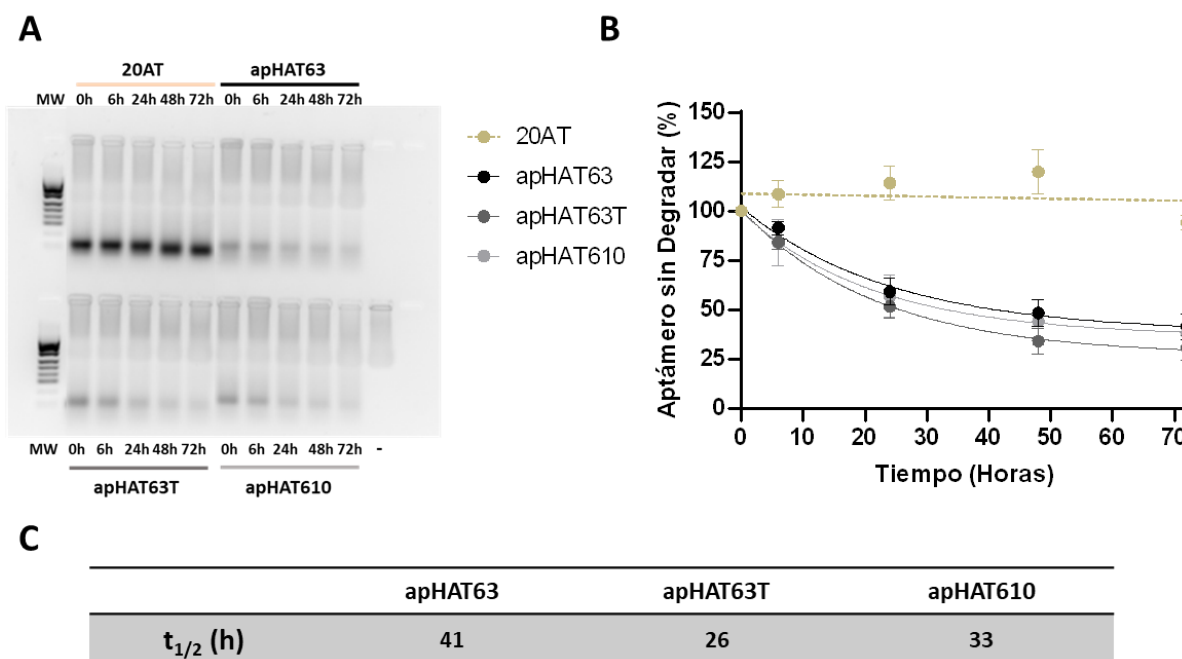


**Figura 24. Ensayo de actividad HAT1 con aptámeros. (A)** Inmunodetección con anticuerpos específicos mediante SDS-PAGE 15% para ver la acetilación de la Histona H4. Se utilizó como control de carga los niveles de histona H4. La imagen corresponde a un ensayo representativo. **(B)** Cuantificación de los niveles de Histona H4 acetilada corregidos con los niveles de Histona H4 cargada en la electroforesis. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición con respecto al control de 2 horas. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

Como muestran los resultados (**Figura 24A**), a las 2 horas del comienzo del ensayo se observó una banda de Histona H4 acetilada, lo que indicó que la proteína HAT1 purificada era constitutivamente activa. Además, en presencia de los tres aptámeros frente a HAT1 había una disminución de la acetilación de H4, lo que no ocurrió con 20AT. Los aptámeros apHAT63T y apHAT610 producían una disminución de la acetilación de manera dependiente de la concentración de aptámero. También para estos dos aptámeros se pudo calcular la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) de la actividad de HAT1, resultando en el rango nanomolar bajo (**Figura 24B**).

## 2.6. Estudio de estabilidad en plasma humano

También se analizó la resistencia de los aptámeros en estudio a ser degradados por las DNAsas plasmáticas (apartado 3.8 de Materiales y Métodos), incubando las 3 moléculas y el aptámero control en presencia de plasma humano durante 72 horas y obteniendo alícuotas a los tiempos que se indican en la **Figura 25**.

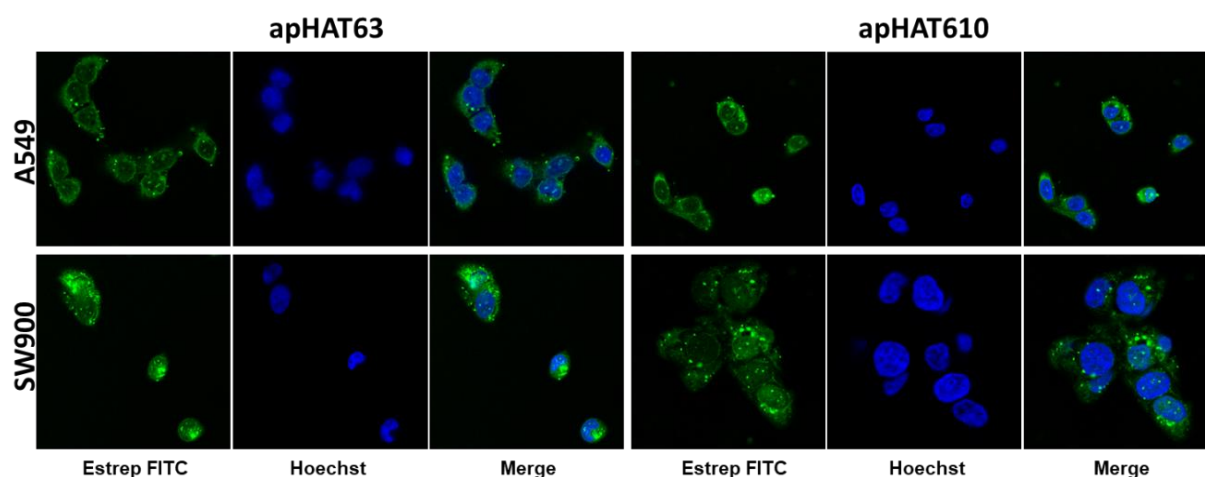


**Figura 25. Estabilidad de los aptámeros en plasma humano.** (A) Los aptámeros (600 ng) se incubaron en presencia de plasma humano, se obtuvieron muestras a las 0h, 6h, 24h, 48h y 72h y se cargaron en un gel de agarosa al 3%. El control negativo (-) está formado por tampón y plasma humano. La imagen corresponde a un ensayo representativo. (B) Cuantificación de la cantidad de aptámero sin degradar. Los datos se expresan como porcentaje de aptámero sin degradar con respecto al tiempo 0h. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (C) Tabla que indica la vida media de cada aptámero.

Como se puede observar, el tiempo de vida media de los 3 aptámeros fue de entre 26-41 horas. Si se compara apHAT63 con su aptámero truncado, se puede apreciar que este último requirió de menos tiempo (26 horas frente a 41 de apHAT63) para que se degradara el 50%, lo que indicó una menor estabilidad del aptámero truncado. Este dato puede ser importante si en un futuro se plantea el uso terapéutico de estas secuencias.

## 2.7. Localización subcelular de los aptámeros en dos líneas celulares de pulmón

Para concluir la caracterización de los aptámeros en estudio, se procedió a comprobar la localización subcelular de los aptámeros por microscopía de fluorescencia. El procedimiento de este ensayo se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. Este ensayo se realizó con los dos aptámeros parentales en dos de las tres líneas celulares con las que se trabajó durante este estudio.



**Figura 26. Estudio de la localización de los aptámeros apHAT63 y apHAT610 en las células.** Las células A549 y SW900 se fotografiaron con un microscopio confocal a 60X en aceite de inmersión una vez fijadas y montadas en portas.

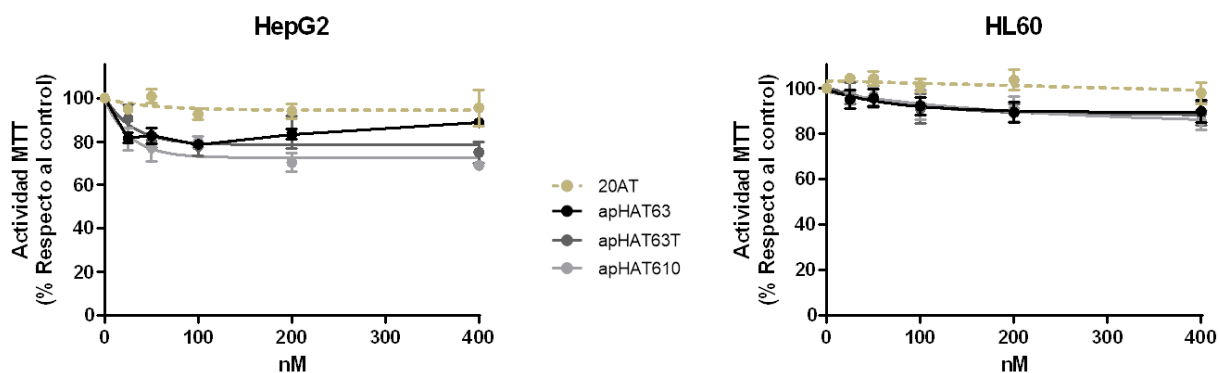
Como se puede observar en la **Figura 26**, los 2 aptámeros entraron en el interior de la célula y se localizaron tanto en el citoplasma como el núcleo en las dos líneas celulares utilizadas para este ensayo. Además, ambos aptámeros se encontraban formando agregados, tanto en citoplasma como en núcleo, de manera mayoritaria en SW900.

### 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS APTÁMEROS SOBRE LA TUMOROGÉNESIS EN LÍNEAS CELULARES

#### 3.1. Actividad antitumorogénica de los aptámeros

##### 3.1.1. Toxicidad de los aptámeros en las líneas celulares HepG2 y HL60

Una vez caracterizados los 3 aptámeros del estudio se procedió a estudiar su efecto en líneas celulares de pulmón. Lo primero que se planteó fue analizar si los aptámeros generaban algún tipo de toxicidad en las células. Para ello, se utilizaron dos líneas celulares que son referencia en este tipo de ensayos, la línea celular HepG2, de carcinoma hepatocelular, y la línea HL-60, de leucemia promielocítica. Estas células se transfectaron con concentraciones crecientes de los 3 aptámeros (0 a 400nM) y se midió la actividad MTT a las 48 horas. Asimismo, el aptámero inespecífico 20AT se transfectó en paralelo a las mismas concentraciones (**Figura 27**).



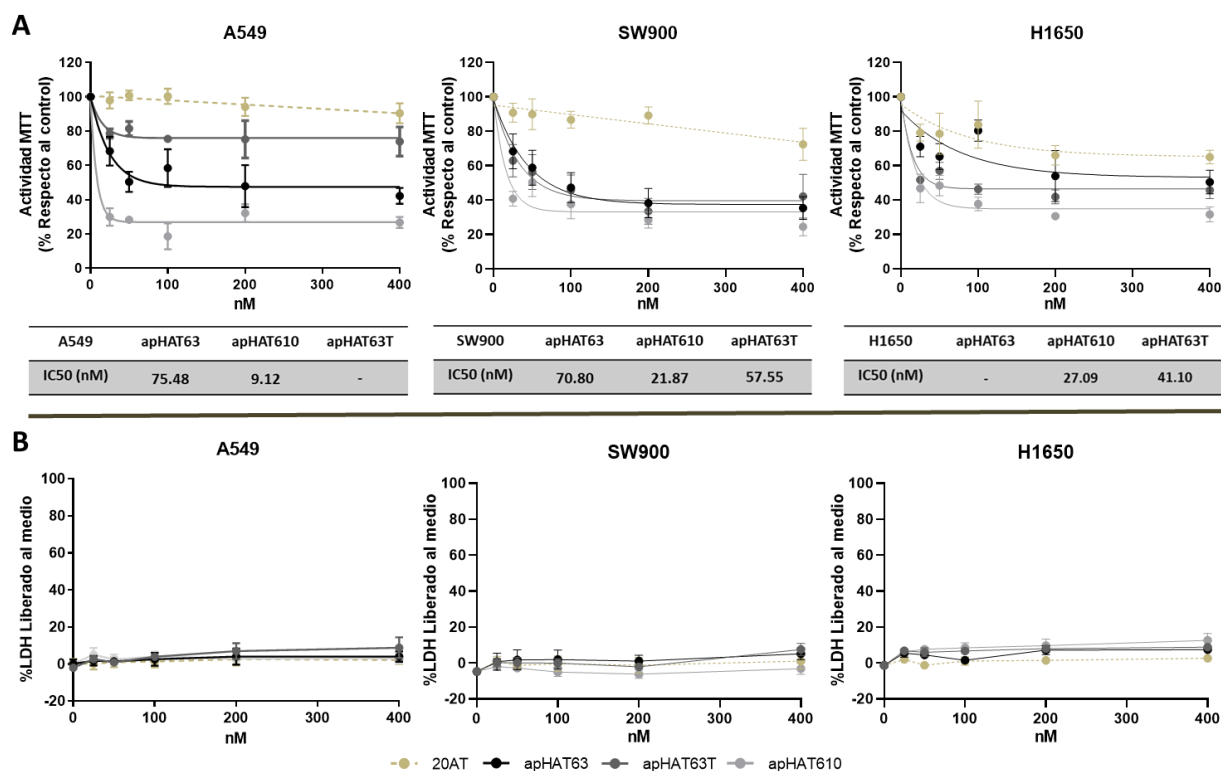
**Figura 27. Medida de la actividad MTT.** Las células HepG2 y HL-60 se sembraron en p96 a una densidad de  $10^4$  células/pocillo para HepG2 y  $2 \times 10^4$  células/pocillo para HL-60 (al ser células en suspensión), y a las 24 horas se transfectaron los 3 aptámeros a concentraciones 25, 50, 100, 200 y 400 nM. Tras 48 horas se realizaron los ensayos de MTT. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, y están normalizados respecto al control de las células sin tratar.

Como se puede apreciar en la **Figura 27**, el porcentaje de actividad MTT no bajó del 66% para la línea HepG2 ni del 80% para la línea HL-60 con ninguno de los 3 aptámeros.

### 3.1.2. Efecto de los aptámeros sobre la proliferación celular y la necrosis en células tumorales de pulmón

A continuación, se procedió a realizar ensayos sobre las líneas celulares de interés, A549, SW900 y H1650.

Para analizar el efecto de los 3 aptámeros sobre la viabilidad celular, las células se transfectaron a las 24 horas de sembrarse con concentraciones crecientes de los aptámeros y se midió la actividad MTT. Asimismo, el aptámero inespecífico 20AT se transfectó en paralelo a las mismas concentraciones. Para asegurar que las células se duplicaran al menos una vez desde su siembra, permitiendo así ver un efecto sobre la proliferación celular, la actividad MTT se midió a un tiempo mínimo de dos veces el tiempo de duplicación para cada línea. Así, el tiempo de duplicación de las células A549 es de 22-28h, el de las SW900 es de 52 horas (Long et al. 1986), y el de las H1650 es de 40-42horas, por lo que la actividad MTT se midió a las 48 horas para las A549, a las 120 horas para las SW900, y a las 96 horas para las H1650 (**Figura 28**). Simultáneamente se midió la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de las células transfectadas a los mismos tiempos (Apartado 4.5 de Materiales y Métodos), con objeto de estudiar la posible muerte celular por necrosis.



**Figura 28. Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT y LDH de las líneas celulares de pulmón.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron en p96 a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/pocillo para las A549 y  $10^4$  células/pocillo para las otras dos líneas. Tras 24 horas se transflectaron con los diferentes aptámeros a 25, 50, 100, 200 y 400 nM, y a los tiempos de 48 horas para A549, 120 horas para SW900 y 96 horas para H1650 se realizaron ensayos de actividad (A) MTT, con cálculo de la Concentración Inhibitoria al 50% (tablas situadas en la parte inferior de las gráficas MTT) y (B) LDH. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

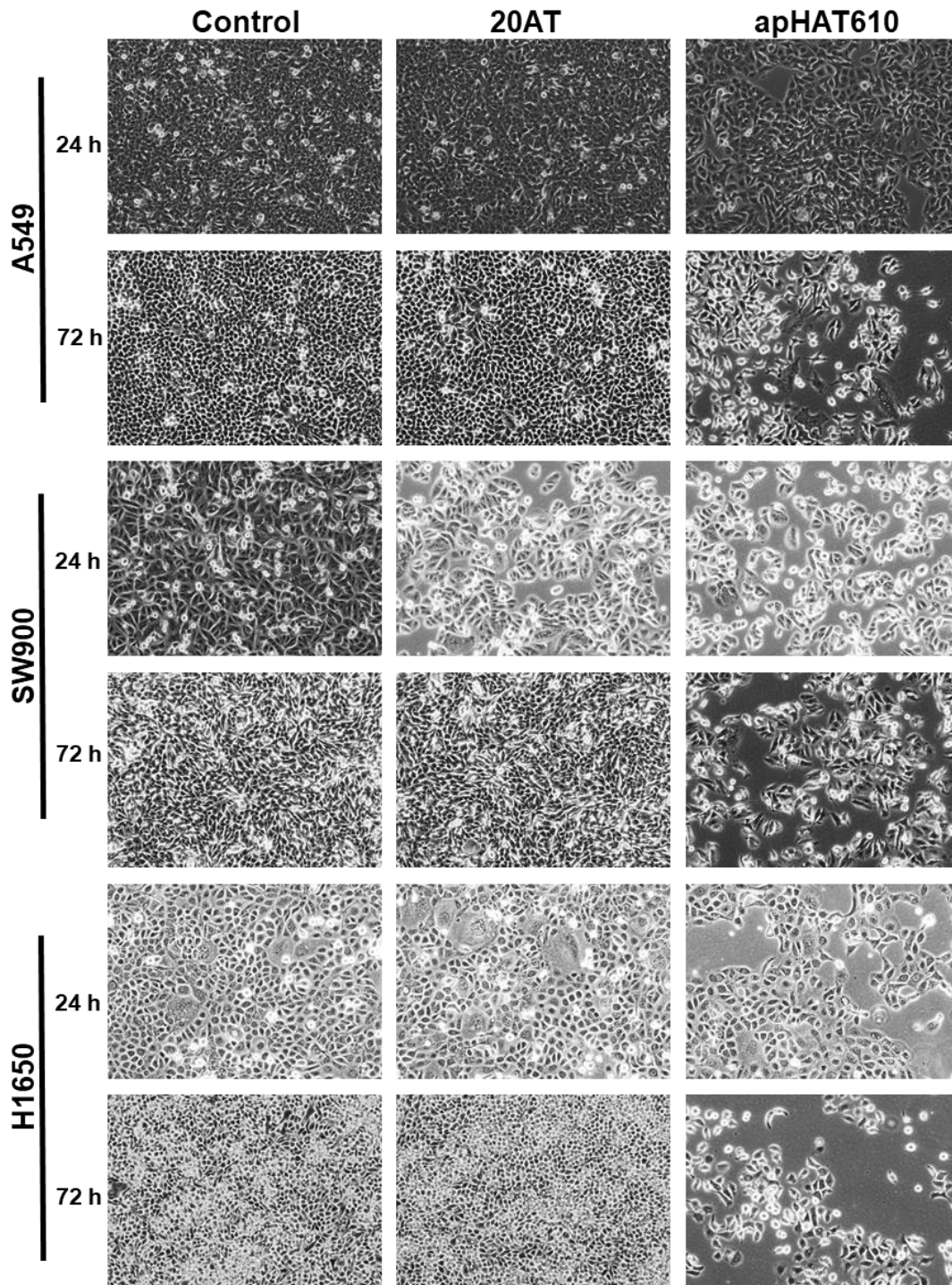
Como se muestra en la **Figura 28A**, los 3 aptámeros disminuyeron la actividad MTT en las tres líneas, permitiendo calcular la IC50 en la mayoría de los casos. El aptámero control produjo un ligero efecto, especialmente en las células H1650, aunque menor que la inhibición producida por los 3 aptámeros. Como se puede observar en la **Figura 28B**, la reducción de la viabilidad celular no estaba causada por necrosis, puesto que la citotoxicidad fue nula o prácticamente nula a las concentraciones estudiadas.

Debido a que el aptámero apHAT610 fue el que más disminuyó la actividad MTT en las 3 líneas celulares, y para simplificar el trabajo de los futuros ensayos con células, se decidió continuar los siguientes experimentos únicamente con el aptámero apHAT610. También se fijó a partir de este punto una concentración de trabajo, que fue aproximadamente 2 veces la IC50 para cada línea, es decir, 20 nM para las A549, 45 nM para las SW900, y 55 nM para las H1650.

Con objeto de corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de MTT, las tres líneas celulares se transflectaron con apHAT610 o el aptámero control 20AT a las concentraciones



establecidas anteriormente y se realizaron micrografías a un aumento de 10X, 24 y 72 horas después de la transfección. En estas condiciones se observó una disminución en el número total de células tratadas con apHAT610 en las 3 líneas celulares, siendo mayor esta disminución en las células H1650 a las 72 horas (**Figura 29**).

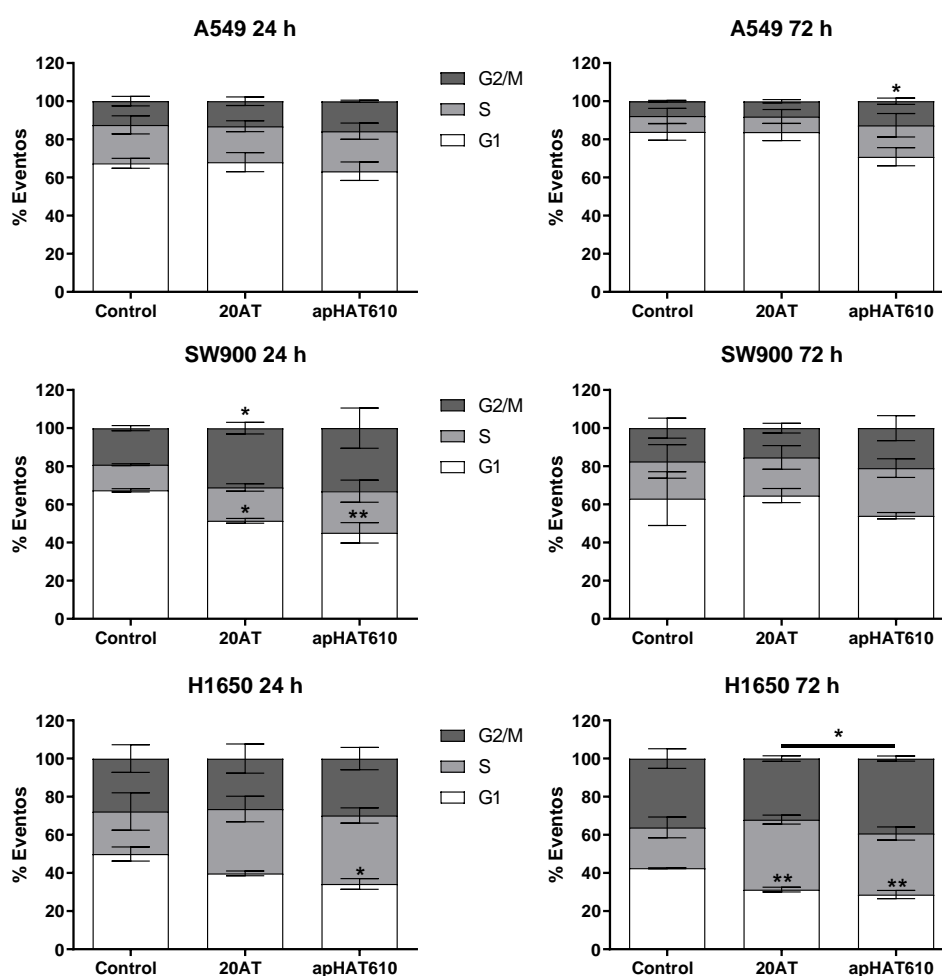


**Figura 29. Efecto de apHAT610 sobre el crecimiento de las células de las 3 líneas de estudio.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron en p96 a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/pocillo para las A549 y  $10^4$  células/pocillo para las otras dos líneas. Tras 24 horas se transfectaron con apHAT610 a una concentración de 2 veces la IC50 para cada línea, y a los tiempos de 24 y 72 horas se tomaron imágenes de microscopía a 10X.



### 3.1.3. Efecto de apHAT610 sobre el ciclo celular en células tumorales de pulmón

Para determinar si la inhibición de la actividad MTT producida por apHAT610 era debida a una inhibición de la proliferación celular, se estudió el efecto de apHAT610 sobre el ciclo celular en las 3 líneas, como se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. Como muestra la **Figura 30**, en la línea A549 el aptámero apHAT610 provocó una reducción de la fase G1 a las 24 h y a las 72 h, que fue acompañada de un aumento de las fases S y G2/M, esta última de manera estadísticamente significativa a las 72 horas (4.84%). El aptámero control 20AT no produjo ningún efecto sobre el ciclo celular a los dos tiempos estudiados.



**Figura 30. Estudio del efecto de apHAT610 sobre el ciclo celular de las líneas de pulmón.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo en una p6, y 24 horas después se transfectaron con el aptámero apHAT610 a una concentración de 2 veces la IC50 para cada línea. Tras 24 o 72 horas, las células se fijaron, tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  respecto al control o respecto a 20AT; \*\* $p < 0.01$  respecto al control).

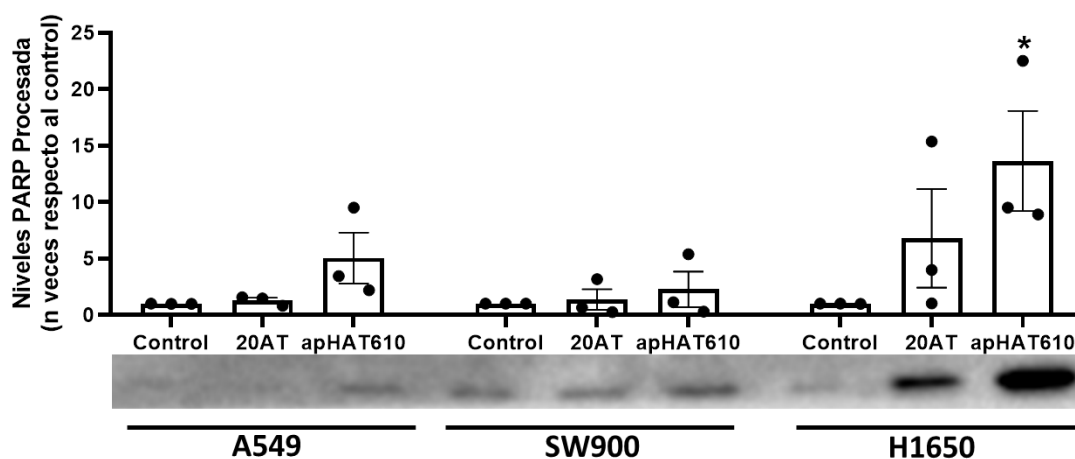
En la línea SW900 el aptámero apHAT610 provocó una disminución de la fase G1 a las 24 horas de manera estadísticamente significativa (22.2%), compensado con un aumento de la fase S y G2/M, esta última en mayor medida. A las 72 horas en esta misma línea, apHAT610

produjo una disminución de la fase G1 que se acompañó de un aumento de las fases S y G2/M en igual medida. El aptámero control 20AT en esta línea produjo también disminución de la fase G1 a las 24 horas de manera estadísticamente significativa (aunque fue mayor para apHAT610) compensada con un aumento de la fase G2/M, también estadísticamente significativa (11.96%). Sin embargo, 72 horas postransfección este efecto se revertió.

En las células H1650, apHAT610 provocó una disminución estadísticamente significativa de la fase G1 a los dos tiempos de ensayo. En ambos tiempos también esta disminución fue compensada con un aumento de la fase S en mayor medida. El aptámero control 20AT en esta línea se comportó de manera muy similar a apHAT610, aunque en este último los valores fueron menores para la disminución de la fase G1 y mayores para el aumento de la fase S. Estos resultados sugieren que apHAT610 estaría produciendo una parada en alguna de las fases (S o G2/M) en las tres líneas celulares (**Figura 30**).

### 3.1.4. Efecto de apHAT610 sobre la apoptosis en células tumorales de pulmón

Para determinar si el efecto producido en las células por apHAT610 era debido a que el aptámero promovía la apoptosis celular, se evaluó la actividad de la caspasa 3, una proteasa que se activa en apoptosis. Se realizó un estudio mediante western blot sobre la enzima Poli ADP-Ribosa (PARP), un sustrato endógeno de la caspasa 3, procesada en estadios apoptóticos tardíos. La actividad de la caspasa 3 da lugar a patrones de proteólisis característicos sobre dicha enzima, con fragmentos específicos de 89 kDa para PARP.



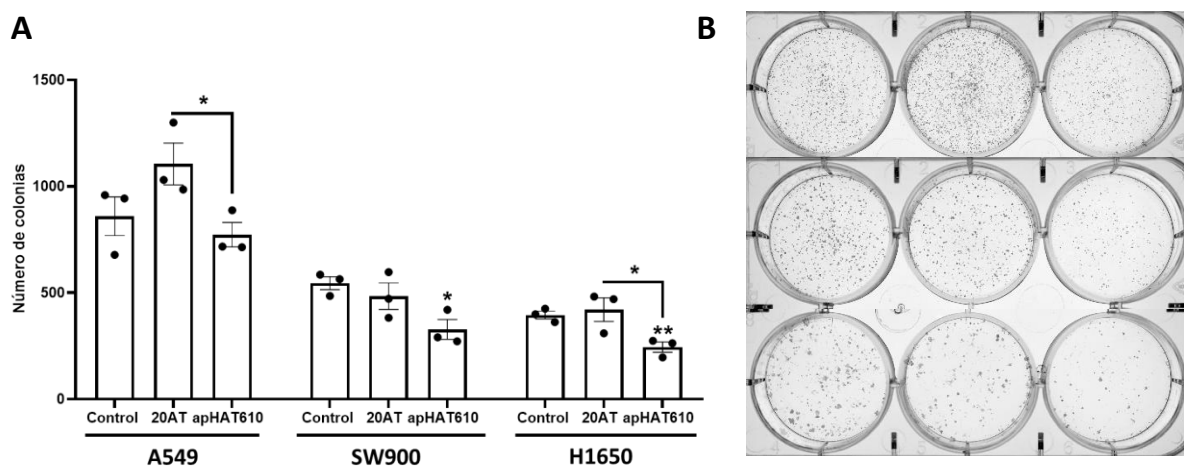
**Figura 31. Efecto de apHAT610 sobre la apoptosis en las líneas celulares de pulmón.** Inmunodetección con el anticuerpo específico mediante SDS-PAGE 7.5% de PARP procesada para detectar la actividad proteolítica de la caspasa 3 tras la transfección de las líneas A549, SW900 y H1650 con apHAT610 y el aptámero control 20AT. La actividad de esta proteasa da lugar a patrones de proteólisis característicos con fragmentos específicos de 89 kDa. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  respecto al control). La imagen corresponde a un ensayo representativo.

En la **Figura 31** se muestra la inmunodetección de los fragmentos producidos por la proteólisis de PARP en las células A549, SW900 y H1650, 24 horas post-transfección con los aptámeros apHAT610 y 20AT. Los resultados evidenciaron el efecto apoptótico de apHAT610 sobre las tres líneas celulares, siendo en las H1650 estadísticamente significativo.

### 3.2. Actividad anticlonogénica de apHAT610 en células tumorales de pulmón

Los experimentos de formación de colonias se fundamentan en la facultad que tiene una única célula para establecer una colonia de al menos 50 células (Puck and Marcus 1956), cualidad celular necesaria para el funcionamiento y la integridad de los tejidos. Este hecho también se produce en células tumorales, pero se intenta anular para evitar recidivas (Franken et al. 2006). Esta característica sucede debido a la pérdida de inhibición por contacto, y se utiliza en esta técnica para estudiar la capacidad tumorigénica de las células (Rafehi et al. 2011). Así, se podría analizar el efecto del aptámero apHAT610 analizando si la célula conserva su capacidad de dividirse después del tratamiento de forma ilimitada.

Las células se transfectaron previamente con apHAT610 y el aptámero control 20AT, y a las 24 horas se recogieron y se re-sembraron 1000 células/pocillo para realizar el ensayo de formación de colonias (apartado 4.7 de Materiales y Métodos). La cuantificación de las colonias se realizó a los 6 días para las células A549, a los 8 días para las células SW900 y a los 12 días para las células H1650, contados desde la siembra.



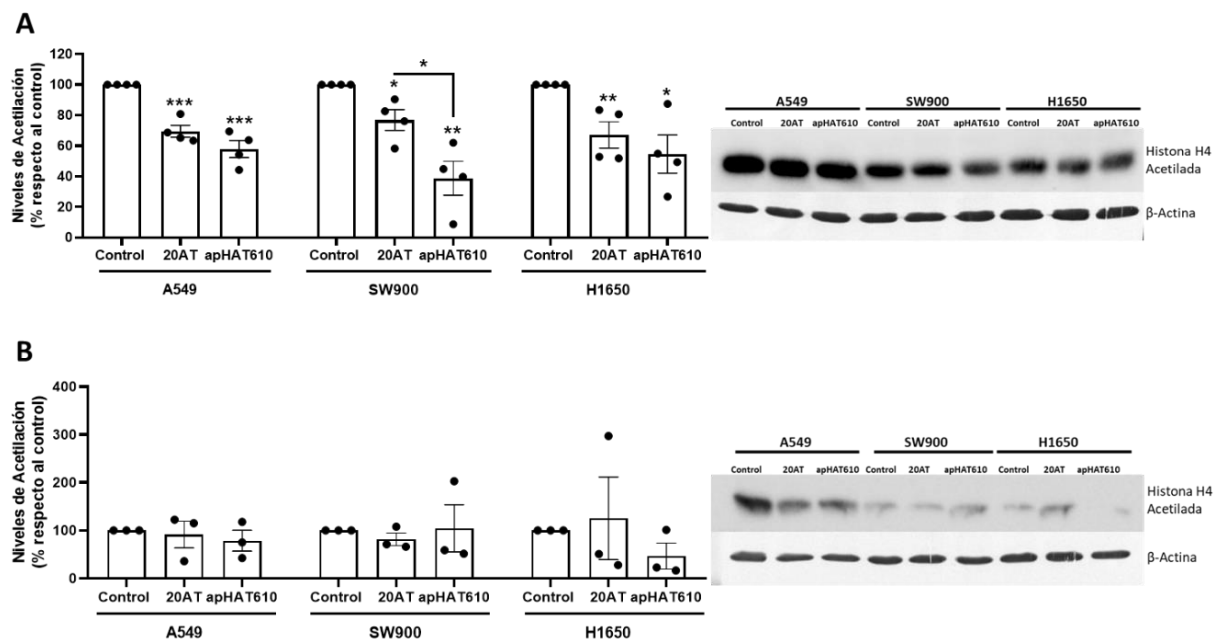
**Figura 32. Efecto de apHAT610 sobre la capacidad clonogénica de las células.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron en p6 a densidad  $5 \times 10^5$  células/pocillo y se transfectaron a las 24 horas con apHAT610 a las concentraciones de trabajo establecidas previamente. Transcurridas 24 horas, las células se levantaron, contaron y sembraron en p6 con 1000 células/pocillo para las 3 líneas. **(A)** La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  respecto al control o respecto a 20AT; \*\* $p < 0.01$  respecto al control). **(B)** Imagen representativa de 1 experimento de formación de colonias de las 3 líneas celulares. De arriba a abajo: A549, SW900 y H1650. De izquierda a derecha: Control, 20AT y apHAT610.

La **Figura 32** muestra la acción inhibitoria sobre la capacidad clonogénica de las células de apHAT610 con respecto al control y al 20AT. Esta inhibición en la formación de colonias fue estadísticamente significativa para las líneas celulares SW900 y H1650 con respecto al control, y para las líneas celulares A549 y H1650 con respecto al 20AT.

### 3.3. Efecto inhibitorio de apHAT610 sobre la actividad HAT1 en células tumorales de pulmón

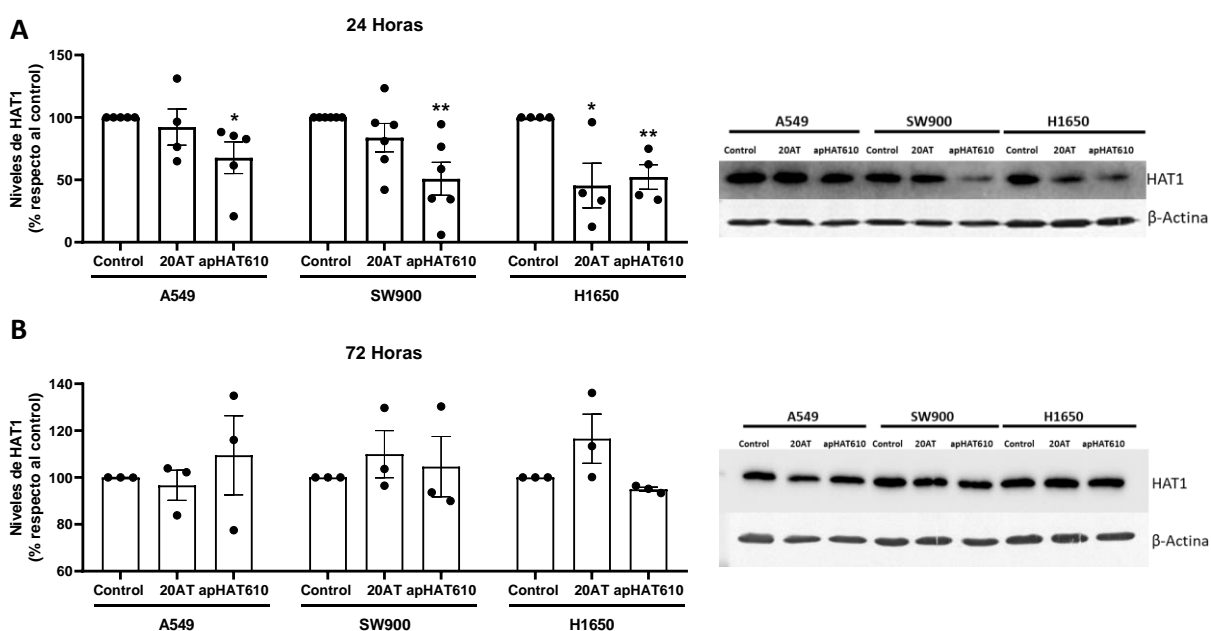
Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad HAT1 *in vitro* con la proteína purificada indicaban que apHAT610 ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la acetilación de la histona H4, función principal descrita de la proteína HAT1. A la vista de este resultado, se decidió estudiar si apHAT610 ejercía este mismo efecto *in vivo* en las 3 líneas celulares de estudio.

Para ello, se sembraron las células y 24 horas después se transfectaron con apHAT610 y el aptámero control 20AT a las concentraciones establecidas anteriormente. Estas células se lisaron a las 24 y a las 72 horas post-transfección, y se realizó un estudio de los niveles de la histona H4 acetilada (**Figura 33**) y de la proteína HAT1 (**Figura 34**) por western blot.



**Figura 33. Efecto de apHAT610 sobre los niveles de acetilación de la histona H4 a las 24 horas y a las 72 horas post-transfección.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron en p6 a densidad  $5 \times 10^5$  células/pocillo y se transfectaron a las 24 horas con las concentraciones de trabajo establecidas previamente. Transcurrido el tiempo del ensayo, las células se levantaron y lisaron. Posteriormente se realizó una inmunodetección con un anticuerpo específico mediante SDS-PAGE 15% (A) Niveles de acetilación de la histona H4 a las 24 horas post-transfección. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  respecto al control o respecto al 20AT; \*\* $p < 0.01$  respecto al control; \*\*\* $p < 0.001$  respecto al control). (B) Niveles a acetilación de la histona H4 a las 72 horas post-transfección. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Las imágenes de la derecha corresponden a experimentos representativos de los ensayos realizados con el anticuerpo específico de histona H4 acetilada.  $\beta$ -Actina es el control de carga.

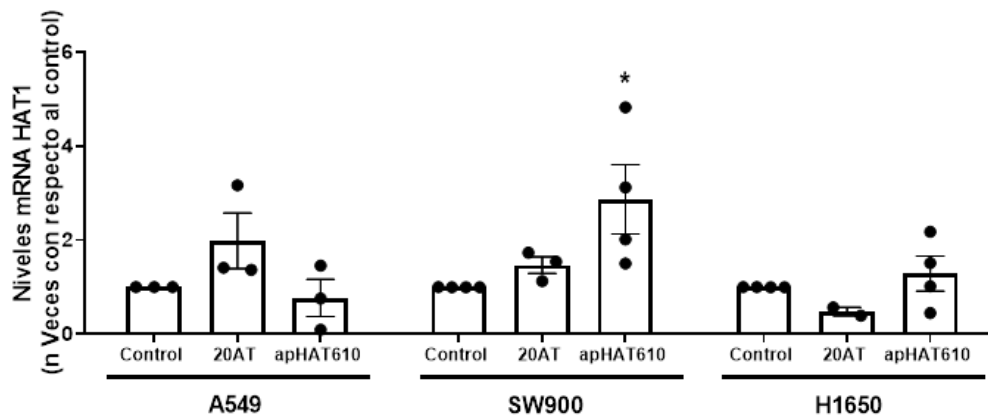
Los resultados indican que a las 24 horas post-transfección el aptámero apHAT610 produjo una disminución de los niveles de acetilación de la histona H4 y de HAT1 en las 3 líneas celulares de manera estadísticamente significativa con respecto al control y, en el caso de la acetilación en las células SW900, también con respecto a 20AT. Por otro lado, el aptámero control 20AT también produjo una disminución estadísticamente significativa de los niveles de acetilación en las 3 líneas y de los niveles de HAT1 en las células H1650, pero el aptámero apHA610 provocó una disminución aún más pronunciada. Sin embargo, a las 72 horas post-transfección apHAT610 no ejerció ningún efecto sobre los niveles de acetilación ni de HAT1. Se observa una tendencia a la baja en los niveles tanto de acetilación de H4 como de HAT1 en la línea H1650, y de los niveles de acetilación en la línea A549, pero no fueron estadísticamente significativos.



**Figura 34. Efecto de apHAT610 sobre los niveles de HAT1 a las 24 horas y a las 72 horas post-transfección.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron en p6 a densidad  $5 \times 10^5$  células/pocillo y se transfectaron a las 24 horas con las concentraciones de trabajo establecidas previamente. Transcurrido el tiempo del ensayo, las células se levantaron y lisaron. Posteriormente se realizó una inmunodetección en los lisados con un anticuerpo específico mediante SDS-PAGE 15%. **(A)** Niveles de HAT1 a las 24 horas post-transfección. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  respecto al control; \*\* $p < 0.01$  respecto al control). **(B)** Niveles de HAT1 a las 72 horas post-transfección. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Las imágenes de la derecha corresponden a experimentos representativos de los ensayos realizados con el anticuerpo específico de HAT1.  $\beta$ -Actina es el control de carga.

También se comprobó el efecto de apHAT610 sobre los niveles de ARN mensajero de HAT1 en las 3 líneas. Para ello, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de los niveles de ARNm a las 24 horas postransfección, mediante qRT-PCR. Como muestra la **Figura 35**, en las líneas A549 y H1650 no se apreció ningún efecto del aptámero sobre el ARNm de HAT1. Sin embargo, en la línea SW900 estos niveles aumentaron al tratar las células con apHAT610 de

manera estadísticamente significativa con respecto al control, lo que podría indicar un efecto compensatorio en la célula como respuesta a la disminución de los niveles de proteína.



**Figura 35. Efecto de apHAT610 sobre los niveles de ARN mensajero de HAT1.** Las células A549, SW900 y H1650 se sembraron en p6 a densidad  $5 \times 10^5$  células/pocillo y se transfectaron a las 24 horas con apHAT610 a las concentraciones de trabajo establecidas previamente. Transcurridas 24 horas, las células se levantaron y se extrajo su ARN. La gráfica muestra la cuantificación de los niveles de ARN mensajero de HAT1 mediante qRT-PCR. Los datos se expresan como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (\* $p < 0.05$  respecto al control).

## **DISCUSIÓN**





## DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. A pesar de los avances en el desarrollo de tratamientos y herramientas diagnósticas, es una enfermedad para la que todavía las opciones terapéuticas son limitadas, y la búsqueda de nuevas estrategias y biomarcadores que faciliten un diagnóstico precoz y que posean valor pronóstico de ayuda en la toma de decisiones, es prioridad en oncología. De todos los tipos de cáncer, el de pulmón es el más diagnosticado en el mundo junto con el de mama (11.6% del total de casos) y el que más mortalidad genera (18.4% del total de casos). Los datos actualizados a 2022 de la American Cancer Society muestran que, para los pacientes con carcinoma de células no pequeñas, la supervivencia a cinco años de los pacientes con tumores localizados es del 63%; en casos con diseminación regional, es del 35%, y en pacientes con metástasis, es del 7%. La supervivencia de todos los casos combinados es del 25%. Para el cáncer de células pequeñas, menos frecuente, los datos son peores. En los casos en los que el tumor aún no se ha diseminado al diagnóstico la supervivencia a 5 años es del 27%; una vez diseminado, la supervivencia se reduce a unos meses. La supervivencia a 5 años combinada es tan solo del 7%. Se hace evidente, por tanto, la necesidad de hallar nuevos marcadores y dianas que contribuyan a mejorar el pronóstico de estas enfermedades.

Una de las dianas terapéuticas que está ganando protagonismo en los últimos años es HAT1, de la que se sabe que su sobreexpresión está relacionada con el desarrollo de patologías de diversa índole, como las infecciones causadas por virus (HBV, VIH, Covid-19), (Espindola et al. 2018; Yang et al. 2019; Yuan et al. 2020; de Oliveira et al. 2020), o el cáncer. Sin embargo, aún no se conoce el papel concreto que desempeña esta proteína en muchas enfermedades, ya que se han observado resultados dispares. Así, en el cáncer de pulmón, Han y colaboradores (Han et al. 2017), analizaron el ARNm y la proteína en células aisladas, mediante digestión con colagenasa, de 20 muestras de adenocarcinomas, y describieron una reducción en los niveles de HAT1 con respecto a células obtenidas de tejido peritumoral. Sin embargo, un análisis transcriptómico publicado el mismo año (Aran et al. 2017), donde se estudiaron 541 casos de cáncer de pulmón (en 59 casos también tejido peritumoral adyacente) y muestras de pulmón sano de 354 casos, no solo no corroboran los datos anteriores, sino que demostraron un incremento importante en los niveles de ARNm para HAT1 en tejido tumoral con respecto al tejido adyacente. Los niveles de expresión de HAT1 en tejido sano con respecto a tejido peritumoral fueron similares.

Nuestro análisis de los datos disponibles en GEPIA sugieren que la expresión del ARNm de HAT1 es mayor en adenocarcinomas y carcinomas escamosos en comparación con tejido

no tumoral. Sin embargo, la posibilidad de análisis de datos en esta plataforma es limitada. No permite discriminar entre subtipos de adenocarcinoma ni estadios de la enfermedad, lo cual es probable que determine la falta de significación estadística a pesar de la diferencia en los valores observada. En cambio, si fue significativa la correlación entre niveles elevados de HAT1 y una menor supervivencia de los pacientes en adenocarcinoma. Esto sugiere que la falta de estratificación de los casos de los análisis en GEPIA pudiera enmascarar los resultados. Por ello, pensamos que un análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína podría ser de ayuda. Como estudio piloto, analizamos HAT1 en tejido tumoral y peritumoral del mismo paciente (15 casos) y en muestras de pulmón procedentes de pacientes sin patología neoplásica. Observamos un aumento significativo en la señal para HAT1 en el núcleo de los tumores que fue mayor en tumores de estadios más avanzados y en aquellos que de entrada presentan peor pronóstico, como el carcinoma de células pequeñas (un caso) y el de células grandes (un caso). Estos datos son evidentemente preliminares, ya que el número de casos es muy pequeño, pero el test estadístico empleado es altamente discriminatorio, y los resultados sugieren fuertemente el aumento de HAT1 en el núcleo de las células tumorales en cáncer de pulmón. Otro dato interesante es la diferencia en la localización citosólica de HAT1 entre el tejido de pacientes sin tumor y tumores con respecto a las células epiteliales en la región peritumoral, donde HAT1 es más abundante en el citoplasma. No se evidenciaron cambios significativos a nivel nuclear entre los epitelios en pacientes sanos y en la zona peritumoral, aun cuando la media es superior en tejido sano. Al igual que para confirmar los datos sobre el aumento de HAT1 nuclear en tumores, será necesario contar con una casuística más amplia para un futuro estudio, ya que la posibilidad de que existan cambios relacionados con la distribución subcelular de HAT1 en tumores y tejidos peritumorales no puede ser descartada.

También, datos propios pendientes de publicación en los que se realizaron inmunohistoquímicas de diferentes tipos de cáncer muestran una sobreexpresión de HAT1 estadísticamente significativa en tejidos tumorales de cerebro, mama, próstata y vejiga en comparación con tejidos no tumorales. Además, esta sobreexpresión se correlaciona con tumores peor diferenciados, más agresivos, invasivos, metastásicos y de peor evolución.

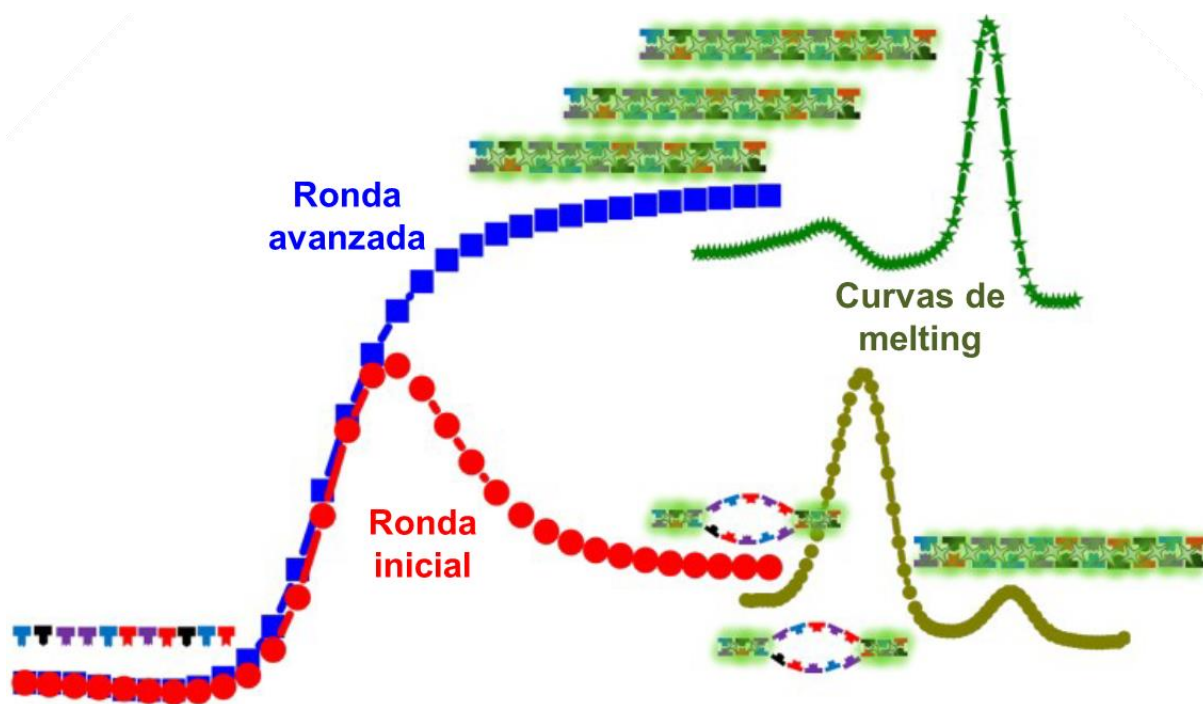
El hecho de que se observen niveles elevados de esta proteína en cáncer puede ser debido a su implicación en las diferentes funciones celulares durante la fase de replicación, momento en el que la célula posee altos niveles de HAT1 (Ruiz-Garcia et al. 1998; Suter et al. 2007). Por ejemplo, esta enzima facilita la disponibilidad de grupos acetilo en el núcleo, que se transforman en AcCoA incluso en condiciones de estrés de nutrientes (Bulusu et al. 2017; Kamphorst et al. 2014; Comerford et al. 2014; Schug et al. 2015), favoreciendo la proliferación celular en procesos aberrantes. Asimismo, su participación en la maduración de

la cromatina (Agudelo Garcia et al. 2017; Ge et al. 2011), en la reparación del ADN (Nagarajan et al. 2013; Barman et al. 2006; Yang et al. 2013; Qin and Parthun 2002; Tscherner et al. 2012), su interacción con el ORC (Agudelo Garcia, Lovejoy, et al. 2020; Suter et al. 2007), y su disminución en tejidos envejecidos frente a tejidos jóvenes (Nagarajan et al. 2019) muestra la relevancia de esta enzima en la biología celular y en los procesos proliferativos. Por todo ello, teniendo en cuenta que las alteraciones en el control del ciclo celular son una de las características de todos los tipos de cáncer (Hanahan and Weinberg 2011), es lógico pensar que un aumento en los niveles, cambios en la distribución subcelular y/o cambios en el control de la actividad de HAT1 podrían estar implicados en la etiopatogenia de estas patologías.

El interés de HAT1 como diana terapéutica en los últimos años ha dado lugar al desarrollo de inhibidores que anulen su actividad. Recientemente se han sintetizado 2 tipos de inhibidores que se encuentran en fase de desarrollo, uno bisustrato con parte de la histona H4 y de la AcCoA, H4K12CoA (Ngo et al. 2019), y otro análogo de la riboflavina diseñado mediante análisis *in silico*, JG-2016, que se une a HAT1 en el sitio del cofactor (Gruber et al. 2021). Paralelamente a estas publicaciones, en este trabajo se han desarrollado aptámeros como inhibidores de HAT1, y se ha valorado su papel como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer de pulmón. Para ello, se han analizado tanto sus características estructurales y moleculares como su efecto antitumoral en líneas celulares de cáncer de pulmón.

Como se indica en la sección de resultados, después de 6 rondas de selección se han obtenido aptámeros que reconocen HAT1 con elevada afinidad y especificidad, lo cual se ha analizado mediante ELONA y qPCR. La evolución de las 6 rondas de selección analizada mediante qPCR indica una reducción de la heterogeneidad de la población según avanzan las rondas. Así, una vez finalizada la amplificación (por limitación de primers o dNTPs), en las primeras rondas se ve un mayor número de secuencias diferentes, lo que hace más probable la formación de heterodúplex (secuencias con regiones desapareadas). La fluorescencia se intercala en la doble cadena, por lo que al haber más heterodúplex, se produce una caída de la misma. Por el contrario, según avanza la selección, el número de secuencias diferentes va disminuyendo, lo que hace que, una vez terminada la amplificación, se formen más homodúplex (secuencias totalmente apareadas) (**Figura 36**), generando un aumento de la fluorescencia (Luo et al. 2017).

En las curvas de Melting ocurre lo mismo, ya que los heterodúplex característicos de rondas iniciales tienen un pico de  $T_m$  entre 70-72°C y los homodúplex característicos de rondas avanzadas de 80-87°C (Luo et al. 2017). Por tanto, en la selección realizada en el laboratorio se aprecia claramente que en la ronda 6 hay un enriquecimiento de la población de aptámeros.



**Figura 36. Modelo de evolución de una selección.** La línea roja indica una ronda inicial, con mucha heterogeneidad y mayor formación de heterodúplex. La línea azul representa una ronda avanzada de una selección exitosa, con mucha homogeneidad y formación de homodúplex. Las curvas verdes indican la línea de Melting de cada tipo de ronda. Imagen modificada a partir de (Luo et al. 2017).

El análisis de la secuenciación masiva indica la evolución de la población hacia 4 grupos de aptámeros muy bien diferenciados al menos desde la ronda 3. Este hecho es indicativo de que la selección ocurre de una manera eficaz, ya que al compararlo con la secuenciación masiva de la población inicial (análisis de similitud de secuencias no mostrado) en la que hay 1,5 millones de secuencias con una gran heterogeneidad, se aprecia la cantidad de secuencias descartadas únicamente en 3 rondas, y que solo los aptámeros afines a su diana siguen apareciendo en todas las poblaciones obtenidas hasta la ronda 6, momento en el que se considera para la selección. Como ejemplo de que ha sido una selección eficaz, en la selección que realizan Kolm y colaboradores (Kolm et al. 2020) el enriquecimiento de aptámeros empieza a partir de la ronda 6-7. Sería interesante realizar en un futuro un análisis de la evolución de la selección por secuenciación masiva a lo largo de todas las rondas, ya que podría ofrecer mucha información acerca del proceso SELEX.

También es llamativo de este análisis el hecho de que el clúster del aptámero apHAT63 invierte su porcentaje de representación con el grupo del aptámero apHAT610 de la ronda 3 a la 6, postulándose como el aptámero que más afinidad presenta hacia su diana. Esto se confirma cuando se analizan mediante ELONA los aptámeros obtenidos por clonaje en *E. coli* y posterior secuenciación Sanger, producidos por PCR utilizando como molde el vector en el que han sido clonados. Sin embargo, el resto de ensayos en los que se utilizan aptámeros

sintéticos sugieren que el mejor aptámero frente a HAT1 es apHAT610, ya que reconoce mejor a la proteína desnaturalizada en apta western blot, posee una  $K_D$  menor e inhibe de manera más eficiente la actividad enzimática de la diana, tanto *in vitro* como en modelos celulares. Una posible justificación del primer ensayo sería que en la selección de aptámeros la proteína mantiene una estructura definida y el reconocimiento de la proteína estructurada y desnaturalizada puede ser diferente para un mismo aptámero. Además, las  $K_D$ s de ambos aptámeros, aunque la de apHAT610 sea menor, son muy parecidas. Por último, el hecho de que la inhibición de HAT1 por parte de apHAT610 sea mayor que la obtenida con apHAT63 podría deberse a que en el método SELEX los aptámeros que se seleccionan en las siguientes rondas son aquellos que muestran mayor afinidad por su diana, aunque eso no quiere decir que sean capaces de inhibir su función.

Por otro lado, tanto apHAT63F como apHAT610R presentan en su estructura los mismos motivos *G-quadruplex*, y su proporción de GC es similar, lo que tampoco justifica dicha inversión de porcentaje en el análisis de NGS.

También, como se expondrá en las próximas líneas, el motivo de descarte de los aptámeros apHAT63R y apHAT610F se ha basado exclusivamente en la predicción de su estructura secundaria, dejando fuera otros parámetros como, por ejemplo, la afinidad por su diana. Por tanto, podría ser que los aptámeros elegidos apHAT63F y apHAT610R no sean los mejores candidatos, y una posible explicación a lo expuesto en párrafos anteriores. Sería interesante en un futuro caracterizar los aptámeros complementarios para corroborar o rechazar esta teoría.

Asimismo, para poder esclarecer las dudas surgidas de estos resultados, sería necesario profundizar en ello planteando nuevos experimentos que incluyan el análisis de la cinética de estos aptámeros y determinar la utilidad real de cada uno, ya que es probable que unos sean más adecuados como herramientas diagnósticas y otros sean más útiles para estrategias terapéuticas.

Dentro de cada clúster se observan similitudes muy altas entre los aptámeros que lo componen, y en todos existe una secuencia con mayor porcentaje de representación que coincide con la que mayor similitud posee con el resto de secuencias de su grupo (Blank 2016). El aptámero apHAT610 coincide con la secuencia obtenida por secuenciación Sanger. Sin embargo, esto no ocurre con apHAT63, ya que el aptámero obtenido por secuenciación Sanger tiene un nucleótido más que el más representado en NGS, y no se encuentra en ninguna de las dos rondas de NGS. Esto puede ser debido a que la secuencia obtenida por Sanger tiene una mutación añadida en el proceso de clonaje o de secuenciación. El aptámero con el que se ha trabajado corresponde con el obtenido en Sanger, ya que este proceso se

realizó antes del análisis por NGS, pero no ha supuesto ningún problema trabajar con esa secuencia, ya que reconoce a su diana de manera óptima. Aun así, este podría ser otro motivo que explique la diferencia entre la evolución de apHAT63 en NGS y del resto de ensayos.

Las diferencias existentes entre las secuencias de un mismo clúster son mínimas, apenas difieren en unos pocos nucleótidos. De esto se puede deducir que todas las secuencias de un mismo grupo deben reconocer a su diana en el mismo epítipo y que su estructura terciaria debe ser muy similar, sino idéntica. Además, existen regiones dentro un mismo clúster que acumulan más mutaciones (datos no mostrados) y regiones con menos cambios, lo que podría indicar zonas más conservadas y favorecer la optimización de los aptámeros (Blank 2016) mediante el truncado de sus secuencias.

Por tanto, apHAT63 y apHAT610 han sido las secuencias escogidas para continuar el estudio, debido a que son los aptámeros más representados tanto en el clonaje y secuenciación Sanger como en NGS, hecho que corrobora que ambos métodos de identificación de secuencias funcionan de forma similar y eficiente. Sin embargo, la tendencia general en este campo es la sustitución del método de clonaje y secuenciación Sanger por la secuenciación de nueva generación (NGS), debido a las ventajas en el análisis de las poblaciones que este último método tiene (Kolm et al. 2020; Civit et al. 2018).

Como se ha mencionado previamente, el análisis de estas secuencias revela que todas muestran una riqueza en GC similar, superior al 50%, lo que sugiere una elevada estabilidad estructural. Además, según el estudio realizado con los programas informáticos mencionados en los resultados, se han calculado los valores de energía libre y las estructuras secundarias más estables, así como la posibilidad de los distintos aptámeros de formar estructuras *G-quadruplex*. Los *G-quadruplex* son estructuras del ADN que suelen situarse en zonas con abundantes guaninas, en las que cuatro segmentos de una misma hebra se disponen en paralelo debido a la interacción mediante puentes de hidrógeno entre las guaninas (Capra et al. 2010). Estas estructuras se forman en zonas del genoma como los telómeros, en promotores de genes y oncogenes, y en ADN ribosomal (ADNr). No son exclusivas del ADN, sino que también se forman en ARN y son habituales en zonas no traducidas del ARN mensajero. Los *G-quadruplex* se producen en los organismos, y participan en diferentes procesos biológicos, como la transcripción, la replicación, la traducción y el mantenimiento de los telómeros, e incluso se ha sugerido una relación entre *G-quadruplex*, regulación génica y desarrollo de enfermedades (Kwok and Merrick 2017). Asimismo, a pesar de su aparente rigidez, muestran una considerable plasticidad. Dos o 3 cuartetos G se suelen agrupar de manera consecutiva para que su conformación no sea excesivamente rígida (Platella et al.

2017). Esto ocurre con los aptámeros apHAT63F y apHAT610R, que presentan 2 cuartetos cada uno.

Por otro lado, los aptámeros que contienen estructuras *G-quadruplex* suelen ser estables, resistentes a las nucleasas del suero, menos inmunogénicos y alcanzan más fácilmente el interior celular (Kwok and Merrick 2017). Por este motivo se han descartado del estudio los aptámeros apHAT63R y apHAT610F que, una vez analizados, no presentan este tipo de estructuras.

El tamaño de los aptámeros es una cualidad importante a tener en cuenta, ya que cuanto más pequeños sean, mayor será su facilidad para entrar en las células y otros organismos vivos y unirse así a su diana. Por ello, se decidió truncar los aptámeros apHAT63 y apHAT610, eliminándose regiones de la secuencia que no parecen comprometer la estructura del aptámero. Así, se diseñaron los aptámeros apHAT63T y apHAT610T, que mantienen la estabilidad y los *G-quadruplex* de sus secuencias parentales. Sin embargo, el análisis mediante ELONA indica que el aptámero apHAT610T no reconoce a HAT1 igual que su precursor, lo que sugiere que la zona truncada de esta secuencia resulta clave para el reconocimiento de su diana.

Los estudios dirigidos a determinar la afinidad y especificidad de los aptámeros muestran que apHAT63, apHAT63T y apHAT610 reconocen a su diana de manera específica, ya que la diferencia en el reconocimiento de HAT1 con respecto a las proteínas presentes en un lisado celular es altamente significativa. Asimismo, aunque con diferencias entre ellos, los 3 muestran una alta afinidad por la enzima, como confirma el cálculo de la  $K_D$ , siendo apHAT610 el aptámero que tiene un valor menor. Aptámeros modificados con moléculas como 2'F-ANA (ácido 2'-fluoroarabinonucleico), permiten obtener valores de  $K_D$  significativamente menores que los aptámeros no modificados al conferirles estructuras *G-quadruplex* altamente estables (Lietard et al. 2017). Modificar de esta manera los aptámeros seleccionados en este estudio podría ser interesante para optimizar la afinidad de estas secuencias por su diana.

Los ensayos de inhibición de la actividad de la proteína HAT1 por parte de los aptámeros, donde los 3 inhiben su función, confirma de nuevo que apHAT610 es el mejor candidato de los 3 aptámeros, ya que muestra una mayor inhibición teniendo una  $IC_{50}$  en el rango nanomolar bajo. Cabe destacar que apHAT63T es capaz de inhibir la actividad HAT1 de manera dependiente a la concentración de forma más eficaz que su aptámero parental, cuando en el resto de ensayos ambos se comportan de manera similar. Esto puede deberse a que, al ser más pequeño, muestre una mayor accesibilidad al sitio activo de la enzima, produciendo una mayor inhibición. Sin embargo, en el ensayo de estabilidad en plasma sanguíneo parece que el aptámero apHAT63T se degrada antes, siendo apHAT63 el

aptámero más resistente a la degradación de los 3. Aun así, los 3 aptámeros muestran una alta resistencia a la degradación por parte de las nucleasas del plasma sanguíneo, mostrando una vida media superior a las 24 horas en todos los casos. Esto puede deberse a las estructuras *G-quadruplex* que poseen los 3 aptámeros (Kwok and Merrick 2017). Además, en caso de necesitarse vidas medias más altas, los aptámeros pueden modificarse para protegerlos de la degradación del plasma, por ejemplo, añadiendo en el extremo 3' un grupo propilamino (Bates et al. 1999).

Como se puede apreciar en los resultados, la localización de los aptámeros en las dos líneas celulares de pulmón utilizadas para este ensayo es tanto citoplasmática como nuclear. Dado que se ha demostrado en este trabajo que los aptámeros son específicos de HAT1, se podría confirmar que la localización de HAT1 es citoplasmática y nuclear, corroborando las investigaciones realizadas acerca de este hecho (Verreault et al. 1998; Imhof and Wolffe 1999; Barman et al. 2006; Ruiz-Garcia et al. 1998) y los resultados obtenidos en inmunohistoquímica. Sería interesante realizar en el futuro ensayos de colocalización de los aptámeros con el anticuerpo  $\alpha$ -HAT1, para comprobar si comparten sitio de unión a la proteína.

Una de las características que se requieren cuando se trata de encontrar nuevos agentes antitumorales es la capacidad de éstos de inhibir ciertos procesos relacionados con el desarrollo del tumor, como pueden ser la proliferación celular y la actividad clonogénica. En este sentido, en este trabajo se demuestra que los 3 aptámeros son capaces de reducir la proliferación celular en las tres líneas celulares de cáncer de pulmón humanas estudiadas (A549, SW900 y H1650), sin producir necrosis. El aptámero apHAT610 es el único con el que se puede obtener una IC50 en las 3 líneas, y sus valores se establecen en el rango nanomolar bajo, por lo que se decidió continuar con el aptámero apHAT610 para el resto de ensayos. En un futuro sería interesante realizar estos ensayos con apHAT63 y apHAT63T.

La línea celular A549 es la más sensible al aptámero apHAT610, ya que su IC50 tiene el valor más bajo, 9.12 nM. Por otro lado, en las otras dos líneas celulares el valor de la IC50 es muy similar (21.87 nM para SW900 y 27.09 nM para H1650). Resulta llamativa esta diferencia entre las células A549 y las H1650, ya que son derivadas del mismo tipo de tumor, adenocarcinoma. Una explicación podría ser que las células H1650 presentan mutaciones en el EGFR, que está constitutivamente activo (Ekert et al. 2014). Se ha demostrado que la expresión de HAT1 está regulada, entre otros factores, por la actividad de EGFR (Gruber et al. 2019), lo que haría suponer que las células H1650 tengan niveles más elevados de la proteína que las células A549 y, por tanto, sea necesaria más cantidad de aptámero para alcanzar la IC50. Sin embargo, se observa que los niveles de proteína son muy similares en



las tres líneas, y aunque los niveles de ARN mensajero en H1650 son levemente superiores, no parece que los niveles basales de HAT1 sean el motivo de esta diferencia.

Por otro lado, los niveles de EGFR son significativamente más elevados en células SW900 que en células A549 (Korrodi-Gregorio et al. 2016), lo que podría explicar que SW900 y H1650 se comporten de manera similar. Una mayor actividad EGFR podría compensar el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular provocado por apHAT610. Sería necesario analizar la posibilidad de que apHAT610 pueda sinergizar con otros medicamentos como inhibidores de EGFR en tumores resistentes a éstos.

La reducción de la viabilidad celular observada en los ensayos de MTT puede estar ocasionada por i) la necrosis generada por la toxicidad del tratamiento, lo que hemos descartado por los resultados obtenidos en los ensayos de liberación de LDH; ii) por entrada en apoptosis, provocando que la célula inicie una muerte programada al no poder desempeñar sus funciones vitales, o iii) por reducción en la proliferación debida a una parada en el ciclo celular. En los dos primeros procesos, el tratamiento genera una reducción irreversible de la viabilidad, pero en el caso de la parada del ciclo celular, las células podrían volver a ser viables si el tratamiento se deja de aplicar.

Los siguientes ensayos se basan en la premisa del párrafo anterior, por lo que se ha estudiado el efecto del aptámero apHAT610 sobre el ciclo celular y la apoptosis. Por los resultados obtenidos, se puede concluir que existe una reducción de la proliferación debido principalmente a la inducción de apoptosis mediada por caspasa 3 (**Figura 31**) en las 3 líneas celulares, siendo más evidente en las células H1650. Asimismo, no se puede desechar la idea de que se produzca también una inhibición de la proliferación celular, ya que los ensayos realizados con citometría de flujo sugieren que las 3 líneas celulares sufren una parada del ciclo celular en las fases S y G2/M (**Figura 30**). En células de cáncer escamoso de esófago, se ha demostrado que la inhibición de HAT1 causa un bloqueo del ciclo celular en G2/M, y se plantea la utilidad de HAT1 como diana terapéutica en este tipo de tumores (Xue et al. 2014). En células epiteliales mamarias inmortalizadas, la depleción de HAT1 induce una parada del ciclo en G1/S (Gruber et al. 2019). La inhibición de EGFR conduce a una parada del ciclo en fases G1 o G2/M (Li et al. 2015; Steen et al. 2017). La combinación de uno de sus inhibidores, erlotinib, con enzastaurina, un inhibidor de la PKC- $\beta$ 2 (Protein Kinase C  $\beta$ 2), causa la acumulación de las células A549 y H1650 en las fases S y G2/M, siendo mayor en las células H1650 (Steen et al. 2017). Uno de los efectos de esta sinergia es la disminución de la actividad de CK2 (Casein Kinase 2), una quinasa que fosforila HAT1 (Rusin et al. 2017), y que tiene diversas funciones en la regulación de la proliferación celular, (Yde et al. 2008; Roffey and Litchfield 2021). Nuestro aptámero inhibidor de HAT1 presenta unos efectos similares a esta

combinación de fármacos, y sería interesante analizar si afecta a la fosforilación de HAT1 por CK2, bloqueando el sitio de unión de esta quinasa. Podría ser que apHAT610 estuviera provocando una parada efectiva en estos puntos del ciclo celular, pero es necesario realizar estudios previa sincronización del ciclo celular, ya que, además, la duración del ciclo y de sus distintas fases en cada una de las líneas celulares es diferente, y los ciclos largos de las células H1650 (40-42 horas) y SW900 (52 horas) dificultan el estudio en cultivos no sincronizados.

Otro de los procesos implicados en el desarrollo de tumores es la actividad clonogénica de las células cancerígenas y, como muestran los resultados (**Figura 32**), el aptámero apHAT610 es capaz de inhibir la formación de colonias en las 3 líneas celulares de cáncer de pulmón estudiadas. Este resultado indica que la célula tratada con el aptámero pierde, o ve disminuida, su capacidad de dividirse de forma ilimitada, característica intrínseca de las células tumorales (Hanahan and Weinberg 2011).

Cuando las células se tratan con el aptámero apHAT610 a la concentración establecida (2 x IC50) se aprecia una reducción de los niveles de HAT1 en las 3 líneas celulares 24 horas postransfección de manera estadísticamente significativa, al igual que una disminución de los niveles de acetilación de la histona H4, también estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se analizan estos valores 72 horas después de la transfección, tanto los niveles de HAT1 como los de acetilación de la histona H4 se reestablecen, aunque en las células H1650 no se llegan a normalizar. Estos resultados indican que, cuando el aptámero se empieza a degradar, las células vuelven a su actividad, aunque muchas de ellas no son capaces de sobrevivir hasta ese momento, como indican las imágenes de las células tomadas a las 72 horas postransfección que se muestran en la **Figura 29** de resultados, en las que se aprecia una disminución muy notoria del número de células entre el control y el tratamiento en las células H1650. Esta disminución coincide con los estudios de Steen y colaboradores, en los que la combinación de erlotinib con enzastaurina produce un efecto mayor en las células H1650 que en las A549 (Steen et al. 2017). Además, tanto la inducción de la apoptosis como la inhibición de la actividad clonogénica producida por apHAT610 son más evidentes en las células H1650 que en las otras dos líneas estudiadas. Podría ser incluso que los niveles de HAT1 y de acetilación de la histona H4 a las 72 horas no se hayan reestablecido del todo debido a que, aunque apHAT610 ya se haya degradado, las células se encuentren en un estado degradativo irreversible. Para confirmar esto sería interesante hacer estos ensayos a tiempos más largos.

Los niveles de ARN mensajero de HAT1 en las células tratadas con apHAT610 se han medido 24 horas postransfección, y no han mostrado grandes diferencias con los niveles en

células control en las líneas A549 y H1650. Este resultado indica que en estas líneas el aptámero no afecta a la transcripción de HAT1, sino que se deben producir modificaciones postraduccionales. Sin embargo, se observa que en células SW900 tratadas con apHAT610 hay un aumento significativo de los niveles de ARN mensajero. Este hecho podría ser debido a un efecto compensatorio de la célula, que produce mayor cantidad de HAT1 al ver disminuidos sus niveles de proteína. Por tanto, parece claro poder afirmar que el aptámero apHAT610 a la concentración utilizada no ejerce una acción directa sobre el promotor del gen de HAT1, sino que su inhibición es a nivel postraducciona.

Una vez analizados y discutidos todos los resultados obtenidos, se puede concluir que el aptámero apHAT610 resulta ser un inhibidor efectivo de la diana para la que ha sido seleccionado, la histona acetiltransferasa 1, tanto *in vitro* como en modelos celulares de cáncer de pulmón. Si se compara con los 2 inhibidores nombrados anteriormente se confirma dicha premisa, ya que tiene una alta afinidad por su diana, al igual que el inhibidor bisustrato (28.11 nM para apHAT610 y 1.1 nM para H4K12CoA) (Ngo et al. 2019), e inhibe el crecimiento de las 3 líneas celulares de cáncer de pulmón en el rango nanomolar bajo, frente al rango micromolar que presenta el análogo de la riboflavina (IC50 entre 9.12 y 27.09 nM para apHAT610 e inhibición del 69% a 100  $\mu$ M para JG-2016) (Gruber et al. 2021).

A pesar de todos estos datos, todavía queda mucho por conocer acerca del papel que desempeña la enzima HAT1, y del efecto del aptámero apHAT610 sobre ésta. Es por ello que se hace necesario continuar con una investigación en profundidad que descubra nuevos papeles y nuevas limitaciones de esta diana terapéutica, para así poder controlar de manera efectiva su regulación en las diferentes patologías.

Dentro de las líneas a seguir en el laboratorio, es necesario continuar con el estudio y la validación de apHAT610 no solo en cultivos celulares sino también en modelos animales. Además de todos los ensayos propuestos a lo largo de esta discusión, sería muy interesante también realizar experimentos para ver el sitio de unión del aptámero a la proteína, de cara a optimizar la molécula y estudiar su mecanismo de acción. Como herramienta para la inhibición temporal de HAT1, este aptámero podría ser de utilidad para el desarrollo de estudios encaminados a dilucidar el papel fisiológico de esta enzima, y su implicación en diversas situaciones patológicas, incluido el cáncer. Considerando HAT1 como posible diana terapéutica, apHAT610 podría constituir una herramienta valiosa para el diseño de nuevas combinaciones farmacológicas que ayuden a solventar el problema de la resistencia a agentes antineoplásicos como los inhibidores de EGFR, o las terapias dirigidas a evitar el escape de las células tumorales ante el sistema inmunitario. En este sentido, sería interesante analizar el efecto de la inhibición de HAT1 en algunos de los biomarcadores descritos, como TLR4

(Zhang et al. 2020), el receptor de andrógenos (Hong et al. 2021), EGF (Gruber et al. 2019), o PD-L1 (Fan et al. 2019). A nivel experimental, es necesario explorar la inhibición de HAT1 como tratamiento adyuvante de terapias inmunomoduladoras, para lo que apHAT610 podría ser de gran utilidad.

## **CONCLUSIONES**



1. La proteína HAT1 es una potencial diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de pulmón, entre otras patologías, ya que existe una correlación positiva entre la sobreexpresión de esta proteína y el desarrollo de la enfermedad.
2. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por NGS muestra una evolución de la población de aptámeros hacia 4 grupos bien diferenciados con una alta similitud dentro de cada clúster. Además, tanto los resultados obtenidos mediante clonaje y secuenciación Sanger como por NGS son coincidentes, identificando a los aptámeros apHAT63 y apHAT610 como los más representados, lo que valida el uso de ambas estrategias en el proceso de selección de aptámeros.
3. Tras el proceso de selección, optimización y caracterización de aptámeros, se ha observado que 3 de ellos (apHAT63, apHAT610 y apHAT63T) reconocen HAT1 con una alta afinidad y especificidad, de los que apHAT63T y apHAT610 son capaces de inhibir la actividad acetil transferasa de HAT1, siendo los principales candidatos a mostrar actividad terapéutica.
4. Los estudios en cultivos celulares muestran que el aptámero apHAT610 presenta una IC50 en el rango nanomolar en las 3 líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas, induciendo apoptosis y parada en el ciclo celular, e inhibiendo la formación de colonias. Además, también muestra efectos inhibitorios de la actividad HAT1, promoviendo tanto una disminución de la acetilación de la histona H4 como de los niveles de proteína HAT1. Todos estos resultados postulan al aptámero apHAT610 en un potencial fármaco para el tratamiento del cáncer de pulmón.





## **BIBLIOGRAFÍA**



---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adams, C. R., and R. T. Kamakaka. 1999. 'Chromatin assembly: biochemical identities and genetic redundancy', *Curr Opin Genet Dev*, 9: 185-90.
- Agudelo Garcia, P. A., M. E. Hoover, P. Zhang, P. Nagarajan, M. A. Freitas, and M. R. Parthun. 2017. 'Identification of multiple roles for histone acetyltransferase 1 in replication-coupled chromatin assembly', *Nucleic Acids Res*, 45: 9319-35.
- Agudelo Garcia, P. A., C. M. Lovejoy, P. Nagarajan, D. Park, L. V. Popova, M. A. Freitas, and M. R. Parthun. 2020. 'Histone acetyltransferase 1 is required for DNA replication fork function and stability', *J Biol Chem*, 295: 8363-73.
- Agudelo Garcia, P. A., P. Nagarajan, and M. R. Parthun. 2020. 'Hat1-Dependent Lysine Acetylation Targets Diverse Cellular Functions', *J Proteome Res*, 19: 1663-73.
- Ahmad, A., Y. Takami, and T. Nakayama. 2000. 'Distinct regions of the chicken p46 polypeptide are required for its in vitro interaction with histones H2B and H4 and histone acetyltransferase-1', *Biochem Biophys Res Commun*, 279: 95-102.
- Ai, X., and M. R. Parthun. 2004. 'The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly', *Mol Cell*, 14: 195-205.
- Aira, C., J. I. Klett-Mingo, T. Ruiz, A. Garcia-Sacristan, G. E. Martin-Valls, E. Mateu, J. Gomez-Laguna, P. Rueda, V. M. Gonzalez, M. J. Rodriguez, and L. Lopez. 2021. 'Development of an antigen Enzyme-Linked AptaSorbent Assay (ELASA) for the detection of swine influenza virus in field samples', *Anal Chim Acta*, 1181: 338933.
- Alshaer, W., H. Hillaireau, and E. Fattal. 2018. 'Aptamer-guided nanomedicines for anticancer drug delivery', *Adv Drug Deliv Rev*, 134: 122-37.
- Altmayer, S., N. Verma, M. Z. Francisco, R. F. Almeida, T. L. Mohammed, and B. Hochegger. 2020. 'Classification and Imaging Findings of Lung Neoplasms', *Semin Roentgenol*, 55: 41-50.
- Aran, D., R. Camarda, J. Odegaard, H. Paik, B. Oskotsky, G. Krings, A. Goga, M. Sirota, and A. J. Butte. 2017. 'Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes', *Nat Commun*, 8: 1077.
- Araz, M., and M. Karakurt Eryilmaz. 2021. 'Immunotherapy era in the treatment of small cell lung cancer', *Med Oncol*, 38: 86.

- Balogh, Z., G. Lautner, V. Bardoczy, B. Komorowska, R. E. Gyurcsanyi, and T. Meszaros. 2010. 'Selection and versatile application of virus-specific aptamers', *FASEB J*, 24: 4187-95.
- Barman, H. K., Y. Takami, H. Nishijima, K. Shibahara, F. Sanematsu, and T. Nakayama. 2008. 'Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 containing complex', *Biochem Biophys Res Commun*, 373: 624-30.
- Barman, H. K., Y. Takami, T. Ono, H. Nishijima, F. Sanematsu, K. Shibahara, and T. Nakayama. 2006. 'Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 345: 1547-57.
- Bates, P. J., J. B. Kahlon, S. D. Thomas, J. O. Trent, and D. M. Miller. 1999. 'Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding', *J Biol Chem*, 274: 26369-77.
- Benson, L. J., J. A. Phillips, Y. Gu, M. R. Parthun, C. S. Hoffman, and A. T. Annunziato. 2007. 'Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair', *J Biol Chem*, 282: 836-42.
- Berens, C., A. Thain, and R. Schroeder. 2001. 'A tetracycline-binding RNA aptamer', *Bioorg Med Chem*, 9: 2549-56.
- Blank, M. 2016. 'Next-Generation Analysis of Deep Sequencing Data: Bringing Light into the Black Box of SELEX Experiments', *Methods Mol Biol*, 1380: 85-95.
- Bock, C., M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, M. N. Hurst, G. M. Husar, D. Miller, R. Ostroff, H. Petach, D. Schneider, B. Vant-Hull, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, and D. Zichi. 2004. 'Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis', *Proteomics*, 4: 609-18.
- Boltengagen, M., A. Huang, A. Boltengagen, L. Trixl, H. Lindner, L. Kremser, M. Offterdinger, and A. Lusser. 2016. 'A novel role for the histone acetyltransferase Hat1 in the CENP-A/CID assembly pathway in *Drosophila melanogaster*', *Nucleic Acids Res*, 44: 2145-59.
- Bridgeman, S. C., G. C. Ellison, P. E. Melton, P. Newsholme, and C. D. S. Mamotte. 2018. 'Epigenetic effects of metformin: From molecular mechanisms to clinical implications', *Diabetes Obes Metab*, 20: 1553-62.

- Brody, E. N., M. C. Willis, J. D. Smith, S. Jayasena, D. Zichi, and L. Gold. 1999. 'The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics', *Mol Diagn*, 4: 381-8.
- Brownell, J. E., and C. D. Allis. 1996. 'Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation', *Curr Opin Genet Dev*, 6: 176-84.
- Bugide, S., K. R. Parajuli, S. Chava, R. Pattanayak, D. L. D. Manna, D. Shrestha, E. S. Yang, G. Cai, D. B. Johnson, and R. Gupta. 2020. 'Loss of HAT1 expression confers BRAFV600E inhibitor resistance to melanoma cells by activating MAPK signaling via IGF1R', *Oncogenesis*, 9: 44.
- Buglak, A. A., A. V. Samokhvalov, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev. 2020. 'Methods and Applications of In Silico Aptamer Design and Modeling', *Int J Mol Sci*, 21.
- Bulusu, V., S. Tumanov, E. Michalopoulou, N. J. van den Broek, G. MacKay, C. Nixon, S. Dhayade, Z. T. Schug, J. Vande Voorde, K. Blyth, E. Gottlieb, A. Vazquez, and J. J. Kamphorst. 2017. 'Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation', *Cell Rep*, 18: 647-58.
- Burgess, R. J., H. Zhou, J. Han, and Z. Zhang. 2010. 'A role for Gcn5 in replication-coupled nucleosome assembly', *Mol Cell*, 37: 469-80.
- Campos, E. I., J. Fillingham, G. Li, H. Zheng, P. Voigt, W. H. Kuo, H. Seepany, Z. Gao, L. A. Day, J. F. Greenblatt, and D. Reinberg. 2010. 'The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4', *Nat Struct Mol Biol*, 17: 1343-51.
- Capra, J. A., K. Paeschke, M. Singh, and V. A. Zakian. 2010. 'G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS Comput Biol*, 6: e1000861.
- Carafa, V., A. Nebbioso, F. Cuomo, D. Rotili, G. Cobellis, P. Bontempo, A. Baldi, E. P. Spugnini, G. Citro, A. Chambery, R. Russo, M. Ruvo, P. Ciana, L. Maravigna, J. Shaik, E. Radaelli, P. De Antonellis, D. Tarantino, A. Pirolli, R. Ragno, M. Zollo, H. G. Stunnenberg, A. Mai, and L. Altucci. 2018. 'RIP1-HAT1-SIRT Complex Identification and Targeting in Treatment and Prevention of Cancer', *Clin Cancer Res*, 24: 2886-900.
- Chakravarthy, U. 2006. 'Age related macular degeneration', *BMJ*, 333: 869-70.

- Chen, F., J. Zhou, F. Luo, A. B. Mohammed, and X. L. Zhang. 2007. 'Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*', *Biochem Biophys Res Commun*, 357: 743-8.
- Chrun, E. S., F. Modolo, D. Vieira, A. Borges-Junior, R. G. Castro, and F. I. Daniel. 2017. 'Immunoexpression of HDAC1, HDAC2, and HAT1 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma', *Oral Dis*, 23: 505-10.
- Civit, L., S. M. Taghdisi, A. Jonczyk, S. K. Hassel, C. Grober, M. Blank, H. J. Stunden, M. Beyer, J. Schultze, E. Latz, and G. Mayer. 2018. 'Systematic evaluation of cell-SELEX enriched aptamers binding to breast cancer cells', *Biochimie*, 145: 53-62.
- Comerford, S. A., Z. Huang, X. Du, Y. Wang, L. Cai, A. K. Witkiewicz, H. Walters, M. N. Tantawy, A. Fu, H. C. Manning, J. D. Horton, R. E. Hammer, S. L. McKnight, and B. P. Tu. 2014. 'Acetate dependence of tumors', *Cell*, 159: 1591-602.
- Cruz-Aguado, J. A., and G. Penner. 2008. 'Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer', *J Agric Food Chem*, 56: 10456-61.
- Dannah, N. S., S. Nabeel-Shah, C. F. Kurat, S. A. Sabatinos, and J. Fillingham. 2018. 'Functional Analysis of Hif1 Histone Chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*', *G3 (Bethesda)*, 8: 1993-2006.
- Darfeuille, F., J. B. Hansen, H. Orum, C. Di Primo, and J. J. Toulme. 2004. 'LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1', *Nucleic Acids Res*, 32: 3101-7.
- Darfeuille, F., S. Reigadas, J. B. Hansen, H. Orum, C. Di Primo, and J. J. Toulme. 2006. 'Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides', *Biochemistry*, 45: 12076-82.
- Davis, J. P., N. Janjic, B. E. Javornik, and D. A. Zichi. 1996. 'Identifying consensus patterns and secondary structure in SELEX sequence sets', *Methods Enzymol*, 267: 302-14.
- de Oliveira, M., M. T. De Sibio, L. S. Mathias, B. M. Rodrigues, M. E. Sakalem, and C. R. Nogueira. 2020. 'Irisin modulates genes associated with severe coronavirus disease (COVID-19) outcome in human subcutaneous adipocytes cell culture', *Mol Cell Endocrinol*, 515: 110917.
- Demyanenko, S., and A. Uzdensky. 2019. 'Epigenetic Alterations Induced by Photothrombotic Stroke in the Rat Cerebral Cortex: Deacetylation of Histone h3, Upregulation of Histone Deacetylases and Histone Acetyltransferases', *Int J Mol Sci*, 20.

- Demyanenko, S. V., V. A. Dzreyan, and A. B. Uzdensky. 2020. 'The Expression and Localization of Histone Acetyltransferases HAT1 and PCAF in Neurons and Astrocytes of the Photothrombotic Stroke-Induced Penumbra in the Rat Brain Cortex', *Mol Neurobiol*, 57: 3219-27.
- Denizot, F., and R. Lang. 1986. 'Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability', *J Immunol Methods*, 89: 271-7.
- Devi, S., N. Sharma, T. Ahmed, Z. I. Huma, S. Kour, B. Sahoo, A. K. Singh, N. Macesic, S. J. Lee, and M. K. Gupta. 2021. 'Aptamer-based diagnostic and therapeutic approaches in animals: Current potential and challenges', *Saudi J Biol Sci*, 28: 5081-93.
- Dong, Y., Y. Xu, W. Yong, X. Chu, and D. Wang. 2014. 'Aptamer and its potential applications for food safety', *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54: 1548-61.
- Dose, A., S. Liokatis, F. X. Theillet, P. Selenko, and D. Schwarzer. 2011. 'NMR profiling of histone deacetylase and acetyl-transferase activities in real time', *ACS Chem Biol*, 6: 419-24.
- Driscoll, R., A. Hudson, and S. P. Jackson. 2007. 'Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56', *Science*, 315: 649-52.
- Drolet, D. W., L. Moon-McDermott, and T. S. Romig. 1996. 'An enzyme-linked oligonucleotide assay', *Nat Biotechnol*, 14: 1021-5.
- Dutnall, R. N., S. T. Tafrov, R. Sternglanz, and V. Ramakrishnan. 1998. 'Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily', *Cell*, 94: 427-38.
- Eberharter, A., T. Lechner, M. Goralik-Schramel, and P. Loidl. 1996. 'Purification and characterization of the cytoplasmic histone acetyltransferase B of maize embryos', *FEBS Lett*, 386: 75-81.
- Eisenstein, M. 2020. 'New lung-cancer drugs extend survival times', *Nature*, 587: S10-S12.
- Ejlassi-Lassalette, A., E. Mocquard, M. C. Arnaud, and C. Thiriet. 2011. 'H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo', *Mol Biol Cell*, 22: 245-55.
- Ekert, J. E., K. Johnson, B. Strake, J. Pardinias, S. Jarantow, R. Perkinson, and D. C. Colter. 2014. 'Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic

compound responsiveness in vitro--implication for drug development', *PLoS One*, 9: e92248.

Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1990. 'In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands', *Nature*, 346: 818-22.

Espindola, M. S., L. S. Soares, L. J. Galvao-Lima, F. A. Zambuzi, M. C. Cacemiro, V. S. Brauer, C. M. Marzocchi-Machado, M. de Souza Gomes, L. R. Amaral, O. A. Martins-Filho, V. R. Bollela, and F. G. Frantz. 2018. 'Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection', *Sci Rep*, 8: 5505.

Evstyukhina, T. A., E. A. Alekseeva, D. V. Fedorov, V. T. Peshekhonov, and V. G. Korolev. 2021. 'Genetic Analysis of the Hsm3 Protein Function in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* NuB4 Complex', *Genes (Basel)*, 12.

Fan, P., J. Zhao, Z. Meng, H. Wu, B. Wang, H. Wu, and X. Jin. 2019. 'Overexpressed histone acetyltransferase 1 regulates cancer immunity by increasing programmed death-ligand 1 expression in pancreatic cancer', *J Exp Clin Cancer Res*, 38: 47.

Fernandez, G., A. Moraga, M. I. Cuartero, A. Garcia-Culebras, C. Pena-Martinez, J. M. Pradillo, M. Hernandez-Jimenez, S. Sacristan, M. I. Ayuso, R. Gonzalo-Gobernado, D. Fernandez-Lopez, M. E. Martin, M. A. Moro, V. M. Gonzalez, and I. Lizasoain. 2018. 'TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models', *Mol Ther*, 26: 2047-59.

Ferreira, C. S., K. Papamichael, G. Guilbault, T. Schwarzacher, J. Gariepy, and S. Missailidis. 2008. 'DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours', *Anal Bioanal Chem*, 390: 1039-50.

Fillingham, J., J. Recht, A. C. Silva, B. Suter, A. Emili, I. Stagljar, N. J. Krogan, C. D. Allis, M. C. Keogh, and J. F. Greenblatt. 2008. 'Chaperone control of the activity and specificity of the histone H3 acetyltransferase Rtt109', *Mol Cell Biol*, 28: 4342-53.

Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree. 2006. 'Clonogenic assay of cells in vitro', *Nat Protoc*, 1: 2315-9.

Frezza, V., C. Pinto-Diez, G. Fernandez, M. Soto, M. E. Martin, A. Garcia-Sacristan, and V. M. Gonzalez. 2020. 'DNA aptamers targeting *Leishmania infantum* H3 protein as potential diagnostic tools', *Anal Chim Acta*, 1107: 155-63.



- Fukuoka, J., T. Fujii, J. H. Shih, T. Dracheva, D. Meerzaman, A. Player, K. Hong, S. Settnik, A. Gupta, K. Buetow, S. Hewitt, W. D. Travis, and J. Jen. 2004. 'Chromatin remodeling factors and BRM/BRG1 expression as prognostic indicators in non-small cell lung cancer', *Clin Cancer Res*, 10: 4314-24.
- Garcia-Recio, E. M., C. Pinto-Diez, M. I. Perez-Morgado, M. Garcia-Hernandez, G. Fernandez, M. E. Martin, and V. M. Gonzalez. 2016. 'Characterization of MNK1b DNA Aptamers That Inhibit Proliferation in MDA-MB231 Breast Cancer Cells', *Mol Ther Nucleic Acids*, 5: e275.
- Gazdar, A. F., P. A. Bunn, and J. D. Minna. 2017. 'Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward', *Nat Rev Cancer*, 17: 725-37.
- Ge, Z., H. Wang, and M. R. Parthun. 2011. 'Nuclear Hat1p complex (NuB4) components participate in DNA repair-linked chromatin reassembly', *J Biol Chem*, 286: 16790-9.
- Gonzalez, V. M., M. E. Martin, G. Fernandez, and A. Garcia-Sacristan. 2016. 'Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses', *Pharmaceuticals (Basel)*, 9.
- Grate, D., and C. Wilson. 2001. 'Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex', *Bioorg Med Chem*, 9: 2565-70.
- Gruber, J. J., B. Geller, A. M. Lipchik, J. Chen, A. A. Salahudeen, A. N. Ram, J. M. Ford, C. J. Kuo, and M. P. Snyder. 2019. 'HAT1 Coordinates Histone Production and Acetylation via H4 Promoter Binding', *Mol Cell*, 75: 711-24 e5.
- Gruber, Joshua J., Amithvikram Rangarajan, Tristan Chou, Benjamin S. Geller, Selene Banuelos, Robert Greenhouse, Michael P. Snyder, and Andrew M. Lipchik. 2021. 'An acetyl-click screening platform identifies a small molecule inhibitor of Histone Acetyltransferase 1 (HAT1) with anti-tumor activity', *bioRxiv*: 2021.06.25.449993.
- Guerra-Perez, N., E. Ramos, M. Garcia-Hernandez, C. Pinto, M. Soto, M. E. Martin, and V. M. Gonzalez. 2015. 'Molecular and Functional Characterization of ssDNA Aptamers that Specifically Bind *Leishmania infantum* PABP', *PLoS One*, 10: e0140048.
- Gunjan, A., and A. Verreault. 2003. 'A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*', *Cell*, 115: 537-49.
- Haigney, A., M. D. Ricketts, and R. Marmorstein. 2015. 'Dissecting the Molecular Roles of Histone Chaperones in Histone Acetylation by Type B Histone Acetyltransferases (HAT-B)', *J Biol Chem*, 290: 30648-57.

- Hamamoto, J., H. Yasuda, Y. Nonaka, M. Fujiwara, Y. Nakamura, K. Soejima, and T. Betsuyaku. 2018. 'The FGF2 aptamer inhibits the growth of FGF2-FGFR pathway driven lung cancer cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 503: 1330-34.
- Han, J., H. Zhou, B. Horazdovsky, K. Zhang, R. M. Xu, and Z. Zhang. 2007. 'Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication', *Science*, 315: 653-5.
- Han, N., L. Shi, Q. Guo, W. Sun, Y. Yu, L. Yang, X. Zhang, and M. Zhang. 2017. 'HAT1 induces lung cancer cell apoptosis via up regulating Fas', *Oncotarget*, 8: 89970-77.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Haruta, K., N. Otaki, M. Nagamine, T. Kayo, A. Sasaki, S. Hiramoto, M. Takahashi, K. Hota, H. Sato, and H. Yamazaki. 2017. 'A Novel PEGylation Method for Improving the Pharmacokinetic Properties of Anti-Interleukin-17A RNA Aptamers', *Nucleic Acid Ther*, 27: 36-44.
- Helbig, K. J., J. M. Carr, J. K. Calvert, S. Wati, J. N. Clarke, N. S. Eyre, S. K. Narayana, G. N. Fiches, E. M. McCartney, and M. R. Beard. 2013. 'Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin', *PLoS Negl Trop Dis*, 7: e2178.
- Helbig, K. J., D. T. Lau, L. Semendric, H. A. Harley, and M. R. Beard. 2005. 'Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector', *Hepatology*, 42: 702-10.
- Herbst, R. S., D. Morgensztern, and C. Boshoff. 2018. 'The biology and management of non-small cell lung cancer', *Nature*, 553: 446-54.
- Hermann, T., and D. J. Patel. 2000. 'Adaptive recognition by nucleic acid aptamers', *Science*, 287: 820-5.
- Hoffmann, G., A. Samel-Pommerencke, J. Weber, A. Cuomo, T. Bonaldi, and A. E. Ehrenhofer-Murray. 2018. 'A role for CENP-A/Cse4 phosphorylation on serine 33 in deposition at the centromere', *FEMS Yeast Res*, 18.
- Hofmann, H. P., S. Limmer, V. Hornung, and M. Sprinzl. 1997. 'Ni<sup>2+</sup>-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair', *RNA*, 3: 1289-300.
- Hong, Z., Z. Xiang, P. Zhang, Q. Wu, C. Xu, X. Wang, G. Shi, Z. Hong, and D. Wu. 2021. 'Histone acetyltransferase 1 upregulates androgen receptor expression to modulate CRPC cell resistance to enzalutamide', *Clin Transl Med*, 11: e495.

- Hou, X., J. Liu, Z. Zhang, Y. Zhai, Y. Wang, Z. Wang, B. Tang, X. Zhang, L. Sun, and Z. Li. 2016. 'Effects of cytochalasin B on DNA methylation and histone modification in parthenogenetically activated porcine embryos', *Reproduction*, 152: 519-27.
- Huang, Y. F., H. T. Chang, and W. Tan. 2008. 'Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods', *Anal Chem*, 80: 567-72.
- Hybarger, G., J. Bynum, R. F. Williams, J. J. Valdes, and J. P. Chambers. 2006. 'A microfluidic SELEX prototype', *Anal Bioanal Chem*, 384: 191-8.
- Imhof, A., and A. P. Wolffe. 1999. 'Purification and properties of the Xenopus Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus', *Biochemistry*, 38: 13085-93.
- Ismail, S. I., and W. Alshaer. 2018. 'Therapeutic aptamers in discovery, preclinical and clinical stages', *Adv Drug Deliv Rev*, 134: 51-64.
- Jayasena, S. D. 1999. 'Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics', *Clin Chem*, 45: 1628-50.
- Jin, X., S. Tian, and P. Li. 2017. 'Histone Acetyltransferase 1 Promotes Cell Proliferation and Induces Cisplatin Resistance in Hepatocellular Carcinoma', *Oncol Res*, 25: 939-46.
- Kalra, P., A. Dhiman, W. C. Cho, J. G. Bruno, and T. K. Sharma. 2018. 'Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity', *Front Mol Biosci*, 5: 41.
- Kamphorst, J. J., M. K. Chung, J. Fan, and J. D. Rabinowitz. 2014. 'Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate', *Cancer Metab*, 2: 23.
- Kang, K. A., M. J. Piao, Y. S. Ryu, H. K. Kang, W. Y. Chang, Y. S. Keum, and J. W. Hyun. 2016. 'Interaction of DNA demethylase and histone methyltransferase upregulates Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells', *Oncotarget*, 7: 40594-620.
- Karimpour, M., R. Ravanbakhsh, M. Maydanchi, A. Rajabi, F. Azizi, and A. Saber. 2021. 'Cancer driver gene and non-coding RNA alterations as biomarkers of brain metastasis in lung cancer: A review of the literature', *Biomed Pharmacother*, 143: 112190.
- Kaur, H., J. G. Bruno, A. Kumar, and T. K. Sharma. 2018. 'Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines', *Theranostics*, 8: 4016-32.

- Kaur, H., M. Shorie, and P. Sabherwal. 2020. 'Bilayer interferometry-SELEX for Shiga toxin antigenic-peptide aptamers & detection via chitosan-WSe<sub>2</sub> aptasensor', *Biosens Bioelectron*, 167: 112498.
- Keefe, A. D., S. Pai, and A. Ellington. 2010. 'Aptamers as therapeutics', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 537-50.
- Kelly, T. J., S. Qin, D. E. Gottschling, and M. R. Parthun. 2000. 'Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing', *Mol Cell Biol*, 20: 7051-8.
- Kim, H. S., R. Mukhopadhyay, S. B. Rothbart, A. C. Silva, V. Vanoosthuyse, E. Radovani, T. Kislinger, A. Roguev, C. J. Ryan, J. Xu, H. Jahari, K. G. Hardwick, J. F. Greenblatt, N. J. Krogan, J. S. Fillingham, B. D. Strahl, E. E. Bouhassira, W. Edelman, and M. C. Keogh. 2014. 'Identification of a BET family bromodomain/casein kinase II/TAF-containing complex as a regulator of mitotic condensin function', *Cell Rep*, 6: 892-905.
- Kleff, S., E. D. Andrulis, C. W. Anderson, and R. Sternglanz. 1995. 'Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase', *J Biol Chem*, 270: 24674-7.
- Klingberg, R., J. O. Jost, M. Schumann, K. A. Gelato, W. Fischle, E. Krause, and D. Schwarzer. 2015. 'Analysis of phosphorylation-dependent protein-protein interactions of histone h3', *ACS Chem Biol*, 10: 138-45.
- Kolm, C., I. Cervenka, U. J. Aschl, N. Baumann, S. Jakwerth, R. Krska, R. L. Mach, R. Sommer, M. C. DeRosa, A. K. T. Kirschner, A. H. Farnleitner, and G. H. Reischer. 2020. 'DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing', *Sci Rep*, 10: 20917.
- Kong, H. Y., and J. Byun. 2013. 'Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science', *Biomol Ther (Seoul)*, 21: 423-34.
- Korrodi-Gregorio, L., V. Soto-Cerrato, R. Vitorino, M. Fardilha, and R. Perez-Tomas. 2016. 'From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research', *PLoS One*, 11: e0165973.
- Krylov, S. N. 2006. 'Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM): A novel method for biomolecular screening', *J Biomol Screen*, 11: 115-22.
- Kwok, C. K., and C. J. Merrick. 2017. 'G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application', *Trends Biotechnol*, 35: 997-1013.

- Langevin, S. M., R. A. Kratzke, and K. T. Kelsey. 2015. 'Epigenetics of lung cancer', *Transl Res*, 165: 74-90.
- Lao, Y. H., K. K. Phua, and K. W. Leong. 2015. 'Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation', *ACS Nano*, 9: 2235-54.
- Lebel, E. A., P. Boukamp, and S. T. Tafrov. 2010. 'Irradiation with heavy-ion particles changes the cellular distribution of human histone acetyltransferase HAT1', *Mol Cell Biochem*, 339: 271-84.
- Leontis, N. B., A. Lescoute, and E. Westhof. 2006. 'The building blocks and motifs of RNA architecture', *Curr Opin Struct Biol*, 16: 279-87.
- Li, J., H. Deng, M. Hu, Y. Fang, A. Vaughn, X. Cai, L. Xu, W. Wan, Z. Li, S. Chen, X. Yang, S. Wu, and J. Xiao. 2015. 'Inhibition of non-small cell lung cancer (NSCLC) growth by a novel small molecular inhibitor of EGFR', *Oncotarget*, 6: 6749-61.
- Li, Y., L. Zhang, T. Liu, C. Chai, Q. Fang, H. Wu, P. A. Agudelo Garcia, Z. Han, S. Zong, Y. Yu, X. Zhang, M. R. Parthun, J. Chai, R. M. Xu, and M. Yang. 2014. 'Hat2p recognizes the histone H3 tail to specify the acetylation of the newly synthesized H3/H4 heterodimer by the Hat1p/Hat2p complex', *Genes Dev*, 28: 1217-27.
- Lietard, J., H. Abou Assi, I. Gomez-Pinto, C. Gonzalez, M. M. Somoza, and M. J. Damha. 2017. 'Mapping the affinity landscape of Thrombin-binding aptamers on 2F-ANA/DNA chimeric G-Quadruplex microarrays', *Nucleic Acids Res*, 45: 1619-32.
- Lin, C. Y., A. Chao, R. C. Wu, L. Y. Lee, S. H. Ueng, C. L. Tsai, Y. S. Lee, M. T. Peng, L. Y. Yang, H. J. Huang, H. S. Wang, and C. H. Lai. 2020. 'Synergistic effects of pazopanib and hyperthermia against uterine leiomyosarcoma growth mediated by downregulation of histone acetyltransferase 1', *J Mol Med (Berl)*, 98: 1175-88.
- Lin, P. H., C. W. Tsai, J. W. Wu, R. C. Ruaan, and W. Y. Chen. 2012. 'Molecular dynamics simulation of the induced-fit binding process of DNA aptamer and L-argininamide', *Biotechnol J*, 7: 1367-75.
- Liss, M., B. Petersen, H. Wolf, and E. Prohaska. 2002. 'An aptamer-based quartz crystal protein biosensor', *Anal Chem*, 74: 4488-95.
- Liu, D., M. Zhang, W. Xie, G. Lan, H. P. Cheng, D. Gong, C. Huang, Y. C. Lv, F. Yao, Y. L. Tan, L. Li, X. L. Zheng, and C. K. Tang. 2016. 'MiR-486 regulates cholesterol efflux by targeting HAT1', *Biochem Biophys Res Commun*, 472: 418-24.

- Liu, H., M. Zhang, W. He, Z. Zhu, M. Teng, Y. Gao, and L. Niu. 2014. 'Structural insights into yeast histone chaperone Hif1: a scaffold protein recruiting protein complexes to core histones', *Biochem J*, 462: 465-73.
- Liu, J., T. Wei, J. Zhao, Y. Huang, H. Deng, A. Kumar, C. Wang, Z. Liang, X. Ma, and X. J. Liang. 2016. 'Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance', *Biomaterials*, 91: 44-56.
- Liu, X., C. Li, Q. Li, H. C. Chang, and Y. C. Tang. 2020. 'SIRT7 Facilitates CENP-A Nucleosome Assembly and Suppresses Intestinal Tumorigenesis', *iScience*, 23: 101461.
- Liu, X., Y. L. Wang, J. Wu, J. Qi, Z. Zeng, Q. Wan, Z. Chen, P. Manandhar, V. S. Cavener, N. R. Boyle, X. Fu, E. Salazar, S. V. Kuchipudi, V. Kapur, X. Zhang, M. Umetani, M. Sen, R. C. Willson, S. H. Chen, and Y. Zu. 2021. 'Neutralizing Aptamers Block S/RBD-ACE2 Interactions and Prevent Host Cell Infection', *Angew Chem Int Ed Engl*, 60: 10273-78.
- Long, B. H., S. T. Musial, and M. G. Brattain. 1986. 'DNA breakage in human lung carcinoma cells and nuclei that are naturally sensitive or resistant to etoposide and teniposide', *Cancer Res*, 46: 3809-16.
- Luo, Z., L. He, J. Wang, X. Fang, and L. Zhang. 2017. 'Developing a combined strategy for monitoring the progress of aptamer selection', *Analyst*, 142: 3136-39.
- Maier, K. E., and M. Levy. 2016. 'From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery', *Mol Ther Methods Clin Dev*, 5: 16014.
- Makowski, A. M., R. N. Dutnall, and A. T. Annunziato. 2001. 'Effects of acetylation of histone H4 at lysines 8 and 16 on activity of the Hat1 histone acetyltransferase', *J Biol Chem*, 276: 43499-502.
- Mallikaratchy, P., Z. Tang, S. Kwame, L. Meng, D. Shangguan, and W. Tan. 2007. 'Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells', *Mol Cell Proteomics*, 6: 2230-8.
- Marin, T. L., B. Gongol, F. Zhang, M. Martin, D. A. Johnson, H. Xiao, Y. Wang, S. Subramaniam, S. Chien, and J. Y. Shyy. 2017. 'AMPK promotes mitochondrial biogenesis and function by phosphorylating the epigenetic factors DNMT1, RBBP7, and HAT1', *Sci Signal*, 10.
- Marmorstein, R. 2001. 'Structure of histone acetyltransferases', *J Mol Biol*, 311: 433-44.

- Masud, M. M., M. Kuwahara, H. Ozaki, and H. Sawai. 2004. 'Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX', *Bioorg Med Chem*, 12: 1111-20.
- Mayer, G. 2009. 'The chemical biology of aptamers', *Angew Chem Int Ed Engl*, 48: 2672-89.
- Mayer, G., M. Blind, W. Nagel, T. Bohm, T. Knorr, C. L. Jackson, W. Kolanus, and M. Famulok. 2001. 'Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4961-5.
- Mendonça, S. D., and M. T. Bowser. 2004. 'In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis', *J Am Chem Soc*, 126: 20-1.
- Mersfelder, E. L., and M. R. Parthun. 2008. 'Involvement of Hat1p (Kat1p) catalytic activity and subcellular localization in telomeric silencing', *J Biol Chem*, 283: 29060-8.
- Miao, B. P., R. S. Zhang, G. Yang, J. J. Sun, Y. Y. Tang, W. F. Liang, T. Liu, Z. Wen, P. C. Yang, and G. H. Nie. 2018. 'Histone acetyltransferase 1 up regulates Bcl2L12 expression in nasopharyngeal cancer cells', *Arch Biochem Biophys*, 646: 72-79.
- Michaud, M., E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, and E. Peyrin. 2003. 'A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC', *J Am Chem Soc*, 125: 8672-9.
- Min, S. K., Y. H. Koh, Y. Park, H. J. Kim, J. Seo, H. R. Park, S. J. Cho, and I. S. Kim. 2012. 'Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas', *Korean J Pathol*, 46: 142-50.
- Miyamoto, N., H. Izumi, T. Noguchi, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, M. Shiota, A. Kidani, A. Tawara, and K. Kohno. 2008. 'Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance', *J Biol Chem*, 283: 18218-26.
- Mok, W., and Y. Li. 2008. 'Recent Progress in Nucleic Acid Aptamer-Based Biosensors and Bioassays', *Sensors (Basel)*, 8: 7050-84.
- Molina, J. R., P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, and A. A. Adjei. 2008. 'Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship', *Mayo Clin Proc*, 83: 584-94.
- Moreno, M., E. Rincon, D. Pineiro, G. Fernandez, A. Domingo, A. Jimenez-Ruiz, M. Salinas, and V. M. Gonzalez. 2003. 'Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process', *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 214-8.
- Morozov, D., V. Mironov, R. V. Moryachkov, I. A. Shchugoreva, P. V. Artyushenko, G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, T. N. Zamay, A. V. Krat, D. S. Molodenskiy, V. N. Zabluda,

- D. V. Veprintsev, A. E. Sokolov, R. A. Zukov, M. V. Berezovski, F. N. Tomilin, D. G. Fedorov, Y. Alexeev, and A. S. Kichkailo. 2021. 'The role of SAXS and molecular simulations in 3D structure elucidation of a DNA aptamer against lung cancer', *Mol Ther Nucleic Acids*, 25: 316-27.
- Muller, J., O. El-Maarri, J. Oldenburg, B. Potzsch, and G. Mayer. 2008. 'Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography', *Anal Bioanal Chem*, 390: 1033-7.
- Munzar, J. D., A. Ng, and D. Juncker. 2018. 'Comprehensive profiling of the ligand binding landscapes of duplexed aptamer families reveals widespread induced fit', *Nat Commun*, 9: 343.
- Murphy, M. B., S. T. Fuller, P. M. Richardson, and S. A. Doyle. 2003. 'An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification', *Nucleic Acids Res*, 31: e110.
- Mustafi, S., V. Camarena, C. H. Volmar, T. C. Huff, D. W. Sant, S. P. Brothers, Z. J. Liu, C. Wahlestedt, and G. Wang. 2018. 'Vitamin C Sensitizes Melanoma to BET Inhibitors', *Cancer Res*, 78: 572-83.
- Nagamori, I., V. A. Cruickshank, and P. Sassone-Corsi. 2011. 'Regulation of an RNA granule during spermatogenesis: acetylation of MVH in the chromatoid body of germ cells', *J Cell Sci*, 124: 4346-55.
- Nagarajan, P., P. A. Agudelo Garcia, C. C. Iyer, L. V. Popova, W. D. Arnold, and M. R. Parthun. 2019. 'Early-onset aging and mitochondrial defects associated with loss of histone acetyltransferase 1 (Hat1)', *Aging Cell*, 18: e12992.
- Nagarajan, P., Z. Ge, B. Sirbu, C. Doughty, P. A. Agudelo Garcia, M. Schlederer, A. T. Annunziato, D. Cortez, L. Kenner, and M. R. Parthun. 2013. 'Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4', *PLoS Genet*, 9: e1003518.
- Nasim, F., B. F. Sabath, and G. A. Eapen. 2019. 'Lung Cancer', *Med Clin North Am*, 103: 463-73.
- Nasr, N., S. Maddocks, S. G. Turville, A. N. Harman, N. Woolger, K. J. Helbig, J. Wilkinson, C. R. Bye, T. K. Wright, D. Rambukwelle, H. Donaghy, M. R. Beard, and A. L. Cunningham. 2012. 'HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production', *Blood*, 120: 778-88.



- Ngo, L., T. Brown, and Y. G. Zheng. 2019. 'Bisubstrate inhibitors to target histone acetyltransferase 1', *Chem Biol Drug Des*, 93: 865-73.
- Ni, S., H. Yao, L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A. Lu, and G. Zhang. 2017. 'Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes', *Int J Mol Sci*, 18.
- Nitsch, S., L. Zorro Shahidian, and R. Schneider. 2021. 'Histone acylations and chromatin dynamics: concepts, challenges, and links to metabolism', *EMBO Rep*, 22: e52774.
- Ogawa, N., and M. D. Biggin. 2012. 'High-throughput SELEX determination of DNA sequences bound by transcription factors in vitro', *Methods Mol Biol*, 786: 51-63.
- Olsen, J. V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann. 2006. 'Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks', *Cell*, 127: 635-48.
- Ospina, J. D. 2020. 'Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology', *Biomedica*, 40: 148-65.
- Park, K. S. 2018. 'Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections', *Biosens Bioelectron*, 102: 179-88.
- Parthun, M. R. 2007. 'Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase', *Oncogene*, 26: 5319-28.
- Parthun, M. R. 2012. 'Histone acetyltransferase 1: More than just an enzyme?', *Biochim Biophys Acta*, 1819: 256-63.
- Parthun, M. R., J. Widom, and D. E. Gottschling. 1996. 'The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism', *Cell*, 87: 85-94.
- Pendharkar, D., B. V. Ausekar, and S. Gupta. 2013. 'Molecular biology of lung cancer-a review', *Indian J Surg Oncol*, 4: 120-4.
- Pereira, R. L., I. C. Nascimento, A. P. Santos, I. E. Y. Ogusuku, C. Lameu, G. Mayer, and H. Ulrich. 2018. 'Aptamers: novelty tools for cancer biology', *Oncotarget*, 9: 26934-53.
- Phillip, C. J., C. K. Giardina, B. Bilir, D. J. Cutler, Y. H. Lai, O. Kucuk, and C. S. Moreno. 2012. 'Genistein cooperates with the histone deacetylase inhibitor vorinostat to induce cell death in prostate cancer cells', *BMC Cancer*, 12: 145.
- Pinto, B. G. G., A. E. R. Oliveira, Y. Singh, L. Jimenez, A. N. A. Goncalves, R. L. T. Ogawa, R. Creighton, J. P. Schatzmann Peron, and H. I. Nakaya. 2020. 'ACE2 Expression Is

- Increased in the Lungs of Patients With Comorbidities Associated With Severe COVID-19', *J Infect Dis*, 222: 556-63.
- Platella, C., C. Riccardi, D. Montesarchio, G. N. Roviello, and D. Musumeci. 2017. 'G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861: 1429-47.
- Pogribny, I. P., V. P. Tryndyak, L. Muskhelishvili, I. Rusyn, and S. A. Ross. 2007. 'Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis', *J Nutr*, 137: 216S-22S.
- Popova, Liudmila V., Prabakaran Nagarajan, Callie M. Lovejoy, Benjamin D. Sunkel, Miranda L. Gardner, Meng Wang, Michael A. Freitas, Benjamin Z. Stanton, and Mark R. Parthun. 2021. 'Epigenetic Regulation of Nuclear Lamina-Associated Heterochromatin by HAT1 and the Acetylation of Newly Synthesized Histones', *bioRxiv*: 2021.06.28.450212.
- Poveda, A., M. Pamblanco, S. Tafrov, V. Tordera, R. Sternglanz, and R. Sendra. 2004. 'Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus', *J Biol Chem*, 279: 16033-43.
- Poveda, A., and R. Sendra. 2008. 'Site specificity of yeast histone acetyltransferase B complex in vivo', *FEBS J*, 275: 2122-36.
- Pozziello, A., A. Nebbioso, H. G. Stunnenberg, J. H. A. Martens, V. Carafa, and L. Altucci. 2020. 'Recent insights into Histone Acetyltransferase-1: biological function and involvement in pathogenesis', *Epigenetics*: 1-13.
- Proske, D., M. Blank, R. Buhmann, and A. Resch. 2005. 'Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications', *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 367-74.
- Puck, T. T., and P. I. Marcus. 1956. 'Action of x-rays on mammalian cells', *J Exp Med*, 103: 653-66.
- Qin, S., and M. R. Parthun. 2002. 'Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair', *Mol Cell Biol*, 22: 8353-65.
- Qin, S., and M. R. Parthun. 2006. 'Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks', *Mol Cell Biol*, 26: 3649-58.
- Rafehi, H., C. Orłowski, G. T. Georgiadis, K. Ververis, A. El-Osta, and T. C. Karagiannis. 2011. 'Clonogenic assay: adherent cells', *J Vis Exp*.

- Richman, R., L. G. Chicoine, M. P. Collini, R. G. Cook, and C. D. Allis. 1988. 'Micronuclei and the cytoplasm of growing *Tetrahymena* contain a histone acetylase activity which is highly specific for free histone H4', *J Cell Biol*, 106: 1017-26.
- Rivieccio, M. A., H. S. Suh, Y. Zhao, M. L. Zhao, K. C. Chin, S. C. Lee, and C. F. Brosnan. 2006. 'TLR3 ligation activates an antiviral response in human fetal astrocytes: a role for viperin/cig5', *J Immunol*, 177: 4735-41.
- Roffey, S. E., and D. W. Litchfield. 2021. 'CK2 Regulation: Perspectives in 2021', *Biomedicines*, 9.
- Rosaleny, L. E., O. Antunez, A. B. Ruiz-Garcia, J. E. Perez-Ortin, and V. Tordera. 2005. 'Yeast HAT1 and HAT2 deletions have different life-span and transcriptome phenotypes', *FEBS Lett*, 579: 4063-8.
- Ruiz-Garcia, A. B., R. Sendra, M. Galiana, M. Pamblanco, J. E. Perez-Ortin, and V. Tordera. 1998. 'HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4', *J Biol Chem*, 273: 12599-605.
- Ruiz Ciancio, D., M. R. Vargas, W. H. Thiel, M. A. Bruno, P. H. Giangrande, and M. B. Mestre. 2018. 'Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer', *Pharmaceuticals (Basel)*, 11.
- Rusin, S. F., M. E. Adamo, and A. N. Kettenbach. 2017. 'Identification of Candidate Casein Kinase 2 Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics', *Front Cell Dev Biol*, 5: 97.
- Saade, E., U. Mechold, A. Kulyyassov, D. Vertut, M. Lipinski, and V. Ogryzko. 2009. 'Analysis of interaction partners of H4 histone by a new proteomics approach', *Proteomics*, 9: 4934-43.
- Saavedra, F., C. Rivera, E. Rivas, P. Merino, D. Garrido, S. Hernandez, I. Forne, I. Vassias, Z. A. Gurard-Levin, I. E. Alfaro, A. Imhof, G. Almouzni, and A. Loyola. 2017. 'PP32 and SET/TAF-Ibeta proteins regulate the acetylation of newly synthesized histone H4', *Nucleic Acids Res*, 45: 11700-10.
- Sabari, J. K., B. H. Lok, J. H. Laird, J. T. Poirier, and C. M. Rudin. 2017. 'Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy', *Nat Rev Clin Oncol*, 14: 549-61.
- Saber, A., T. J. N. Hiltermann, K. Kok, M. M. Terpstra, K. de Lange, W. Timens, H. J. M. Groen, and A. van den Berg. 2017. 'Mutation patterns in small cell and non-small cell lung cancer patients suggest a different level of heterogeneity between primary and metastatic tumors', *Carcinogenesis*, 38: 144-51.

- Sadler, A. J., B. A. Suliman, L. Yu, X. Yuan, D. Wang, A. T. Irving, S. T. Sarvestani, A. Banerjee, A. S. Mansell, J. P. Liu, S. Gerondakis, B. R. Williams, and D. Xu. 2015. 'The acetyltransferase HAT1 moderates the NF-kappaB response by regulating the transcription factor PLZF', *Nat Commun*, 6: 6795.
- Santos, G. C., Jr., A. P. da Silva, L. Feldman, G. M. Ventura, Y. Vassetzky, and C. V. de Moura Gallo. 2015. 'Epigenetic modifications, chromatin distribution and TP53 transcription in a model of breast cancer progression', *J Cell Biochem*, 116: 533-41.
- Sazani, P. L., R. Larralde, and J. W. Szostak. 2004. 'A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP', *J Am Chem Soc*, 126: 8370-1.
- Schneider, J., P. Bajwa, F. C. Johnson, S. R. Bhaumik, and A. Shilatifard. 2006. 'Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II', *J Biol Chem*, 281: 37270-4.
- Schug, Z. T., B. Peck, D. T. Jones, Q. Zhang, S. Grosskurth, I. S. Alam, L. M. Goodwin, E. Smethurst, S. Mason, K. Blyth, L. McGarry, D. James, E. Shanks, G. Kalna, R. E. Saunders, M. Jiang, M. Howell, F. Lassailly, M. Z. Thin, B. Spencer-Dene, G. Stamp, N. J. van den Broek, G. Mackay, V. Bulusu, J. J. Kamphorst, S. Tardito, D. Strachan, A. L. Harris, E. O. Aboagye, S. E. Critchlow, M. J. Wakelam, A. Schulze, and E. Gottlieb. 2015. 'Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress', *Cancer Cell*, 27: 57-71.
- Seiden-Long, I. M., K. R. Brown, W. Shih, D. A. Wigle, N. Radulovich, I. Jurisica, and M. S. Tsao. 2006. 'Transcriptional targets of hepatocyte growth factor signaling and Ki-ras oncogene activation in colorectal cancer', *Oncogene*, 25: 91-102.
- Seo, J. Y., R. Yaneva, and P. Cresswell. 2011. 'Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication', *Cell Host Microbe*, 10: 534-9.
- Shahbazian, M. D., and M. Grunstein. 2007. 'Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation', *Annu Rev Biochem*, 76: 75-100.
- Shang, W. H., T. Hori, F. G. Westhorpe, K. M. Godek, A. Toyoda, S. Misu, N. Monma, K. Ikeo, C. W. Carroll, Y. Takami, A. Fujiyama, H. Kimura, A. F. Straight, and T. Fukagawa. 2016. 'Acetylation of histone H4 lysine 5 and 12 is required for CENP-A deposition into centromeres', *Nat Commun*, 7: 13465.
- Shangguan, D., Y. Li, Z. Tang, Z. C. Cao, H. W. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C. J. Yang, and W. Tan. 2006. 'Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11838-43.

- Shigdar, S., J. Macdonald, M. O'Connor, T. Wang, D. Xiang, H. Al Shamaileh, L. Qiao, M. Wei, S. F. Zhou, Y. Zhu, L. Kong, S. Bhattacharya, C. Li, and W. Duan. 2013. 'Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation', *Sensors (Basel)*, 13: 13624-37.
- Singh, T., R. Prasad, and S. K. Katiyar. 2016. 'Therapeutic intervention of silymarin on the migration of non-small cell lung cancer cells is associated with the axis of multiple molecular targets including class 1 HDACs, ZEB1 expression, and restoration of miR-203 and E-cadherin expression', *Am J Cancer Res*, 6: 1287-301.
- Sklenar, A. R., and M. R. Parthun. 2004. 'Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity', *BMC Biochem*, 5: 11.
- Sorbello, V., L. Fuso, C. Sfiligoi, C. Scafoglio, R. Ponzzone, N. Biglia, A. Weisz, P. Sismondi, and M. De Bortoli. 2003. 'Quantitative real-time RT-PCR analysis of eight novel estrogen-regulated genes in breast cancer', *Int J Biol Markers*, 18: 123-9.
- Steen, N. V., L. Potze, E. Giovannetti, A. Cavazzoni, R. Ruijtenbeek, C. Rolfo, P. Pauwels, and G. J. Peters. 2017. 'Molecular mechanism underlying the pharmacological interactions of the protein kinase C-beta inhibitor enzastaurin and erlotinib in non-small cell lung cancer cells', *Am J Cancer Res*, 7: 816-30.
- Sterner, D. E., and S. L. Berger. 2000. 'Acetylation of histones and transcription-related factors', *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 435-59.
- Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz. 2005. 'FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection', *Anal Bioanal Chem*, 383: 83-91.
- Sundar, I. K., and I. Rahman. 2016. 'Gene expression profiling of epigenetic chromatin modification enzymes and histone marks by cigarette smoke: implications for COPD and lung cancer', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311: L1245-L58.
- Suter, B., O. Pogoutse, X. Guo, N. Krogan, P. Lewis, J. F. Greenblatt, J. Rine, and A. Emili. 2007. 'Association with the origin recognition complex suggests a novel role for histone acetyltransferase Hat1p/Hat2p', *BMC Biol*, 5: 38.
- Svobodova, M., A. Pinto, P. Nadal, and O' Sullivan CK. 2012. 'Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes', *Anal Bioanal Chem*, 404: 835-42.

- Tafrova, J. I., and S. T. Tafrov. 2014. 'Human histone acetyltransferase 1 (Hat1) acetylates lysine 5 of histone H2A in vivo', *Mol Cell Biochem*, 392: 259-72.
- Tan, W., M. J. Donovan, and J. Jiang. 2013. 'Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications', *Chem Rev*, 113: 2842-62.
- Toh, S. Y., M. Citartan, S. C. Gopinath, and T. H. Tang. 2015. 'Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay', *Biosens Bioelectron*, 64: 392-403.
- Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini. 2005. 'Analytical applications of aptamers', *Biosens Bioelectron*, 20: 2424-34.
- Tong, K., T. Keller, C. S. Hoffman, and A. T. Annunziato. 2012. 'Schizosaccharomyces pombe Hat1 (Kat1) is associated with Mis16 and is required for telomeric silencing', *Eukaryot Cell*, 11: 1095-103.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal. 2015. 'Global cancer statistics, 2012', *CA Cancer J Clin*, 65: 87-108.
- Travis, W. D. 2012. 'Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas', *Mod Pathol*, 25 Suppl 1: S18-30.
- Travis, W. D., E. Brambilla, A. G. Nicholson, Y. Yatabe, J. H. M. Austin, M. B. Beasley, L. R. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. B. Flieder, K. Geisinger, F. R. Hirsch, Y. Ishikawa, K. M. Kerr, M. Noguchi, G. Pelosi, C. A. Powell, M. S. Tsao, I. Wistuba, and W. H. O. Panel. 2015. 'The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification', *J Thorac Oncol*, 10: 1243-60.
- Tscherner, M., E. Stappler, D. Hnisz, and K. Kuchler. 2012. 'The histone acetyltransferase Hat1 facilitates DNA damage repair and morphogenesis in *Candida albicans*', *Mol Microbiol*, 86: 1197-214.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. 'Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase', *Science*, 249: 505-10.
- Varga, J., S. Korbai, A. Neller, N. Zsindely, and L. Bodai. 2019. 'Hat1 acetylates histone H4 and modulates the transcriptional program in *Drosophila* embryogenesis', *Sci Rep*, 9: 17973.
- Verreault, A., P. D. Kaufman, R. Kobayashi, and B. Stillman. 1998. 'Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase', *Curr Biol*, 8: 96-108.

- Verzijlbergen, K. F., T. van Welsem, D. Sie, T. L. Lenstra, D. J. Turner, F. C. Holstege, R. M. Kerkhoven, and F. van Leeuwen. 2011. 'A barcode screen for epigenetic regulators reveals a role for the NuB4/HAT-B histone acetyltransferase complex in histone turnover', *PLoS Genet*, 7: e1002284.
- Vinod, S. K., and E. Hau. 2020. 'Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions', *Respirology*, 25 Suppl 2: 61-71.
- Vlad, M. L., S. A. Manea, A. G. Lazar, M. Raicu, H. Muresian, M. Simionescu, and A. Manea. 2019. 'Histone Acetyltransferase-Dependent Pathways Mediate Upregulation of NADPH Oxidase 5 in Human Macrophages under Inflammatory Conditions: A Potential Mechanism of Reactive Oxygen Species Overproduction in Atherosclerosis', *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 3201062.
- Vrtacnik, P., J. Zupan, V. Mlakar, T. Kranjc, J. Marc, B. Kern, and B. Ostanek. 2018. 'Epigenetic enzymes influenced by oxidative stress and hypoxia mimetic in osteoblasts are differentially expressed in patients with osteoporosis and osteoarthritis', *Sci Rep*, 8: 16215.
- Waheed, A. A., and E. O. Freed. 2007. 'Influenza virus not cRAFTy enough to dodge viperin', *Cell Host Microbe*, 2: 71-2.
- Wan, Q., X. Liu, and Y. Zu. 2021. 'Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control', *Theranostics*, 11: 9133-61.
- Wandtke, T., J. Wozniak, and P. Kopinski. 2015. 'Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections', *Viruses*, 7: 751-80.
- Wang, F., C. Han, C. He, Q. Zhou, J. Zhang, C. Wang, N. Li, and F. Huang. 2008. 'Self-sorting organization of two heteroditopic monomers to supramolecular alternating copolymers', *J Am Chem Soc*, 130: 11254-5.
- Wang, H., K. Liu, B. A. M. Fang, H. Wu, F. Li, X. Xiang, W. Tang, G. Zhao, L. Lin, S. Bao, and Q. Xie. 2015. 'Identification of acetyltransferase genes (HAT1 and KAT8) regulating HBV replication by RNAi screening', *Cell Biosci*, 5: 66.
- Wang, S., X. Wu, T. Pan, W. Song, Y. Wang, F. Zhang, and Z. Yuan. 2012. 'Viperin inhibits hepatitis C virus replication by interfering with binding of NS5A to host protein hVAP-33', *J Gen Virol*, 93: 83-92.

- Wang, W., X. Li, Y. Xu, W. Guo, H. Yu, L. Zhang, Y. Wang, and X. Chen. 2021. 'Acetylation-stabilized chloride intracellular channel 1 exerts a tumor-promoting effect on cervical cancer cells by activating NF-kappaB', *Cell Oncol (Dordr)*, 44: 557-68.
- Wu, H., N. Moshkina, J. Min, H. Zeng, J. Joshua, M. M. Zhou, and A. N. Plotnikov. 2012. 'Structural basis for substrate specificity and catalysis of human histone acetyltransferase 1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 8925-30.
- Xia, P., R. Gu, W. Zhang, L. Shao, F. Li, C. Wu, and Y. Sun. 2019. 'MicroRNA-377 exerts a potent suppressive role in osteosarcoma through the involvement of the histone acetyltransferase 1-mediated Wnt axis', *J Cell Physiol*, 234: 22787-98.
- Xu, H., Y. Wang, S. Lin, W. Deng, D. Peng, Q. Cui, and Y. Xue. 2018. 'PTMD: A Database of Human Disease-associated Post-translational Modifications', *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 16: 244-51.
- Xue, L., J. Hou, Q. Wang, L. Yao, S. Xu, and D. Ge. 2014. 'RNAi screening identifies HAT1 as a potential drug target in esophageal squamous cell carcinoma', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 3898-907.
- Yang, G., J. Feng, Y. Liu, M. Zhao, Y. Yuan, H. Yuan, H. Yun, M. Sun, Y. Bu, L. Liu, Z. Liu, J. Q. Niu, M. Yin, X. Song, Z. Miao, Z. Lin, and X. Zhang. 2019. 'HAT1 signaling confers to assembly and epigenetic regulation of HBV cccDNA minichromosome', *Theranostics*, 9: 7345-58.
- Yang, X., L. Li, J. Liang, L. Shi, J. Yang, X. Yi, D. Zhang, X. Han, N. Yu, and Y. Shang. 2013. 'Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover', *J Biol Chem*, 288: 18271-82.
- Yang, X., W. Yu, L. Shi, L. Sun, J. Liang, X. Yi, Q. Li, Y. Zhang, F. Yang, X. Han, D. Zhang, J. Yang, Z. Yao, and Y. Shang. 2011. 'HAT4, a Golgi apparatus-anchored B-type histone acetyltransferase, acetylates free histone H4 and facilitates chromatin assembly', *Mol Cell*, 44: 39-50.
- Yde, C. W., B. B. Olsen, D. Meek, N. Watanabe, and B. Guerra. 2008. 'The regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis', *Oncogene*, 27: 4986-97.
- Yuan, Y., Y. Miao, L. Qian, Y. Zhang, C. Liu, J. Liu, Y. Zuo, Q. Feng, T. Guo, L. Zhang, X. Chen, L. Jin, F. Huang, H. Zhang, W. Zhang, W. Li, G. Xu, and H. Zheng. 2020. 'Targeting UBE4A Revives Viperin Protein in Epithelium to Enhance Host Antiviral Defense', *Mol Cell*, 77: 734-47 e7.



- Zaidi, N., J. V. Swinnen, and K. Smans. 2012. 'ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism', *Cancer Res*, 72: 3709-14.
- Zamay, G. S., O. S. Kolovskaya, T. N. Zamay, Y. E. Glazyrin, A. V. Krat, O. Zubkova, E. Spivak, M. Wehbe, A. Gargaun, D. Muharemagic, M. Komarova, V. Grigorieva, A. Savchenko, A. A. Modestov, M. V. Berezovski, and A. S. Zamay. 2015. 'Aptamers Selected to Postoperative Lung Adenocarcinoma Detect Circulating Tumor Cells in Human Blood', *Mol Ther*, 23: 1486-96.
- Zamay, T. N., G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, R. A. Zukov, M. M. Petrova, A. Gargaun, M. V. Berezovski, and A. S. Kichkailo. 2017. 'Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer', *Cancers (Basel)*, 9.
- Zhang, H., X. F. Li, and X. C. Le. 2009. 'Differentiation and detection of PDGF isomers and their receptors by tunable aptamer capillary electrophoresis', *Anal Chem*, 81: 7795-800.
- Zhang, J., Z. Xu, L. Kong, H. Gao, Y. Zhang, Y. Zheng, and Y. Wan. 2020. 'miRNA-486-5p Promotes COPD Progression by Targeting HAT1 to Regulate the TLR4-Triggered Inflammatory Response of Alveolar Macrophages', *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 15: 2991-3001.
- Zhang, N., Z. Chen, D. Liu, H. Jiang, Z. K. Zhang, A. Lu, B. T. Zhang, Y. Yu, and G. Zhang. 2021. 'Structural Biology for the Molecular Insight between Aptamers and Target Proteins', *Int J Mol Sci*, 22.
- Zhao, N., S. N. Pei, J. Qi, Z. Zeng, S. P. Iyer, P. Lin, C. H. Tung, and Y. Zu. 2015. 'Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia', *Biomaterials*, 67: 42-51.
- Zhou, J., and J. J. Rossi. 2014. 'Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents for Targeted Disease Therapy', *Mol Ther Nucleic Acids*, 3: e169.
- Zhuo, Z., Y. Yu, M. Wang, J. Li, Z. Zhang, J. Liu, X. Wu, A. Lu, G. Zhang, and B. Zhang. 2017. 'Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine', *Int J Mol Sci*, 18.

