



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Selene
Jiménez Vega

Tesis doctoral

Desenmascarando la
implicación de las proteínas de
unión al ARN en el desarrollo y
progresión de los tumores
malignos de la vaina del nervio
periférico

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Neurociencia y Psicología Clínica



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

**DESENMASCARANDO LA IMPLICACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN EN EL
DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE LOS TUMORES
MALIGNOS DE LA VAINA DEL NERVIO
PERIFÉRICO**

Autora:

Selene Jiménez Vega

Director: Dr. Ashwin Woodhoo

Tutor: Dr. Ashwin Woodhoo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2024



DECLARACIÓN CONFLICTOS DE INTERÉS

En cumplimiento de las normas éticas y de transparencia en la investigación, declaro que no existen conflictos de intereses en relación con la presente tesis titulada: Desenmascarando la implicación de las proteínas de unión al ARN en el desarrollo y progresión de los tumores malignos de la vaina del nervio periférico.

He realizado esta investigación de manera independiente y objetiva, y no he recibido financiamiento, apoyo o incentivos que pudieran influir en los resultados o en la interpretación de los datos presentados. Asimismo, declaro que no tengo relaciones personales, profesionales o financieras que pudieran afectar la imparcialidad de mi trabajo.

Cualquier cambio en esta situación será comunicado oportunamente a mi comité de tesis.

En Santiago de Compostela, noviembre de 2024

Selene Jiménez Vega

RESUMEN

Los MPNST son sarcomas agresivos, el 50% de los cuales se desarrollan en el contexto de la neurofibromatosis tipo 1, y para los que actualmente no existe ninguna terapia eficaz. Estos tumores presentan una firma transcriptómica única, distinta a la de las células de Schwann normales o los neurofibromas. Las RBPs son reguladores críticos de los programas de expresión génica en numerosos procesos celulares y su disfunción está relacionada con varias enfermedades, incluido el cáncer. Esta tesis propone que las RBPs actúan como amplificadores de mutaciones oncogénicas en MPNSTs coordinando complejas redes moleculares para impulsar el desarrollo tumoral y la metástasis, y que podrían ser excelentes dianas para el tratamiento o el diagnóstico. Descubrí que la RBP LSM5 estaba altamente expresada en los MPNST, lo que se relacionaba con un peor pronóstico. El silenciamiento de *LSM5* condujo a una regulación (por ejemplo, de la proliferación y la supervivencia), y esto estaba relacionado con su capacidad para regular el *splicing* y la degradación del ARNm. Además, utilizando la captura del ARN-interactoma, pude identificar el repertorio de RBPs activas en líneas celulares de MPNST, entre las que seleccioné y estudié más a fondo el papel funcional de MEX3A.

En conclusión, las RBPs desempeñan un papel crucial en la progresión del MPNST y representan un área prometedora para el desarrollo de nuevas terapias y estrategias de diagnóstico.

ABSTRACT

MPNSTs are aggressive sarcomas, 50% of which develop in the context of neurofibromatosis type 1, and for which currently there are no effective therapy. These tumors have a unique transcriptomic signature that is distinct from normal Schwann cells or neurofibromas. RBPs are critical regulators of gene expression programs in numerous cellular processes and their dysfunction are linked to various diseases, including cancer. This thesis proposes that RBPs act as amplifiers of oncogenic driver mutations in MPNSTs by coordinating complex molecular networks to drive tumor development and metastasis, and that they could be excellent targets for treatment or diagnosis. I found that the RBP LSM5 was highly expressed in MPNSTs, which was linked to a worse prognosis. *LSM5* silencing led to a regulation (e.g. proliferation, survival), and that this was linked to its capacity to regulate splicing and mRNA decay. Furthermore, using RNA-interactome capture, I was able to identify the repertoire of active RBPs in MPNST cell lines, among which I selected and further studied the functional role of MEX3A.

In conclusion, RBPs play a crucial role in MPNST progression and represent a promising area for the development of new therapies and diagnostic strategies.

RESUMEN

Las células de Schwann son células que recubren los axones de las neuronas del sistema nervioso periférico, y juegan un papel fundamental para el mantenimiento de la homeostasis neuronal en condiciones fisiológicas normales. La pérdida de funcionalidad de estas células se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas, neuropatías y cáncer. En este último caso, destacamos la neurofibromatosis, un grupo heterogéneo de enfermedades con predisposición a desarrollar tumores. La más frecuente es la neurofibromatosis de tipo 1, que afecta a 1 de cada 2.500-3.000 niños nacidos en el mundo. Esta enfermedad se produce por una mutación autosómica dominante en el gen *NF1* que provoca la pérdida funcional de la proteína neurofibromina, impidiendo la inactivación de la proteína Ras, lo que conduce a una activación constitutiva de las rutas de señalización celular controladas por esta. Los principales síntomas de esta enfermedad asociados a las células de Schwann son los neurofibromas, lesiones benignas que pueden ser cutáneas o plexiformes.

Además de la neurofibromina, entre el 8 y el 13% de los neurofibromas pueden adquirir una mutación en otro gen y transformarse en tumores malignos de la vaina del nervio periférico (MPNSTs, por sus siglas en inglés). Estos tumores son sarcomas agresivos y los pacientes que los desarrollan tienen una baja probabilidad de supervivencia a los 5 años. Los MPNSTs tienen una firma transcriptómica única que es distinta a la de las células de Schwann normales o a la de los neurofibromas, por lo que atacar los programas de expresión génica es uno de los mecanismos que está emergiendo como terapia en el contexto tumoral. Las proteínas de unión al ARN (RBPs, por sus siglas en inglés) son reguladores esenciales de la expresión génica, regulando todos los aspectos de la vida del ARN mensajero (ARNm).

En primer lugar, en esta tesis se realizaron análisis bioinformáticos con el fin de encontrar RBPs candidatas que pudieran estar implicadas en el proceso de desarrollo de MPNST. El análisis de las bases de datos con muestras de pacientes de MPNST y neurofibromatosis, confirmaron que 59 RBPs estaban enriquecidas en MPNST. Una criba manual y unos análisis preliminares permitieron seleccionar finalmente LSM5 como candidato principal. Se realizaron análisis bioinformáticos complementarios como una curva de supervivencia, donde se pudo comprobar que los pacientes con mayor expresión de LSM5 tienen peor pronóstico, y un análisis de *single cell* que permitió confirmar que LSM5 se expresa en un mayor número de células de MPNST que de neurofibroma.

Se confirmaron los resultados de los análisis bioinformáticos realizando un análisis a nivel de proteína y ARN en líneas celulares y en muestras humanas, pudiendo concluir que LSM5 se expresa más en MPNST que en neurofibromas y células de Schwann normales. Para comprobar que LSM5 tiene un papel relevante en el desarrollo tumoral, se realizó el silenciamiento de *LSM5* en líneas celulares de MPNST y se llevaron a cabo diferentes ensayos funcionales *in vitro*, y se confirmó que el silenciamiento de *LSM5* reduce las siguientes propiedades tumorales: proliferación, viabilidad, crecimiento en colonia y crecimiento independiente de anclaje en células de MPNST. Además, se comprobó mediante un ensayo de viabilidad que el silenciamiento afecta en mayor medida a células de MPNST que a células de Schwann normales inmortalizadas. Esto condujo a la conclusión de que LSM5 tiene un papel relevante en el crecimiento tumoral en células MPNST. Dado que los datos obtenidos *in vitro* confirmaron que el silenciamiento de LSM5 reduce las propiedades tumorales de las células de

MPNST, se realizó un ensayo *in vivo* de xenotrasplante. Las células MPNST silenciadas no fueron capaces de formar tumores en ratones *Nude*, a diferencia de las células MPNST controles.

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares afectados por el silenciamiento de *LSM5*, se realizó una secuenciación de ARN (RNAseq, por sus siglas en inglés). En este estudio, se encontraron 6.127 genes que se expresan de forma diferencial entre las células silenciadas de *LSM5* y células controles. El análisis de RNAseq permitió conocer que la apoptosis se desregula al silenciar *LSM5*, lo cual fue confirmado mediante un análisis de citometría de flujo. Por lo tanto, se puede concluir que el silenciamiento de *LSM5* aumenta la muerte por apoptosis en células de MPNST. Por otro lado, las células en las que se silencia *LSM5* también mostraron una desregulación en la ruta de señalización de mTOR. Mediante un experimento de Western Blot, se analizó la expresión de algunos de los principales reguladores de esta ruta de señalización y se confirmó que existe una disminución de la activación de la ruta de mTOR provocada por el silenciamiento de *LSM5*.

Con la finalidad de conocer los ARNm directamente regulados por *LSM5*, y poder así descifrar el mecanismo por el cual *LSM5* regula el proceso tumoral, se realizó un análisis de secuenciación de inmunoprecipitación de ARN-proteína (RIPseq, por sus siglas en inglés). Los datos obtenidos evidenciaron que *LSM5* se une a 4.704 moléculas de ARNm. La superposición de los datos de RIPseq con los datos obtenidos en el RNAseq indica que 587 genes regulados por *LSM5* aumentan su expresión en las células en las que se ha silenciado el *LSM5* respecto a los controles, mientras que 903 transcritos unidos a *LSM5* están menos expresados tras el silenciamiento de *LSM5*. Además, sabiendo que *LSM5* está implicado en el proceso de *splicing*, se realizó un análisis del *splicing* con los datos obtenidos en el RNAseq. Se comprobó que la eliminación de *LSM5* cambia el patrón del *splicing*, concretamente acumulando eventos de *intron retention*. Se seleccionaron varias variantes de *splicing* de genes que podrían tener una implicación en el desarrollo tumoral: *CDK2*, *CCNT1*, *CEACAM1* y *AXINI*.

Por último, sabiendo que la degradación del ARNm y la traducción son dos mecanismos muy relacionados, ambos llevados a cabo por proteínas de unión al ARN, se decidió realizar un fraccionamiento de ribosomas con la finalidad de conocer si el silenciamiento de *LSM5* produce cambios en la traducción. Confirmamos que el perfil de los ribosomas de las células controles y las células silenciadas con *LSM5* eran diferentes, por lo que concluimos que el silenciamiento de *LSM5* produce un cambio en la traducción global.

Tras los resultados prometedores obtenidos con *LSM5*, se planteó la búsqueda de otras RBPs que pudieran estar implicadas en el desarrollo de MPNST, con el fin de encontrar nuevas dianas para el diagnóstico y/o el tratamiento de estos tumores. Con el fin de encontrar la huella de RBPs que parecen exclusivamente unidas a ARNm en MPNST, se realizó un análisis de la captura de interactoma (*RNA interactome capture*; RIC, por sus siglas en inglés). Esta técnica permitió conocer las RBPs que se unen al ARNm en diferentes líneas celulares: células de Schwann normales immortalizadas (iHSC λ 1, iHSC λ 2), de neurofibroma (CRL3388) y MPNST (S462 y T265). Se seleccionaron cuatro candidatas que podrían estar implicados en el desarrollo de MPNST: *DDX56*, *RBM28*, *UBAP2L* y *MEX3A*. La expresión de estas RBPs candidatas en MPNST fue confirmada en una base de datos con muestras de tejidos de nervios, neurofibroma

y MPNST. Además, se comprobó su expresión en las líneas de células de Schwann, de neurofibroma y MPNST en su estado basal.

Se seleccionó MEX3A como principal candidato y se confirmó la mayor expresión de esta RBP en MPNST respecto a neurofibromatosis. Estos análisis se realizaron en una base de datos de RNAseq de muestras de pacientes, así como por qPCR en muestras humanas de tejido sano, neurofibroma y MPNST. Además, se realizaron diferentes estudios funcionales *in vitro* y se confirmó que el silenciamiento de *MEX3A* reduce ligeramente algunas de las propiedades tumorales de las células de MPNST.

En resumen, los datos obtenidos en esta tesis parecen indicar que:

- 1) LSM5 podría ser un buen marcador de diagnóstico y pronóstico de pacientes con MPNST.
- 2) El silenciamiento de *LSM5* reduce las propiedades tumorales de las células de MPNST *in vitro*. Este efecto es menos pronunciado en las células de Schwann humanas inmortalizadas.
- 3) El silenciamiento de *LSM5* en células MPNST previene la formación de tumores en modelos de xenotrasplante *in vivo*.
- 4) *LSM5* regula directamente miles de ARNm y, como consecuencia, su silenciamiento conduce a una modificación del transcriptoma.
- 5) El mecanismo molecular por el que *LSM5* regula los procesos tumorales es complejo. La ruta mTOR y la ruta Wnt podrían ser dos mecanismos importantes.
- 6) El silenciamiento de *LSM5* cambia el patrón del *splicing* de genes como *CDK2*, *CCNT1* y *CEACAM1*, los cuales podrían tener una implicación en la reducción de la progresión tumoral.
- 7) El silenciamiento de *LSM5* produce un cambio en la traducción global.
- 8) DDX56, RBM28, UBAP2L y MEX3A pueden tener una implicación en el desarrollo de MPNST.
- 9) El silenciamiento de *MEX3A* reduce las propiedades tumorales de las células de MPNST.
- 10) MEX3A aumenta en gran medida su expresión en MPNST respecto a neurofibroma, por lo que podría ser un buen marcador diagnóstico de esta transición.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO Y CÉLULAS DE SCHWANN	16
1.1.1. Desarrollo de las células de Schwann	17
1.1.2. Rutas de señalización implicadas en el desarrollo de las células de Schwann	18
1.1.3. Enfermedades asociadas al sistema nervioso periférico	18
1.2. NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1.....	19
1.2.1. Síntomas y tipos de neurofibromas	20
1.2.2. Criterios de diagnóstico	21
1.2.3. Relación genotipo-fenotipo	21
1.2.4. Terapias actuales.....	22
1.3. TUMORES DE LA VAINA DEL NERVIJO PERIFÉRICO (MPNST).....	22
1.3.1. Criterios diagnósticos de MPNST.....	23
1.3.2. Rutas de señalización importantes en el desarrollo de MPNST.....	24
1.3.3. Terapias actuales para MPNST.....	25
1.4. PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN	27
1.4.1. Mecanismo de acción – unión al ARN	27
1.4.1.1. <i>Splicing</i>	29
1.4.1.2. <i>mRNA decay</i>	30
1.4.2. Enfermedades asociadas a proteínas de unión al ARN.....	31
1.4.3. RBPs y cáncer.	32
1.4.4. Terapias actuales para proteínas de unión al ARN.....	33
1.4.5. Métodos de identificación de RBPs	34
1.5. LSM5.....	36
1.5.1. Función	36
1.5.2. Relación con enfermedades	37
1.6. MEX3A	37
1.6.1. Función	37
1.6.2. Relación con enfermedades	38
2. OBJETIVOS	40
3. HIPÓTESIS	42
4. MÉTODOS.....	44
4.1. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	44
4.1.1. Líneas celulares de Schwann humanas inmortalizadas	44
4.1.2. Líneas celulares de neurofibromatosis	44
4.1.3. Líneas celulares de MPNST	44
4.1.4. Línea celular HEK293T	45
4.2. MUESTRAS HUMANAS.....	45
4.3. SILENCIAMIENTO DE GENES MEDIANTE PARTÍCULAS LENTIVIRALES.....	45
4.3.1. Crecimiento de plásmidos y aislamiento de ADN plasmídico.....	45
4.3.2. Producción de partículas lentivirales e infección de células.....	46
4.4. ENSAYOS FUNCIONALES <i>IN VITRO</i>	47
4.4.1. Ensayo de ATP.....	47
4.4.2. Ensayo de formación de colonias	48
4.4.3. Ensayo de contaje celular	48
4.4.4. Ensayo de incorporación de BrDU	49
4.4.5. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje	49
4.4.6. Ensayo de apoptosis.....	50

4.5.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE RT-qPCR	51
4.5.1.	Extracción de ARN.....	51
4.5.2.	Retrotranscripción	52
4.5.3.	qPCR.....	52
4.6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA MEDIANTE WESTERN BLOT	54
4.6.1.	Extracción proteína	54
4.6.2.	Cuantificación de proteína	54
4.6.3.	Preparación de las muestras	54
4.6.4.	Western Blot	55
4.7.	VALIDACIÓN DE LOS CANDIDATOS DE PCR.....	56
4.8.	ENSAYOS IN VIVO XENOGRAPTS	57
4.8.1.	Animales de experimentación.	57
4.8.2.	Preparación de células de MPNST e inyección.....	58
4.8.3.	Seguimiento y extracción de tejidos	58
4.9.	PERFIL DE RIBOSOMAS	58
4.10.	CAPTURA DEL INTERACTOMA DEL ARN (RIC)	59
4.11.	TINCIÓN DE PLATA	61
4.12.	RNASEQ	62
4.13.	RIPSEQ.....	63
4.14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	65
4.15.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	65
4.15.1.	Datos públicos.....	65
4.15.2.	<i>Single cell</i>	65
4.15.3.	RNAseq.....	66
4.15.4.	RIPseq	66
4.15.5.	Proteómica.....	67
4.15.5.1.	<i>Digestión de proteínas:</i>	67
4.15.5.2.	<i>Identificación de proteínas por LC-MS/MS (adquisición de DDA) (1–5)</i>	67
4.15.5.3.	<i>Análisis de los datos del PDD</i>	68
4.15.5.4.	<i>Cuantificación relativa: Recuento espectral</i>	68
5.	RESULTADOS	70
5.1.	PAPEL DE LSM5 EN LA PROGRESIÓN Y METÁSTASIS TUMORAL.....	70
5.1.1.	Selección de LSM5 como RBP candidata a través de análisis bioinformáticos	70
5.1.1.	Validación de la expresión de <i>LSM5</i> en muestras humanas y líneas celulares	72
5.1.2.	El silenciamiento de <i>LSM5</i> reduce las propiedades tumorales en células de MPNST	73
5.1.2.	Las células silenciadas no tienen capacidad de formar un tumor en los trasplantes de xenoinjertos.....	77
5.1.3.	El silenciamiento de <i>LSM5</i> modifica el transcriptoma	78
5.1.4.	El silenciamiento de <i>LSM5</i> afecta a la ruta mTOR.....	81
5.1.5.	El silenciamiento de <i>LSM5</i> promueve la apoptosis de las células tumorales.....	82
5.1.6.	<i>LSM5</i> regula directamente un gran número de ARNms.....	84
5.1.7.	El silenciamiento de <i>LSM5</i> cambia el patrón del <i>splicing</i>	86
5.1.8.	El silenciamiento de <i>LSM5</i> genera cambios en la traducción global.....	91
5.2.	CARACTERIZACIÓN DEL RBPOMA Y COMPARACIÓN EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA PROGRESIÓN TUMORAL.....	93
5.2.1.	Caracterización del RBPoma de diferentes líneas celulares	93
5.2.1.1.	<i>RBPoma iHSCA1</i>	93
5.2.1.2.	<i>RBPoma ihscA2</i>	95
5.2.1.3.	<i>RBPoma CRL-3388</i>	95
5.2.1.4.	<i>RBPoma T265</i>	98
5.2.1.5.	<i>RBPoma S462</i>	98
5.2.2.	Comparación de la actividad de las proteínas de unión al ARN en los diferentes estadios de la progresión tumoral.....	101

5.2.3	Papel de MEX3A en la progresión tumoral	102
5.2.3.1.	<i>El silenciamiento de MEX3A reduce las propiedades tumorales de las células de MPNST.</i>	105
6.	DISCUSIÓN	108
7.	CONCLUSIONES	115
8.	BIBLIOGRAFÍA	117
9.	ANEXO - PERMISOS EDITORIALES DE LAS FIGURAS	133

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

2'-O-Me	Ribosemetilación
4SU	4-tiouridina
8-oxoG	8-oxo-dihidroguanosina
ac4C	N4-acetilcitidina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Alt3´	Alternative 3´splice site
Alt5´	Alternative 5´splice site
AltEx	Exon skipping
AMD	Descomposición del ARNm mediada por ARE
AME	Atrofia muscular espinal
ANNUBP	Neoplasia neurofibromatosa atípica de potencial biológico desconocido
ARE	Elemento rico en AU
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ATP	Adenosín trifosfato
BF	Biological funtion
BrDU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albúmina de Suero fetal
CA	Anomalías coroideas
Cap5´	Capucha 5´
CARIC	Química asistida RIC
CC	Cell component (Componente celular)
CE	Energía de colisión
CHX	Ciclohexamida
CIDP	Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
CMT	Charcot–Marie–Tooth
CO ₂	Dióxido de carbono
cps	Revoluciones por segundo
CT	Tomografía computarizada
CUR	Gas de cortina
DDA	Análisis dependiente de datos
DEG	Expresión diferencial de genes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dPSI	differential percentage splice in

ECJ	Complejo de union a exones
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EMA	Agencia europea del medicamento
EU	5-etinilurina
FICT	isotiocianato de fluoresceína
FBS	Suero fetal Bovino
FC	Fold Change
FDA	Agencia americana del medicamento
GAIC	Galactocerebrósido (
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GDP	Guanosina difosfato
GEO	Gene Expression Omnibus
GS1	Gas de fuente de iones 1
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GO	Gene Ontology
GTP	Guanosina trifosfato
H3K27Me3	Metilación de la lisina 27 de la histona 3
iHSC	Células de Schwann humanas inmortalizadas
IR	Intron retention
ISVF	Tensión de pulverización de iones flotante
iTRAPP	Purificación de proteínas asociadas a ARN total
KH	Homólogo K
KH	Dominios homólogos HNRNPK
LB	Caldo de lisogenia
LOH	Loss of heterozigosis
m5C	5-metilcitidina
m6A	N6-metiladenosina
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MBP	Proteína básica de mielina
miARN	MicroARN
MP	Molecular Pathway
MPNST	Tumores malignos de la vaina del nervio periférico
MS	Espectrometría de masas
NF1	Neurofibromatosis de tipo I
NF2	Neurofibromatosis de tipo 2
NFc	Neurofibroma cutáneo
NFp	Neurofibroma pleoixiforme
NIH	National Institutes of Health

NIR	Reflectancia del infrarrojo cercano
NMJ	Unión neuromuscular
NREC	National Research Ethics Committee
NRG1	Neuroregulina
OCT	Tomografía de coherencia óptica
OOPS	Separación de fases orgánicas ortogonales
PBS	Tampón fosfato salino
pCLAP	Purificación por afinidad de péptidos con crosslinking
PCR	Reacción de la polimerasa
PCS	Precusores de las células de Schwann
PE	Ficoeritrina
PET	Tomografía por emisión de positrones
PMP22	Proteína 22 de mielina periférica
PX	Periaxina
PTex	Extracción fenol Toluol
PTMs	Modificaciones postraduccionales
qPCR	PCR cuantitativa
Rb	Retinoblastoma
RBDs	Dominios de unión al ARN
RBDmap	Mapa de dominio de unión al ARN
RBP	Proteínas de unión al ARN
RIC	RNA interactome capture (Captura del interactoma del ARN)
RICK	ARN interactoma usando el método click
RIP	RNA inmunoprecipitation (inmunoprecipitación de ARN)
RNAseq	Secuenciación de ARN
RNPs	Partículas ribonucleicas
Rpm	Revoluciones por minutos
RRM	Motivo de reconocimiento del ARN
RT	Retrotranscripción
SC	Células de Schwann
SEM	Desviación estándar de la media
shCTRL	Plásmido control
siARN	ARN interferente
SNC	Sistema nervioso central
snoARN	ARN nucleolar pequeño
SNP	Sistema nervioso periférico
snRNA	ARN nuclear pequeño
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
Splicing	Empalme

SWN	Schwannomatosis
UTR	Región 3'no traducida
UV	Ultravioleta
XRNAX	Extracción de ARN de proteínas con crosslinking
Ψ	Pseudouridina

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO Y CÉLULAS DE SCHWANN

El sistema nervioso se divide en el sistema nervioso central (SNC), compuesto por el cerebro, el tronco del encéfalo, el cerebelo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), compuesto por nervios espinales y ganglios (1). Las principales células que componen este sistema son las neuronas, células polarizadas provistas de largos axones y cortas dendritas, cuya principal función es transmitir el impulso eléctrico. Las células que dan soporte a las neuronas son las de la glía. En el SNP las células de la glía incluyen las células satélites, situadas en los ganglios, y las células de Schwann (SC, por sus siglas en inglés), que se disponen rodeando los nervios (2).

Las SCs deben su nombre al fisiólogo alemán Theodor Schwann (1810-1882), que describió por primera vez que los nervios periféricos son morfológicamente complejos y están formados por varios tipos celulares, no solo por neuronas. Las SCs se pueden clasificar en dos tipos: células de Schwann no mielinizantes y células de Schwann mielinizantes (3) (**Figura 1**).

Las SC no mielinizantes se disponen rodeando varios axones de pequeño calibre formando los haces de Remak, que son indispensables para el correcto desarrollo y función del SNP, además de tener un papel clave en la regeneración nerviosa después del daño en el nervio (4). Las SC mielinizantes envuelven los axones de mayor diámetro ($>1 \mu\text{m}$) estableciendo una relación 1:1, formando la vaina de mielina. La función principal de la vaina de mielina es promover la rápida y eficiente transmisión del impulso nervioso mediante la conducción saltatoria (5).

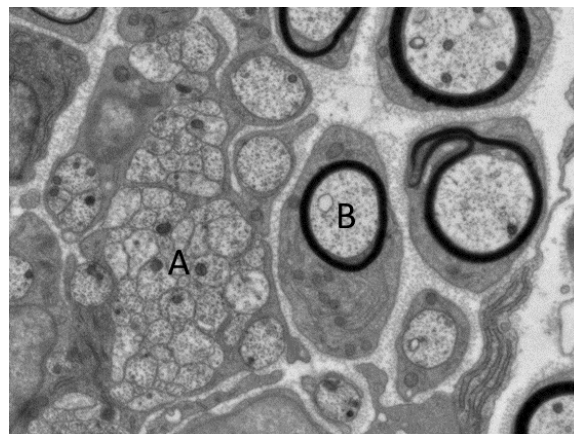


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de un corte transversal de un nervio tibial de rata. (A) Podemos distinguir un grupo de axones rodeados de células de Schwann no mielinizantes y (B) una célula de Schwann mielinizante rodeando un axón. (Elaboración propia)

1.1.1. Desarrollo de las células de Schwann

Las células de la cresta neural son células embrionarias multipotentes. Dependiendo del ambiente local, pueden diferenciarse en: células neurales de los sistemas sensorial, autónomo y entérico; y en células no neurales, como células musculares lisas, melanocitos pigmentados, huesos craneofaciales, cartílago y tejido conjuntivo (7).

Las células de Schwann derivan de la cresta neural, concretamente de una población neural transitoria de células que migra lejos de la cara dorsal del tubo neural a medida que esta se cierra (6). Durante este proceso expresan los factores de transcripción SOX10 y FOXD3 y los factores epigenéticos HDAC1/2, dando lugar a los precursores de las células de Schwann (PCS) (**Figura 2**). Esto permite la expresión de los marcadores de linaje glial [p0, DHH, PLP, Cadherina19 (exclusivo de PCS)] (8). Los PCSs están presentes únicamente en nervios embrionarios, formando una estructura compacta junto a los axones (9). La transición de PCSs a células de Schwann inmaduras viene marcada por la expresión de los marcadores moleculares S100b, GFAP y el antígeno glicolípido O4, así como la reducción del factor de transcripción AP2 α y de la cadherina 19 (10). Las SCs inmaduras pueden diferenciarse de forma reversible en SCs mielinizantes y en SCs no mielinizantes.

La diferenciación a SCs mielinizantes viene marcada por la expresión de Krox20, glicoproteína asociada a mielina (MAG), periaxina (PRX), proteína de mielina 0 (P0), proteína básica de mielina (MBP), proteína 22 de mielina periférica (PMP22), plasmolipina y galactocerebrósido (GALC) y por la pérdida de expresión de moléculas características de las células de Schwann inmaduras como L1, NCAM y el receptor de neurotrofina P75 (10) (11).

Las SCs no mielinizantes mantienen la expresión de muchos marcadores de células de Schwann inmaduras (no presentes en células mielinizantes). GALC se expresa igual que en las SC mielinizantes y, en cambio, la integrina α 1 β 1 está regulada al alza únicamente en las SC no mielinizantes (10) (12).

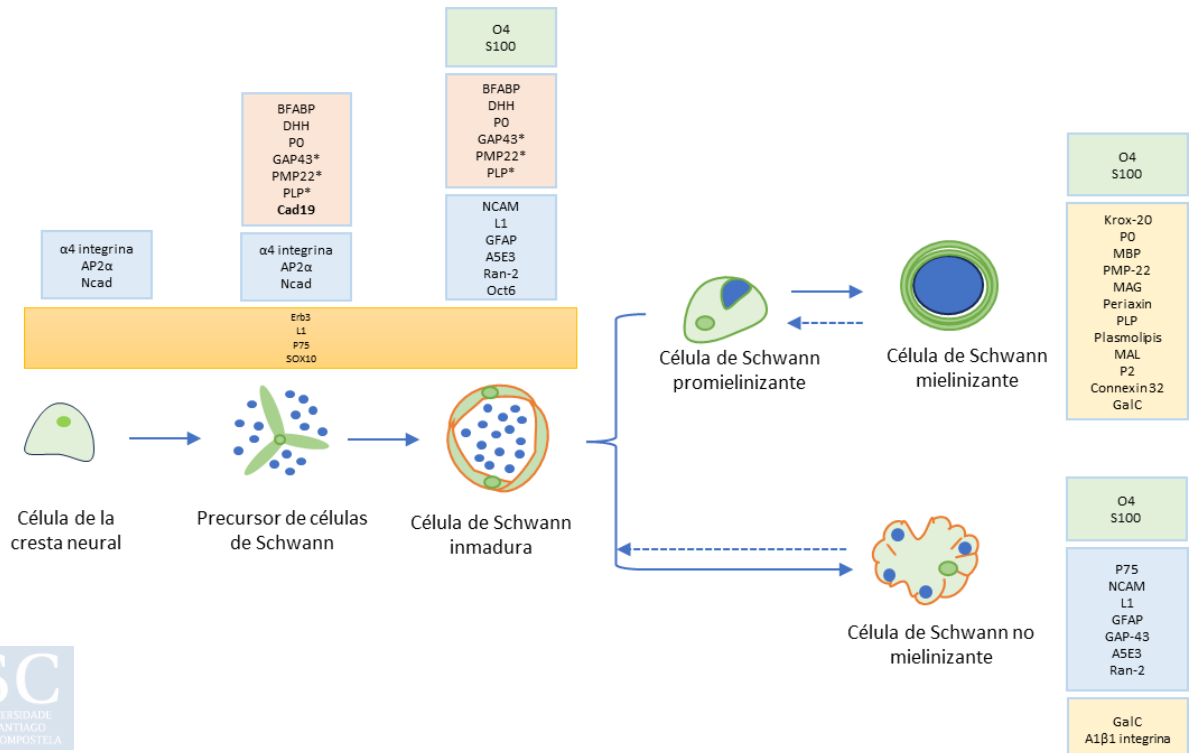


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo de las células de Schwann desde las células de la cresta neural. Durante el desarrollo de las células de Schwann desde la cresta neural se van expresando diferentes moléculas que propician la transición a células precursoras de las células de Schwann, posteriormente a células de Schwann inmaduras. En este paso las células pueden diferenciarse en células de Schwann mielinizantes y expresar marcadores de mielina o diferenciarse en células de Schwann no mielinizantes, expresando otro conjunto de marcadores. (Elaboración propia)

1.1.2. Rutas de señalización implicadas en el desarrollo de las células de Schwann

Es necesario enfatizar que las señales axonales juegan un papel fundamental en el desarrollo del linaje de las células de Schwann. En especial, destacamos la neuregulina 1 (NRG1), molécula crucial para la supervivencia de PCS, la diferenciación de las células gliales, así como en el proceso de mielinización (13) (14).

Otras de las señales externas que influyen en este proceso es el TGF- β , que durante el desarrollo de las SC puede funcionar como inhibidor de la proliferación y de la mielinización. El otro papel de TGF- β en las células de Schwann está relacionado con la regeneración nerviosa después del daño, ya que puede estar asociado con la transición a células de Schwann proliferantes con fenotipo no mielinizante (15) (16).

Adicionalmente a las moléculas nombradas, hay algunas vías de señalización celular importantes en este proceso como son (17) (18):

- Vía de señalización Notch. Tiene un papel crítico en la diferenciación de células de la cresta neural en células de linaje de Schwann. Durante el desarrollo actúa aumentando la proliferación de SCs inmaduras e inhibiendo la mielinización. En el contexto de una lesión actúa acelerando la desdiferenciación (10) (19).
- Vía de señalización MAPK/ERK. Es esencial en el desarrollo del SNP, para favorecer la diferenciación temprana de las SCs y en la mielinización (20).
- Vía de señalización HIPPO-YAP/TAZ. Juega un papel importante en el desarrollo de las SCs, como punto de equilibrio entre la proliferación de SCs inmaduras y la progresión del linaje de las SCs. Además, tiene un papel relevante en la respuesta a una lesión y en la progresión tumoral (21).
- Vía de señalización adenosín monofosfato-3', 5' cíclico (cAMP por sus siglas en inglés). La elevación del cAMP está relacionada con el receptor acoplado a la proteína G (GPR)126, y su principal función es el control de la proliferación. Además, es importante para la mielinización de las SCs mediante la activación de genes implicados en este proceso (22).
- Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Tiene un papel importante como regulador positivo de los de proliferación y supervivencia, así como el componente mTORC1 es importante en el cambio metabólico necesario para la mielinización, regula positivamente la formación de la mielina y tiene un papel crucial en los estadios previos a la mielinización (23) (24) (25).

1.1.3. Enfermedades asociadas al sistema nervioso periférico

Las SCs son importantes en el mantenimiento de la homeostasis neuronal en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, la pérdida de funcionalidad de las células de Schwann está relacionada con enfermedades neurodegenerativas, neuropatías y cáncer (26) (27).

Algunas enfermedades neurodegenerativas, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Atrofia Muscular Espinal (AME) o el modelo murino de distrofia muscular de Duchenne se han relacionado con alteraciones en la funcionalidad de las SC perisinápticas (PSC), unas células asociadas a terminales axónicos motores en la unión neuromuscular (NMJ) (28).

Respecto a las neuropatías asociadas a las SC se pueden destacar: Charcot–Marie–Tooth (CMT), el síndrome de Guillain–Barré, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) y la neuropatía diabética (29).

- Charcot-Marie-Tooth es la neuropatía hereditaria más común. Es una enfermedad heterogénea con diferentes mutaciones en genes específicos de neurona o de células de Schwann. Las mutaciones en estos genes se traducen en daño axonal, normalmente consecuencia de alteraciones en las células de Schwann mielinizantes (30).
- El síndrome de Guillain–Barré y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica se producen por la pérdida de la mielinización de los nervios periféricos causada por una reacción autoinmune que afecta a las células de Schwann (31) (32).
- La neuropatía diabética se caracteriza por el daño en axones, células de Schwann y vasos sanguíneos a consecuencia de la diabetes (33).
- Infección de *Mycobacterium leprae* en SC puede causar neuropatía a lo largo del tiempo (34).

Por otro lado, existe un grupo heterogéneo de trastornos genéticos conocidos como neurofibromatosis que predisponen a la formación de tumores, Podemos distinguir 3 tipos (35) (36):

- Neurofibromatosis de tipo 1 (NF1). Es la más común (96% de los casos), se ve afectado el gen *NF1* y destaca por el desarrollo de neurofibromas.
- Neurofibromatosis de tipo 2 (NF2). Comprende el 3% de los casos y se produce por una mutación del gen *NF2*. Destaca por el desarrollo de schwannomas, tumores encapsulados formados únicamente por células de Schwann neoplásicas.
- Schwannomatosis (SWN). Su frecuencia es baja y muchas veces difícil de diagnosticar por su similitud a NF2. Al igual que en la NF2 destaca el desarrollo de schwannomas.
- Los tumores malignos de la vaina del nervio periférico (MPNST) son, también, tumores cuyas células principales son las células de Schwann. A diferencia de los schwannomas y neurofibromas, son tumores agresivos. Pueden desarrollarse en el contexto de la neurofibromatosis o ser esporádicos.

Dentro de este abanico de enfermedades relacionadas con las SC, se seleccionó la neurofibromatosis de tipo 1 y su progresión a MPNST como objeto de estudio de esta tesis.

1.2. NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1

La neurofibromatosis tipo 1, también conocida como enfermedad de Von Recklinghausen (38), afecta en la actualidad a 1 de cada 3.000 niños nacidos en el mundo, independientemente del sexo o etnia. Es una de las enfermedades mendelianas más comunes, es autosómica dominante y de penetrancia completa.

La neurofibromatosis de tipo 1 se produce por una mutación del gen *NF1*, situado en el cromosoma 17 (17q11.2) (39). Esta mutación produce una pérdida funcional en una proteína llamada Neurofibromina (NF1), compuesta por 2.818 aminoácidos y situada en la membrana

plasmática. A pesar de que su expresión es ubicua, es mayor en células del sistema nervioso, incluyendo neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. Es una proteína activadora de la GTPasa de RAS (GAP), su función consiste en eliminar un fosfato del GTP unido a RAS. De esta forma, RAS queda unida a GDP, su forma inactiva. RAS necesita estar unida a GTP para poder activar el resto de la cascada de señalización (40) (**Figura 3**).

La pérdida funcional de la Neurofibromina se traduce en la activación constitutiva de la proteína RAS y, por consiguiente, de las vías de señalización celular que activa RAS. La vía de señalización que se ve principalmente afectada es RAF/MEK/ERK, la cual promueve la progresión y supervivencia celular. En resumen, la pérdida de Neurofibromina se traduce en un aumento de la progresión y supervivencia celular (41).

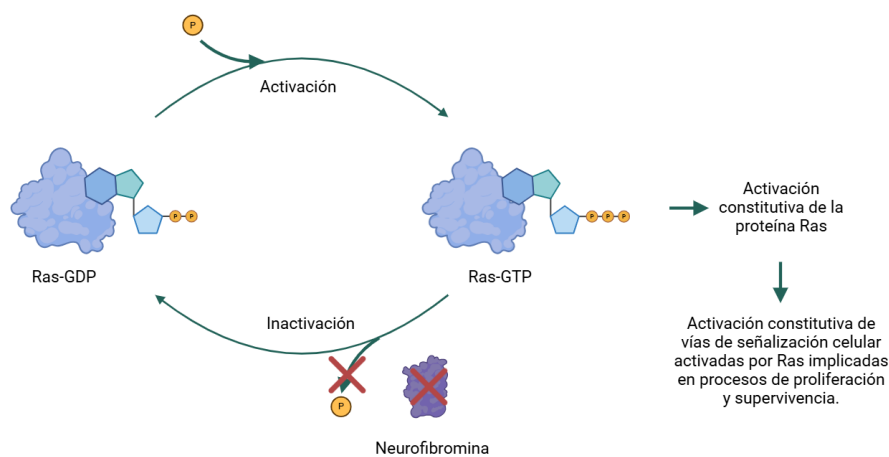


Figura 3. Fisiopatología de la neurofibromatosis de tipo I. Implicación de la pérdida funcional de la proteína Neurofibromina en la proliferación y supervivencia. (Elaboración propia)

1.2.1. Síntomas y tipos de neurofibromas

La neurofibromatosis se puede presentar clínicamente de forma muy variable. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad engloban complicaciones de tipo dermatológico, oftalmológico, neurológico, cardiovascular, óseo, endocrino, tumoral y psicológico (42).

Entre los principales síntomas destacamos los neurofibromas, lesiones tumorales formadas por células de Schwann, fibroblastos, mastocitos, elementos vasculares, macrófagos, células dendríticas y células perineurales. No obstante, los elementos neoplásicos primarios derivan del linaje de las células de Schwann. Se pueden clasificar de diferentes formas, la más extendida es en dos clases: neurofibromas cutáneos y neurofibromas plexiformes.

Los neurofibromas cutáneos (NFc) son tumores benignos que afectan casi al 100% de las personas diagnosticadas con NF1. No obstante, no tienen capacidad de convertirse en tumores malignos. Al inicio de su desarrollo proliferan con rapidez, pero rápidamente se vuelven quiescentes. Se localizan principalmente en los nervios terminales de la dermis y, aunque principalmente se desarrollan en los folículos pilosos, se pueden desarrollar en otras zonas del cuerpo como la palma de la mano o la planta del pie. El tamaño y el número de NFc puede variar en función del individuo y dentro de él. Estas lesiones se caracterizan por tener forma de cúpula, ser suaves y ser del color de la piel o ligeramente hiperpigmentado. Pueden causar picor, dolor y una carga estética que a menudo, provoca problemas de autoestima (43) (44).

Los neurofibromas plexioformes (NFp) afectan aproximadamente al 40% de los pacientes diagnosticados de neurofibromatosis. La mayoría son congénitos o se desarrollan en los primeros cinco años de vida del individuo. Se localizan principalmente rodeando los nervios largos y los plexos, en la mayor parte de los casos en las extremidades. Estas lesiones pueden causar dolor, deformidades y disfunción motora. En algunos casos pueden causar, además, complicaciones derivadas, como: disfunción respiratoria, estomacal o de la vejiga o discapacidad visual. Hay algunos NFp que son asintomáticos, una misma persona puede tener neurofibromas asintomáticos y sintomáticos. Estas lesiones pueden malignizarse y convertirse en tumores malignos de la vaina del nervio periférico (45) (46).

1.2.2. Criterios de diagnóstico

Los criterios para el diagnóstico de la neurofibromatosis tipo 1 fueron descritos y revisados por el *National Institutes of Health* (NIH) (47). Para que una persona que no tiene un progenitor diagnosticado con NF1 sea diagnosticada de la enfermedad, debe presentar dos o más de los siguientes rasgos:

- Seis o más máculas denominadas “*café au lait*” de más de 5 mm de diámetro máximo en individuos prepúberes y de más de 15 mm de diámetro máximo en individuos postpúberes.
- Pecas en la región axilar o inguinal.
- Dos o más neurofibromas de cualquier tipo o un neurofibroma plexiforme.
- Glioma de la vía óptica.
- Dos o más nódulos de Lisch en los iris identificados mediante un examen con lámpara de hendidura, o dos o más anomalías coroideas (CA), definidas como nódulos brillantes e irregulares identificados mediante tomografía de coherencia óptica (OCT)/reflectancia del infrarrojo cercano (NIR).
- Una lesión ósea distintiva, como la displasia esfenoidal, arqueamiento anterolateral de la tibia o la pseudoartrosis de un hueso largo.
- Variante patogénica heterocigota de NF1 con una fracción alélica de la variante del 50% en tejidos aparentemente normales, como los glóbulos blancos.

Sin embargo, una persona que tiene un progenitor diagnosticado de NF1, se debe diagnosticar de NF1 si cumple al menos uno de los rasgos especificados.

1.2.3. Relación genotipo-fenotipo

En los últimos años, la importancia de la heterogeneidad de los síntomas está siendo relevante en el estudio de la NF1. La relación genotipo-fenotipo podría ser clave en el desarrollo y tratamiento de la neurofibromatosis. Se han identificado más de 2.600 mutaciones inherentes al gen NF1 en pacientes con esta enfermedad. La mayor parte de las mutaciones causantes de NF1 son intragénicas (90-95%), mientras que menos del 10% son deleciones que afectan a todo el gen o afectan a la región genómica flanqueante (48).

Las correlaciones genotipo-fenotipo se han asociado en un limitado número de casos a alteraciones específicas de la línea germinal NF1(49) (50) (51). Destacamos las siguientes:

- Microdeleciones NF1. En general estos pacientes presentan sintomatología más severa que el resto de los pacientes con NF1. Estos pacientes pueden presentar más de 1.000 neurofibromas y tienen un mayor riesgo de desarrollar MPNST. Además, presentan rasgos dismórficos, retraso en el desarrollo y discapacidad intelectual.
- Mutaciones con cambio de sentido en los codones 844–848 de la proteína NF1 (Leu844, Cys845, Ala846, Leu847, and Gly848). Estos pacientes presentan también un fenotipo severo, un gran número de NFp, neurofibromas espinales sintomáticos, gliomas ópticos y anomalías esqueléticas. Además, presentan un mayor riesgo de desarrollar MPNST.
- Mutaciones con cambio de sentido como pMet1149, pArg1276 y pLys1423. Estos pacientes tienen un fenotipo más leve, desarrollan un bajo número de neurofibromas.
- Mutaciones de delección en p.Met992del, la sustitución pArg1809 o la mutación con cambio de sentido Arg1038Gly. Estos pacientes tienen un fenotipo leve, no presentan neurofibromas plexiformes.

Es necesario seguir estudiando estas relaciones que podrían ayudar con el pronóstico y tratamiento de estos pacientes. El seguimiento de pacientes con mayor riesgo de desarrollar MPNST podría ser fundamental.

1.2.4. Terapias actuales

La neurofibromatosis, como se ha indicado previamente, afecta a gran variedad de órganos. Por ello, el manejo de pacientes con esta enfermedad es también multidisciplinar (52).

Respecto a las terapias actuales para el tratamiento de los neurofibromas:

- Los neurofibromas cutáneos no suelen recibir tratamiento, si se presenta prurito como sintomatología se suele dar antihistamínicos o gabapertina (42).
- Los neurofibromas plexiformes se tratan generalmente mediante eliminación con cirugía, lo que puede suponer un desafío importante en aquellos pacientes con un gran número de estas lesiones.

En 2020 la agencia americana del medicamento (FDA, por sus siglas en inglés) y en 2021 la agencia europea del medicamento (EMA, por sus siglas en inglés) aprobaron el uso de Koselugo (selumetinib), un bloqueante de las enzimas MEK1/2. Este medicamento se utiliza para tratar los neurofibromas plexiformes cuando presentan síntomas y no pueden extirparse mediante cirugía en pacientes pediátricos de 3 años en adelante con neurofibromatosis de tipo 1 (53) (54) (55).

Actualmente, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con neurofibromatosis, entre ellos destacan los inhibidores de MEK1/2 y de tirosina quinasa.

1.3. TUMORES DE LA VAINA DEL NERVIIO PERIFÉRICO (MPNST)

Los MPNSTs son sarcomas raros y agresivos de tejido blando cuya incidencia es de un 0.001% en la población general. Tienen gran capacidad de producir metástasis (56). Más del 50% de MPNSTs se producen en el contexto de la neurofibromatosis de tipo 1. Entre el 8-12% de personas con NF1 desarrollan este tipo de tumor a lo largo de su vida. Debido al alto porcentaje de desarrollo de MPNST y la agresividad de este tumor, es una de las principales

causas de muerte de las personas con neurofibromatosis. La supervivencia a los 5 años de los pacientes con MPNST es del 34% (57). No obstante, el 45% de los MPNSTs ocurren de forma esporádica, y el 5% como consecuencia de radioterapia. Los MPNSTs de tipo esporádico suelen aparecer en edades más tardías, son más pequeños y tienen mejor pronóstico (58) (59).

Las células que forman este tipo de tumor son, principalmente, las células de Schwann (**Figura 4**). Estas células, como se ha explicado previamente, pueden evolucionar a células de neurofibromatosis con la pérdida funcional de la proteína NF1. La mutación inactivadora del componente del ciclo celular CDKN2A favorece la progresión de NFp a neoplasia neurofibromatosa atípica de potencial biológico desconocido (ANNUBP). Este estadio se caracteriza por atipia nuclear, hipercelularidad y aumento de la actividad mitótica y su potencial maligno es incierto.

La pérdida del complejo PRC2, encargado de la metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27Me3), lleva a la progresión en MPNST. Otras mutaciones que se han descrito en el contexto de MPNST son mutaciones en los genes *EGFR*, *PTEN* y *TP53* (60) (61).

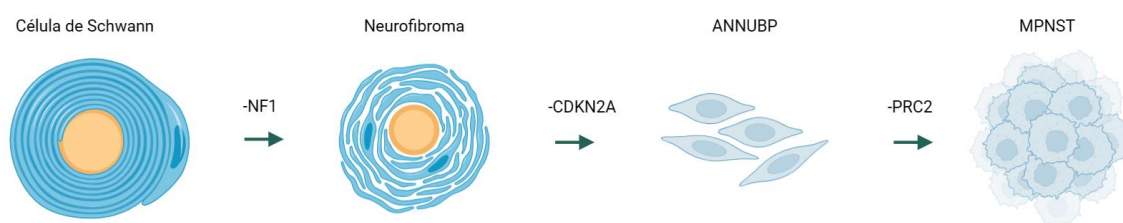


Figura 4. Progresión de las células de Schwann a MPNST. La célula de Schwann normal puede tener una pérdida funcional de NF1 y convertirse en neurofibroma. La pérdida adicional de CDKN2A propicia la progresión a ANNUBP que, sumado a la mutación de PCR2 permite la progresión a MPNST. (Elaboración propia)

1.3.1. Criterios diagnósticos de MPNST

El diagnóstico de MPNST puede ser complejo, algunos de estos tumores no presentan síntomas en una primera instancia. No obstante, hay algunos criterios que ayudan al diagnóstico de los pacientes con esta enfermedad (59) (62) (63):

- Criterios clínicos.
Un paciente que presenta nuevos síntomas neurológicos (p. ej., hipoestesia o disestesia), dolor y/o agrandamiento asociado a un NFp previamente conocido, normalmente debe ser diagnosticado de MPNST.
- Criterios radiológicos.
La imagen por resonancia magnética es, principalmente, el método de imagen más utilizado en el diagnóstico de sarcoma. Esta técnica ayuda a discernir entre NFp y MPNST cuando se analizan ciertas características del tumor como un edema peritumoral circundante, márgenes irregulares y/o localmente invasivos. Por otro lado, en los últimos años la tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada (PET/CT) está empezando a utilizarse como criterio diagnóstico en MPNST.
- Criterios histopatológicos.

En primer lugar, se tienen en cuenta los criterios morfológicos, como la presencia de células fusiformes con márgenes citoplasmáticos indistintos y núcleos en forma de S.

Los MPNSTs carecen de marcadores moleculares distintivos para su diagnóstico. No obstante, algunos marcadores pueden ser útiles en el diagnóstico, como la expresión de S100 o SOX10, la inactivación de PRC2 o el perfil de metilación de MPNST (H3K27me3). Además, los marcadores KI67, TP53, CD34, P16 también son utilizados para el diagnóstico histopatológico.

1.3.2. Rutas de señalización importantes en el desarrollo de MPNST

Es importante estudiar cuáles son las vías de señalización claves en el desarrollo tumoral, esta información puede ser clave en la búsqueda de tratamientos efectivos para esta enfermedad, así como para poder comprenderla. Entre las rutas más relevantes en el desarrollo de MPNST, destacamos (**Figura 5**) (64) (65):

- Ruta RAS-MEK-ERK y Ruta PI3K-AKT-mTOR. Los pacientes con MPNST, al igual que los pacientes con NF1, tienen una mutación inactivadora en *NF1*. La pérdida de funcionalidad de la neurofibromina se traduce en una proteína RAS, que no se inactiva. La forma activa de RAS recluta la proteína RAF y activa de forma constitutiva la ruta de señalización RAS-MEK-ERK. La proteína RAS activada, es capaz también de activar PI3K, lo que permite el accionamiento de diferentes componentes de la ruta de señalización PI3K-AKT-mTOR. La activación constitutiva de estas dos rutas de señalización celular se traduce en un aumento de la proliferación celular y de la supervivencia (66).
- Ruta Wnt. Componentes de la vía de señalización Wnt se han visto desregulados en pacientes con MPNST y parecen tener un papel relevante en el desarrollo tumoral. Se ha identificado una proteína en concreto, WNT5A, que actúa como supresor tumoral regulando el microambiente tumoral. Otros componentes como CXCR4 y CXCL12 estabilizan la β -catenina y esta a su vez, permite la progresión del ciclo celular y aumenta el crecimiento del tumor estimulando la ciclina D1(67) (68).
- HIPPO-YAP/TAZ. Se ha registrado un aumento de la expresión de esta vía de señalización en pacientes con MPNST. Normalmente se asocia a los genes LATS1, LATS2, MST1, y MST2. La hiperactivación de esta vía de señalización lleva a un aumento de la proliferación celular (69).
- Ruta de señalización JAK-STAT. La sobreexpresión del receptor EGFR, o de los componentes JAK3 y STAT3 se ha relacionado con la activación de la ruta de señalización JAK-STAT y con el aumento del desarrollo de MPNST (70).

Además, la mayor parte de los MPNSTs se han asociado con mutaciones funcionalmente inactivadoras en las cascadas de señalización p19 – MDM2 – p53 y p16 – ciclina D – retinoblastoma (Rb) (71).

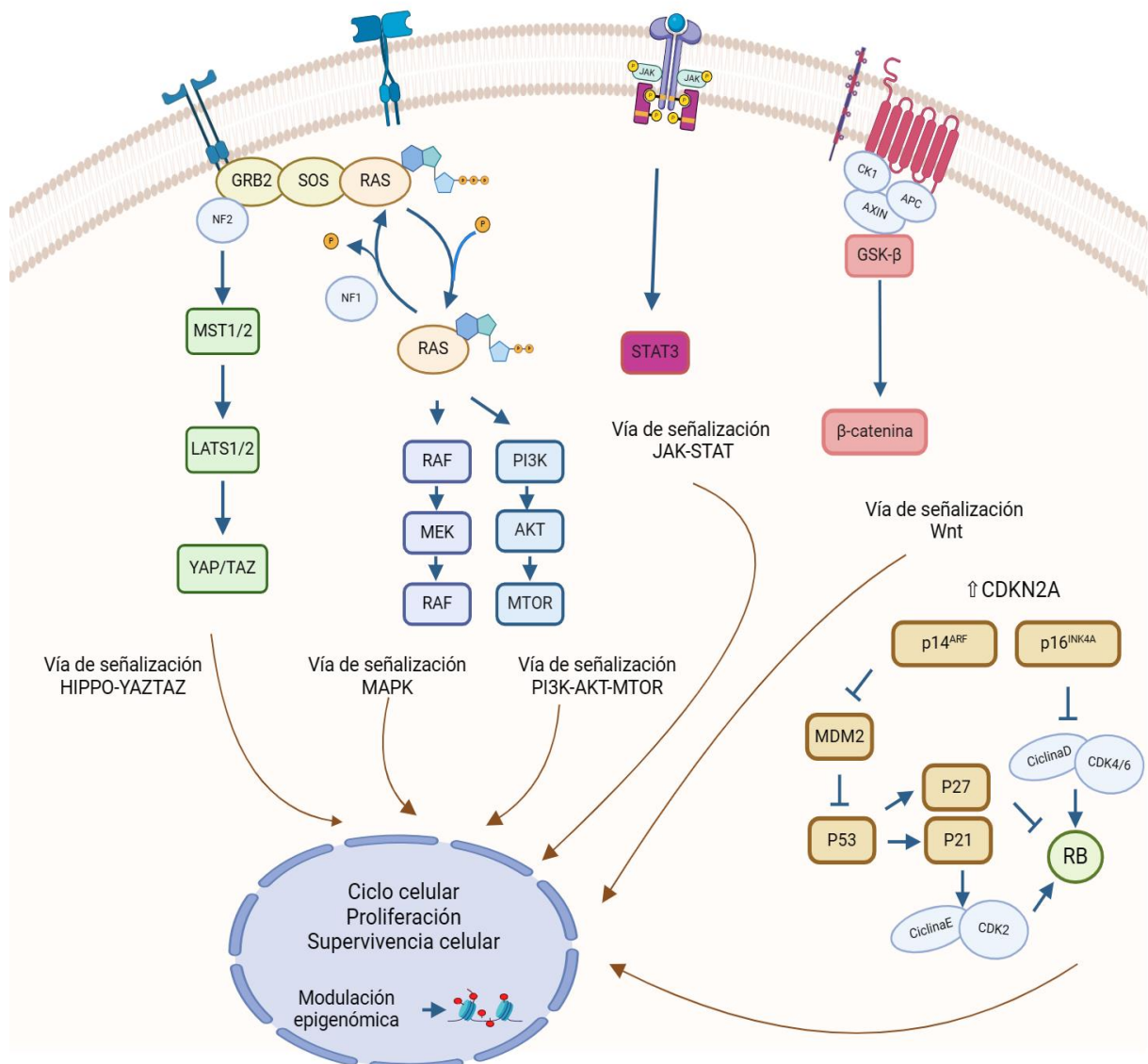


Figura 5. Vías de señalización implicadas en el desarrollo de tumores de la vaina del nervio periférico (MPNST). Representación gráfica de las vías de señalización que han sido relacionadas con la regulación del ciclo celular, proliferación y supervivencia celular en el desarrollo de MPNST. (Elaboración propia)

1.3.3. Terapias actuales para MPNST

Actualmente los principales tratamientos para el MPNST son:

- Cirugía. La resección de los tumores dejando márgenes negativos es la terapia más eficaz actualmente. La resección total de los tumores disminuye la recurrencia y aumenta la supervivencia a los 5 años (65) (72).
- Quimioterapia. En pacientes con tumores no extirpables, avanzados o metastásicos se utiliza terapia basada en antraciclinas, utilizadas normalmente para el tratamiento de sarcomas de tejido blando. Otros tratamientos como el alquilante ifosfamida y el inhibidor de la topoisomerasa II etopósido también son utilizados para el tratamiento de MPNST (73).

- Radioterapia. La radioterapia se realiza normalmente como adyuvante en el tratamiento de tumores de alto grado con un tamaño mayor a 5 centímetros o en pacientes con tumores de bajo grado después de la escisión marginal del tumor (74).
- Terapias diana. Actualmente, no existen terapias aprobadas por las dos principales agencias del medicamento del mundo para el tratamiento de MPNST. Varios ensayos clínicos se están realizando en la actualidad para solventar el problema del tratamiento de estos tumores. Estas terapias tienen como diana las vías de señalización desreguladas en estos tumores que hemos mencionado en el apartado anterior.

Actualmente, aproximadamente 60 ensayos clínicos se están realizando en el mundo para encontrar un tratamiento para los MPNST. Entre los ensayos clínicos consistentes en terapias dirigidas, destacamos los siguientes (**Tabla 1**) (75):

Fármaco	Tipo	Fase
Selumetinib+Sirolimus	Inhibidor MEK + Inhibidor mTOR	Fase II
Erlotinib hydrochloride	Inhibidor del receptor EGFR	Fase II
Everolimus+Bevacizumab	Inhibidor mTOR+ Inhibidor angiogénesis	Fase II
Selinexor	Inhibidor de la exportina 1	Fase I
Dasatinib	Inhibidor de la tirosina quinasa	Fase II
Imatinib mesylate	Inhibidor de la tirosina quinasa	Fase II
Sorafenib	Inhibidor de la tirosina quinasa	Fase II

Tabla 1. Ensayos clínicos basados en terapias dirigidas.

- Inmunoterapia. La inmunoterapia en los últimos años está adquiriendo gran importancia en el tratamiento de muchos tipos de cáncer. Estudios recientes han descrito una infiltración de células T citotóxicas y reguladoras en MPNST, esto podría sugerir que los inhibidores de los puntos de control inmunitario podrían ser un buen tratamiento. No obstante, la heterogeneidad de estos tumores hace complejo el estudio de tratamientos de inmunoterapia. A pesar de esto, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos de este tipo de terapia, como la tecnología MASCT-I, células CART B7H3 o células CAR T EGFR806 (76).
- Virus oncolíticos. En los últimos años, este tipo de terapia ha emergido como tratamiento prometedor para MPNST. Actualmente, se está realizando la fase I de un ensayo clínico con vacunas de virus modificados que pueden expresar el gen NF1 sin afectar a células normales y pueden ayudar al cuerpo a desarrollar una respuesta inmune efectiva (75).

Como se ha descrito anteriormente, los MPNST presentan una firma transcriptómica única que se distingue de las células de Schwann normales y de los neurofibromas. Atacar los programas transcriptómicos desregulados en el cáncer ha emergido en los últimos años como una estrategia terapéutica prometedora. Es por ello que, en esta tesis, decidimos estudiar el papel de las proteínas reguladoras del ARN, reguladores cruciales de los programas de regulación génica.

1.4. PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN

Las proteínas de unión al ARN son un grupo de proteínas que, como su propio nombre indica, se unen al ARN regulando los procesos transcripcionales y postranscripcionales como el empalme (*splicing*), exportación núcleo-citosol, localización, traducción y degradación (76).

Las RBPs junto con el ARN pueden formar estructuras complejas denominadas partículas ribonucleicas (RNPs, por sus siglas en inglés), que son dinámicas por naturaleza y pueden cambiar en función de la maduración y estado funcional del ARN, así como del contexto celular. Aproximadamente el 7.5 % de los genes del genoma humano codifican para proteínas que regulan el metabolismo del ARN, uniéndose a este o formando parte de los RNPs (77). Generalmente las RBPs se expresan de forma ubicua en el organismo, aunque alrededor del 2 % de ellas pueden ser específicas de un tejido.

Las RBPs se unen al ARN mediante dominios de unión al ARN (RBDs, por sus siglas en inglés) (78), atendiendo a esta característica podemos clasificar las RBPs en:

- RBPs clásicas. Se caracterizan por la presencia de uno o más RBDs. Estos dominios pueden ser el motivo de reconocimiento del ARN (RRM), homólogo K (KH), helicasa DEAD-DEAH, y otros dominios con menor presencia.
- RBPs no clásicas. Se caracterizan por tener RBD no canónicos. Es el caso de los ribosomas y los componentes del *spliceosoma*. Destacan en esta categoría los dominios GTP EFTU, GTP, EFTU D2, SAP, zf-CCHC, LSM, R3H.
- Otras. La mayor parte de las proteínas consideradas RBPs no presentan RBDs conocidos. Las proteínas de esta clase han sido identificadas como RBPs mediante alguno de los métodos de identificación de este tipo de proteínas, pero el dominio por el cual se unen al ARN se desconoce.

1.4.1. Mecanismo de acción – unión al ARN

La forma en que las RBPs se comunican con sus efectores podría implicar una red de interconexiones más compleja de lo que se pensaba previamente (79).

Las RBPs pueden unirse al ARN de diferentes modos, la forma en la que se produce esta unión puede ser determinante para su función. Se conocen los siguientes modos de unión:

- Unión de alta especificidad por el ARN. Las RBPs con RBDs clásicos reconocen y se unen a secuencias de ARN específicas.
- Unión de baja especificidad por el ARN. Las RBPs que no tienen especificidad por el ARN como son las RBPs implicadas en la traducción que se unen a miles de ARNm distintos.
- Unión de ARN a través de la interacción proteína-proteína. La unión de las RBPs a otros factores unidos previamente al ARN permite su interacción con el ARN. Es el ejemplo del complejo de unión a exones (ECJ, por sus siglas en inglés).
- Unión de ARN por regiones desordenadas de proteínas: co-plegamiento. El motivo de repetición (RRM, por sus siglas en inglés) formado por una arginina (Arg) y varias glicinas (Gly) produce un cambio conformacional que permite la unión al ARN.
- Interacciones mediadas por la complementariedad de formas. Algunos ARNs tienen formas complementarias a proteínas, permitiendo su unión por complementariedad. Es

el caso de algunas proteínas virales cuya conformación es complementaria a las subunidades ribosomales.

- **Complejo *scaffold*.** Algunos ARNs son capaces de secuestrar varias RBPs con la finalidad de producir estructuras complejas. Esta función se ha descrito en algunos lncRNAs.
- **Modulación de la actividad proteica.** Ciertos ARNs pueden unirse a RBPs y regular su función favoreciendo, por ejemplo, la dimerización de estas.
- **Las enzimas metabólicas trabajan en la unión al ARN.** Algunas enzimas metabólicas se han identificado como RBPs. La unión del ARN a estas enzimas podría modular la localización o la actividad de una enzima, por ejemplo, afectando a una reacción enzimática secundaria, por control alostérico o proporcionando un *scaffold* que organice complejos multienzimáticos e incluso vías de señalización.

La regulación de los sitios de unión RBP-ARN y de sus funciones también puede verse afectada por modificaciones postraduccionales (PTMs) de residuos de RBPs. Entre estas modificaciones destacamos la fosforilación, la acetilación y la metilación de argininas. Estas modificaciones introducen cargas electrostáticas que pueden afectar a la estabilidad estructural de los sitios de unión con el ARN, así como de la capacidad de unión con otras proteínas (80). El complejo RBP-ARN opera de manera cooperativa, donde ambos componentes afectan la función del otro. Mediante esta unión, las RBPs pueden regular diferentes procesos del ARN (**Figura 6**):

- **Transcripción de genes.** Algunas RBPs pueden regular ARNs que interactúan con la cromatina y que regulan los estados epigenéticos y transcripcionales. SRSF2 se une a los promotores de los genes, reclutando una serie de proteínas claves en la elongación, y, por tanto, activando la transcripción (79) (81).
- **Poliadenilación.** La incorporación de los 200 nucleótidos de adeninas tiene un efecto importante para el transporte, la traducción y la estabilidad del ARNm. Es dependiente de algunas RBPs, como por ejemplo CPSF, que actúa junto con PABPN1 para estimular la actividad de la polimerasa poliA (82).
- **Modificaciones del ARN.** La edición de ARN más frecuente es el cambio de adenosina por inosina, como consecuencia se produce una molécula de ARN diferente al producto inicial lo cual puede generar productos distintos. Las RBPs encargadas de realizar estas modificaciones son las ADAR. Otras modificaciones importantes, como N6-metiladenosina (m6A), ribosemetilación (2'-O-Me), 8-oxo-dihidroguanosina (8-oxoG), pseudouridina (Ψ), 5-metilcitidina (m5C) y N4-acetilcitidina (ac4C), pueden afectar a la estabilidad y traducción del ARNm (83).
- **Localización de ARNm.** Es crítica para la expresión génica. Las secuencias de localización de acción cis dentro de los ARNm maduros son reconocidas por las RBPs citoplasmáticas, estas pueden reclutar proteínas motoras y represoras de la traducción. Entre este tipo de RBPs podemos destacar IGF2BP (84).
- **Estabilización del ARNm.** Este mecanismo está muy relacionado con la traducción. Es el caso de HuR estabiliza algunos ARNm permitiendo la formación de mayor número de proteínas implicadas en procesos de, por ejemplo, proliferación (85).
- **Traducción.** Es un mecanismo rápido de control de la expresión génica. Entre otros, ZBP1 actúa bloqueando el inicio de la traducción del ARNm de la beta actina (83).

- **Biosíntesis y regulación de la función de los miARNs.** Las RBPs tienen un papel crucial en la biogénesis de miARNs en diferentes fases del proceso. Además, la unión de RBPs al complejo RISC permite también su regulación (86).

Una misma RBP puede realizar varias de las funciones descritas, y esto suele depender del compartimento celular en el que se localice.

El *splicing* y el *ARN decay* son procesos importantes en la regulación del ARN, y, por el contexto de la presente tesis es necesario un desarrollo más completo en la explicación de estos dos mecanismos.

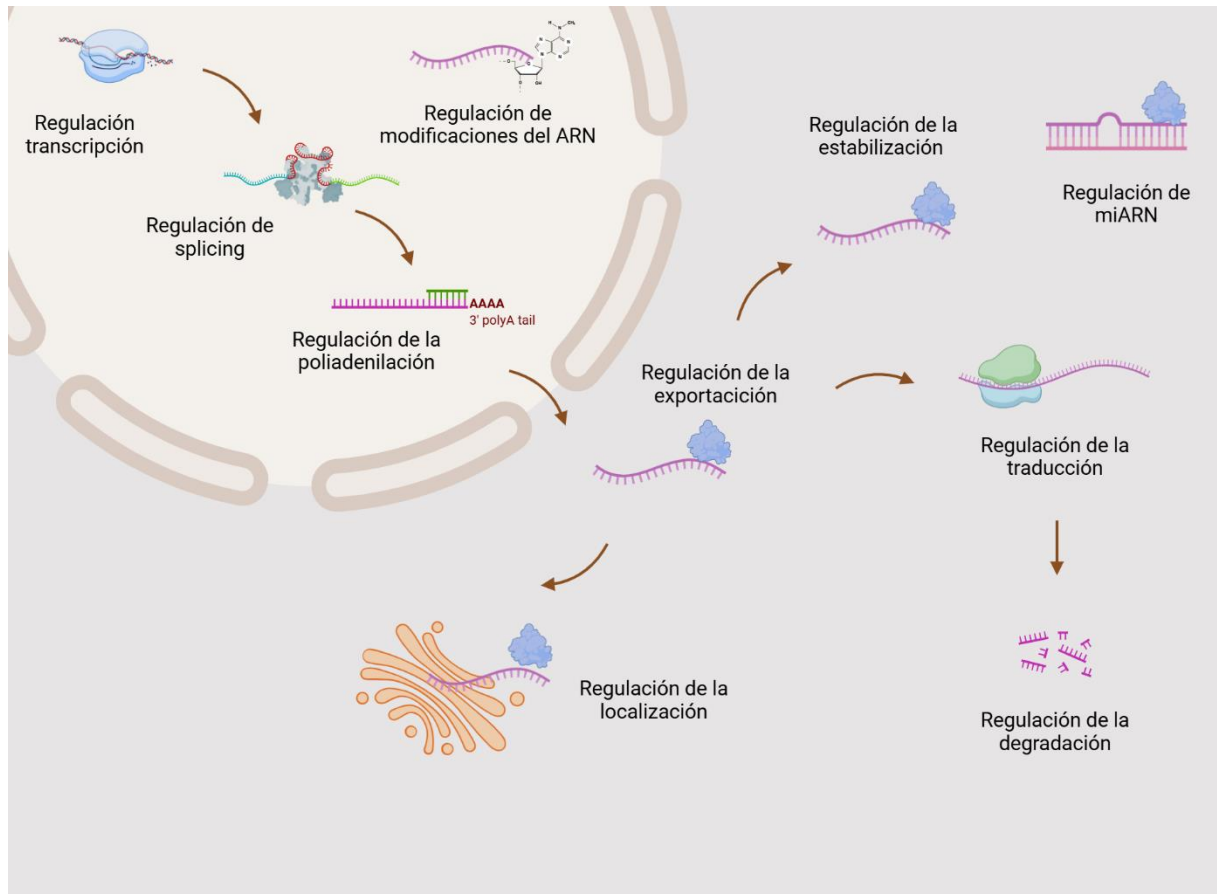


Figura 6. Mecanismos de acción de las proteínas de unión al ARN. Las RBPs regulan diferentes procesos en la vida del ARN desde el comienzo regulando la transcripción, el *splicing* y la poliadenilación hasta modificaciones de ARN, exportación núcleo citosol, estabilización, traducción y degradación. También es capaz de regular procesos que afectan los miARNs, como la biogénesis. (Elaboración propia)

1.4.1.1. *Splicing*

El *splicing* es un proceso esencial en la regulación génica y puede regular aspectos de la proliferación celular, supervivencia y diferenciación.

La mayoría de los genes en humanos están compuestos por exones (regiones codificantes) e intrones (regiones no codificantes). La eliminación de los intrones y el empalme de los exones se produce en el espliceosoma en un proceso conocido como *splicing*. En la regulación del *splicing* intervienen varios elementos: en primer lugar, los sitios de *splicing*, en segundo lugar, los elementos de acción cis, unas secuencias cortas del pre-ARNm que modulan la unión de proteínas reguladoras que estimulan o reprimen el ensamblaje de complejos del espliceosoma,

y, en tercer lugar, los elementos de acción trans, que consisten en RBPs y factores de *splicing* que forman el espliceosoma. El espliceosoma es un complejo formado por cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, por sus siglas en inglés) que se asocian con el ARN nuclear pequeño (snRNA, por sus siglas en inglés) posicionadas espacialmente para la catálisis (91). La conformación y la composición del espliceosoma es altamente dinámica, más de 300 proteínas se asocian con el espliceosoma para su regulación, lo que le confiere flexibilidad y precisión.

El *splicing* alternativo ocurre cuando se incluyen algunos exones, intrones o regiones de estos de forma diferencial, produciendo a partir de un mismo pre-ARNm diferentes moléculas ARNm. El 95% de los genes multiexones humanos se empalman alternativamente para codificar múltiples proteínas diferentes con la finalidad de mantener la especiación y complejidad fenotípica. Existen cinco principales tipos de *splicing* alternativo (AS, por sus siglas en inglés):

- *Exon skipping* (AltEX)



- *Intron retention* (IR)



- Exclusión mutua de exones



- *Alternative 3' splice site* (Alt3)



- *Alternative 5' splice site* (Alt5)



El proceso de *exon skipping* implica la eliminación de un exón específico. El proceso de *intron retention* consiste en un intrón que pasa a formar parte del ARNm. La exclusión mutua de exones produce dos exones que aparecen de forma alternativa en el ARNm final. Los sitios de AS incluyen uniones alternativas de espliceosoma para el sitio 3' (sitio aceptor) y 5' (sitio donante), denominados *alternative 5' splice site* y *alternative 3' splice site* (88).

La distribución de las variantes de *splicing* es dependiente del tejido, es por ello por lo que cada tejido tiene sus propias células con diferentes funcionalidades. Se estima que el 50% de los genes presentan *splicing* alternativo dependiendo del tejido (89).

Un correcto *splicing* alternativo depende de varios elementos, como de la presencia de los elementos cis apropiados, del ensamblaje del espliceosoma, de interacciones específicas ARN-proteína y de numerosos factores de *splicing* presentes en el tejido específico. Una modificación en uno de estos elementos puede modificar la función de las proteínas generadas por un pre-mRNA lo cual, puede interferir en diferentes procesos celulares (88).

1.4.1.2. mRNA decay

El ARNm después de la transcripción es protegido por dos estructuras: la capucha 7' metil-guanosina (cap 5') y la cola 3' poliA. Estas estructuras ayudan al ARN a protegerse de las exonucleasas y a iniciar su traducción. La ratio de degradación depende de cada ARNm. En las

células humanas, los transcritos pueden tener una vida media que puede variar entre 30 minutos y varias horas. Para mantener una correcta función celular, es necesario encontrar un equilibrio entre la transcripción y la degradación del ARNm. Esto se debe a que ayuda a mantener los niveles de ARN en un estado estacionario y regula la expresión génica (89) (90). Además, la existencia de diferentes enzimas con la misma función, degradar el ARNm, refuerza la importancia de este mecanismo en la homeostasis celular (91).

La degradación del ARNm depende de elementos cis, secuencias específicas en el ARNm, y de elementos trans, que comprenden un amplio número de factores reguladores que reclutan las enzimas de degradación. Los tres principales modos de degradación del ARNm son:

- Degradación del ARNm dependiente de deadenilación. Es la ruta más frecuente. Las enzimas deadenilasas retiran la cola de poliA. Una vez eliminada pueden optar, a su vez, por dos vías:
 - Degradación $5' \rightarrow 3'$. Requiere la eliminación de la capucha $5'$ para que la enzima XRN1 pueda actuar degradando el ARNm.
 - Degradación $3' \rightarrow 5'$. No requiere la eliminación de la caperuza, es eliminado por la acción del exosoma empezando por el extremo $3'$.
- Degradación de ARNm independiente de deadenilación. Se requiere la maquinaria de eliminación de la caperuza por un mecanismo diferente al anterior. La degradación se produce en la dirección $5' \rightarrow 3'$.
- Degradación mediada por endonucleasas. Una endonucleasa divide el ARNm en dos fragmentos que son degradados por las enzimas encargadas de la eliminación en las direcciones $5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$.

Algunos datos sugieren que la vía que mayor número de ARNm degrada es la vía $5' \rightarrow 3'$. La ruta $3' - 5'$ está especializada en ARNm concretos (92).

La degradación del ARNm es un proceso interconectado la transcripción y la traducción. La degradación del ARNm compite con la traducción por los transcritos. La eliminación de la caperuza $5'$ es fundamental para la inhibición de la traducción. Se ha demostrado que la disfunción de la degradación del ARNm, en particular en la vía de descaperuzamiento, es crucial en la proliferación celular, la apoptosis y la propagación viral (93).

1.4.2. Enfermedades asociadas a proteínas de unión al ARN

La regulación génica mediada por las proteínas de unión al ARN es importante en la homeostasis y en la enfermedad. Las RBPs regulan la expresión de múltiples genes por lo que, cualquier cambio en sus niveles de expresión, puede contribuir con el desarrollo de diferentes patologías. Las patologías que se han asociado con RBPs son: cáncer, enfermedades de riñón, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades metabólicas, enfermedades neuromusculares e infecciones (94) (95) (96).

Las enfermedades asociadas a estas proteínas se producen por su desregulación o por mutaciones somáticas o mendelianas. No obstante, la patogénesis de las enfermedades asociadas a proteínas de unión al ARN se desconoce en muchos de los casos. Las mutaciones asociadas a RBPs pueden afectar a la función de estas de diversas formas (78):

- Mutaciones en genes que codifican para RBPs pueden alterar el nivel de expresión de la proteína o la ratio entre diferentes isoformas que no realicen la misma función.
- Mutaciones que trunquen la proteína o que impidan la correcta interacción de esta con cofactores.
- Mutaciones que afectan a la actividad enzimática en proteínas que poseen ese rol.
- Mutaciones en sitios de unión a ARN, que pueden afectar a la función de estas proteínas como RBPs.

Aproximadamente en un tercio de las RBPs, se han encontrado mutaciones asociadas con enfermedades. Esto respalda la importancia de esta clase de proteínas en la homeostasis celular.

1.4.3. RBPs y cáncer.

Los mecanismos de control postranscripcional están desregulados en muchos tipos de cáncer. Como se ha mencionado previamente, las proteínas de unión al ARN son unas de las principales reguladoras de este proceso. Las RBPs pueden tener una expresión diferencial o una actividad desregulada en el proceso tumoral (97).

Según EuRBPdb, una base de datos que recoge información sobre este tipo de proteínas, 951 RBPs tienen una expresión diferencial en cáncer respecto al tejido normal, de las cuales, 96 se expresan diferencialmente en más de 10 tipos de cáncer (**Figura 7**) (98).

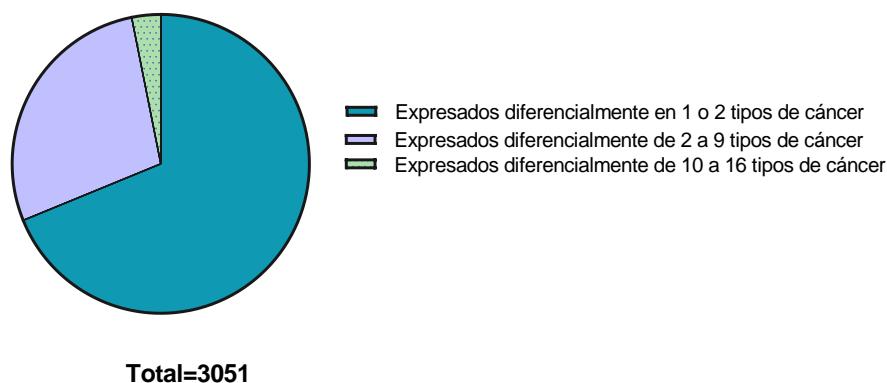


Figura 7. RBPs distribuidas en función del número de tipos de cáncer a los que afecta. (Elaboración propia)

Se ha estudiado la expresión de estas proteínas en varios tipos de cáncer. Un estudio defiende que las RBPs están sobrerreguladas en cáncer respecto al tejido sano (99) mientras que otro estudio defiende que las RBPs se expresan mayoritariamente menos en cáncer que en tejidos sanos (100). La alteración de la expresión de estas proteínas puede contribuir a la regulación de oncogenes o de genes supresores de tumores.

Las células tumorales utilizan los mecanismos postranscripcionales para modular rápida y eficazmente los niveles de expresión de las proteínas, y para facilitar la adaptación rápida a señales internas y externas. Se han identificado múltiples RBPs relacionadas con diferentes procesos del desarrollo tumoral como la proliferación, la apoptosis, senescencia, transición epitelio-mesénquima, metástasis o quimioresistencia. La regulación de estos procesos se da por diferentes mecanismos (101) (102):

- *Splicing* alternativo. Este proceso es realizado principalmente por RBPs. Se ha visto un cambio en el patrón de las variantes alternativas de *splicing* en cáncer respecto a los

tejidos sanos. Las variantes de *splicing* contribuyen a la diversidad de las proteínas en cáncer. Estas alteraciones pueden modular oncogenes o genes supresores de tumores teniendo un efecto en la apoptosis, proliferación y ciclo celular.

- Regulación de microRNAs. La alteración de la expresión de las RBPs está relacionada con el deterioro del procesamiento de algunos miARNs, lo que puede modular los ARNm diana relacionados con la progresión y el desarrollo del cáncer.
- Poliadenilación alternativa. Ha demostrado ser un importante contribuyente a la diversidad del transcriptoma. Es un proceso crítico para generar transcritos de ARN maduro, llevado a cabo por proteínas que han sido reclutadas por RBPs. Este proceso se relaciona de forma directa con la estabilidad, localización nucleocitoplasmática y traducción del ARN, pudiendo traducirse en mayor medida proteínas implicadas en procesos de ciclo celular, proliferación y otros procesos del desarrollo tumoral.
- Localización del ARN. La localización de ARNm y lncRNA es regulada por RBPs. Esta puede verse afectada en cáncer. Los cambios de localización del ARNm pueden afectar a los niveles de expresión de oncogenes y de genes supresores de tumores.
- Estabilidad del ARN. Es un proceso clave para la protección de las moléculas de ARNm frente al ARNm *decay* y para la traducción de estas. Algunas RBPs estabilizan algunos ARN mensajeros importantes en procesos tumorales.
- ARNm *decay*. Las RBPs pueden desestabilizar algunas moléculas de ARNm acelerando su degradación. Estos ARN mensajeros pueden provenir tanto de genes supresores de tumores como de genes anti-apoptóticos.
- Regulación de la traducción. Las RBPs forman parte de diferentes pasos en el proceso de traducción y pueden regular la eficiencia de la misma. El control de la traducción está regulado en el cáncer, la sobreexpresión de algunas RBPs puede mejorar la eficiencia de traducción de proteínas implicadas en la supervivencia, proliferación y otros procesos del desarrollo tumoral.

1.4.4. Terapias actuales para proteínas de unión al ARN

En los últimos años, las terapias que tienen como diana molecular las proteínas de unión al ARN están siendo muy relevantes. El descubrimiento de nuevas moléculas ha sido esencial para el desarrollo de estas terapias. Podemos dividir estas terapias en dos tipos (77) (79) (101):

- Directa sobre las proteínas de unión al ARN.
 - Sobreexpresión de RBPs.
 - Silenciamiento o reducción de proteínas que se expresan más en una enfermedad.
 - Bloqueo de las modificaciones postraduccionales de las RBPs necesarias para el cambio de conformación que permite la unión al ARN.
- Indirecta. Este tipo de moléculas se han creado con el fin de bloquear la interacción entre RBP y ARN, con el objetivo de tener un efecto en la proliferación o supervivencia.
 - Moléculas pequeñas. De los compuestos que tienen RBPs como diana terapéutica, es el tipo más utilizado en la actualidad. Se utilizan para inhibir la función de las RBPs por diferentes vías como, por ejemplo, uniéndose al dominio RBD e impidiendo así la unión RBP-ARN.

- Nanopartículas de ARN interferente (siRNAs por sus siglas en inglés). Son utilizadas como terapias dirigidas y han demostrado ser clínicamente seguras y eficaces. Se pueden utilizar este tipo de moléculas contra una RBP diana.
- Péptidos sintéticos. Son moléculas pequeñas con alta especificidad, selectividad, facilidad de modificación y biocompatibilidad.
- Oligonucleótidos. Son análogos de ADN monocatenario diseñados para unirse al ARN mediante el apareamiento de bases *Watson-Crick*. Se unen al ARN impidiendo la producción de la proteína.
- Aptámeros. Son pequeñas moléculas de ADN o ARN o de naturaleza proteica con alta especificidad y afinidad para unirse a las dianas. Funcionan de forma similar a los anticuerpos, se unen a secuencias específicas e impiden la unión RBP-ARN.
- ARN circular. Son moléculas de ARN que se pliegan formando un círculo y pueden regular la función de las RBPs actuando como esponja o señuelo, inhibiendo de esta forma su unión al ARN.
- CRISPR-Cas9. Esta tecnología innovadora se puede usar para editar el sitio de unión RBP-ARN o corregir mutaciones de RBPs.

1.4.5. Métodos de identificación de RBPs

En los últimos años, el número de RBPs conocidas ha aumentado de forma exponencial. Actualmente, 4.280 proteínas se han identificado como parte de esta familia. El aumento de la cantidad de RBPs conocidas se debe al desarrollo de múltiples técnicas innovadoras para su identificación:

- Métodos basados en la captura con oligod(T).
 - Captura del interactoma del ARN (RIC, por sus siglas en inglés). Este método consiste en la unión covalente de proteína y ARN mediante UV y la posterior precipitación mediante *beads* con oligod(T). Tiene diferentes variaciones para la mejora de la captura del interactoma como el eRIC. (103) (104).
 - Mapa de los dominios de unión al ARN (RBDmap, por sus siglas en inglés). El flujo de trabajo de este método es similar al del protocolo RIC. No obstante, después de la unión covalente de proteína y ARN mediante UV y la posterior precipitación mediante *beads* con oligod(T), se realiza una digestión con LysC y ArgC. Esto permite la identificación de los sitios de unión de las RBPs al ARN (105).
 - Purificación por afinidad de péptidos con crosslinking (pCLAP, por sus siglas en inglés). Es un método muy similar al descrito anteriormente, el RBDmap. Se realizan los pasos de unión proteína y ARN mediante luz UV y de precipitación con oligod(T). No obstante, la preparación de la muestra no requiere el intercambio de tampones y la espectrometría de masas es de un solo tiro, por lo que el método es más rápido (106).
- Métodos basados en química *click*.
 - Química asistida RIC (CARIC, por sus siglas en inglés). Este método combina la unión covalente de proteína y ARN mediante UV con el marcaje metabólico con dos análogos del nucleótido uridina (5-etinilurina [EU] y 4-tiouridina

- [4SU]). Se realiza una reacción *click* con azida-biotina con posterior enriquecimiento mediante la precipitación con *beads*. Las proteínas precipitadas son identificadas mediante proteómica. Este método permite identificar RBPs independientemente del estado de poliadenilación del ARN (107) (108) (109).
- Interactoma del ARN usando el método *click* (RICK, por sus siglas en inglés). Al igual que el método CARIC, se realiza un marcaje metabólico con EU. Se realiza la unión covalente de proteína y ARN mediante UV, una reacción *click* con biotina y el enriquecimiento mediante la precipitación con *beads* (110).
 - Métodos basados en la diferencia de solubilidad.
 - Separación de fases orgánicas ortogonales (OOPS, por sus siglas en inglés). Este método consiste en la generación de uniones covalentes de proteína y ARN y en la posterior separación de fases con la utilización de ácido guanidinio-tiocinato-fenol-cloroformo. Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de ARN les permiten migrar a la fase acuosa, las proteínas, por otro lado, migran a la fase orgánica. En la fase intermedia, se disponen las proteínas unidas al ARN. Estas últimas son purificadas e identificadas. Este método nos permite con una baja cantidad de muestra de partida identificar ARN largos no codificantes (lncARNs, por sus siglas en inglés) y RBPs (111).
 - Extracción fenol Toluol (PTex, por sus siglas en inglés). El principio de esta técnica es similar a OOPS. Se generan uniones covalentes de proteína y ARN y se realiza una separación de fases con la utilización fenol-tolueno. Las fases generadas son las mismas que en la técnica OOPS (112).
 - Extracción de ARN de proteínas con crosslinking. (XRNAX, por sus siglas en inglés) El principio de esta técnica es similar a OOPS. Se generan uniones covalentes de proteína y ARN y se realiza una separación de fases con la utilización de TRIzol (113).
 - Métodos de identificación de dominios de unión al ARN.
 - Foto-crosslinking y MS de alta resolución para la asignación de RBDs en RBPs (RNPxl). Es una técnica que combina la unión covalente de proteína y RNA con UV, la espectrometría de masas de alta resolución y un análisis automatizado. Este permite la identificación de RBPs, de sus sitios de unión al ARN y de los motivos de unión del ARN a las proteínas (114).
 - Purificación de proteínas asociadas a ARN total (iTRAPP, por sus siglas en inglés) Combina la unión covalente de los complejos proteína-ARN mediante UV y el marcaje con 4-tiouridina (4SU). Además, se realiza la captura con *silica beads* de los complejos con el enriquecimiento con columnas de dióxido de titanio. La espectrometría de masas de esta técnica nos permite reconocer los sitios de unión de las proteínas de unión al ARN (115).

En esta tesis, como se describe en el apartado de resultados, se han escogido dos RBPs (LSM5 y MEX3A) como principales candidatos en el desarrollo de MPNST. Por ello, en los siguientes apartados se profundiza en la características y funciones de estos.

1.5. LSM5

LSM5 también conocido como YER146W, es una proteína codificada por un gen situado en el cromosoma 7 (p14.3). El tamaño de la proteína es de 91 aminoácidos y posee una masa molecular de 9937 Da. El gen *LSM5* puede codificar para 10 variantes de transcritos de *splicing* (116).

Forma parte de la familia LSM, unas proteínas de unión al ARN que han sido encontradas en los tres dominios de vida: *archaea*, *bacteria* y *eukarya*. Estas proteínas comparten un "pliegue Sm" conservado que consiste en una hélice alfa amino-terminal seguida de cinco hebras beta antiparalelas que forman pequeños barriles beta y que se ensamblan en hexámeros o heptámeros en forma de anillo (**Figura 8**).

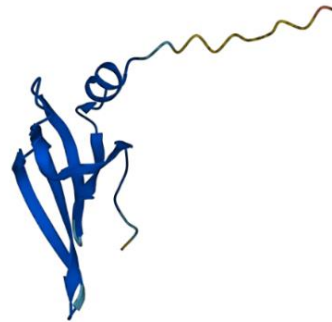


Figura 8. Representación tridimensional de la proteína LSM5. (2017, GeneCards)

LSM5 se expresa en la mayoría de los tejidos del ser humano en un nivel similar, tiene baja especificidad tisular. En la mayoría de los tejidos, se puede localizar en la célula tanto en núcleo como en el citosol (117).

1.5.1. Función

La función principal de LSM5 es la de proteína de unión al ARN. Forma parte de dos complejos diferentes con funciones distintas: el complejo LSM1-7 situado en el citoplasma y el complejo LSM2-8 situado en el núcleo.

El complejo LSM1-7 está formado por siete proteínas formando un anillo. Se sitúa normalmente en los cuerpos de procesamiento (o cuerpos P), unas regiones del citoplasma donde se concentran las proteínas de degradación del ARN 5'-3' y donde quedan secuestradas moléculas de ARNm estables o inestables que no son traducidas.

El complejo LSM1-7 tiene como función principal participar en la degradación del ARNm en su vía 5'-3', conectando los pasos de deadenilación con la eliminación de la caperuza 5'. En un primer lugar, puede impedir que las nucleasas accedan al extremo 3', y después, sirve de anclaje para el complejo enzimático de DCP1-DCP2 y la exonucleasa 5'-3' XRN1 (118). Además, el complejo LSM1-7 también participa en la degradación de ARNm de histonas durante el ciclo celular, el descaperuzamiento dependiente de uridilación y la biogénesis de miRNAs (119).

En levaduras se ha descrito que, mediante su unión a otras proteínas formando el complejo Lsm1p-7p/Pat1p/Dhh1p podría estar involucrado en el movimiento de ARNm fuera del grupo de polisomas de traducción a los cuerpos P, donde se degradarán o se almacenarán (120). De hecho, la pérdida de la función de LSM1-7 da como resultado el recorte de los extremos 3' de los ARNm y la degradación de este por la acción del exosoma en esta región (121).

El complejo LSM2-8 está formado también por siete proteínas formando un anillo, de la misma manera que LSM1-7, cambiando la subunidad LSM1 por LSM8. Se sitúa en el núcleo y es un componente esencial para el proceso de *splicing*. Actúa estabilizando la proteína U6 snRNA, lo cual permite la formación del complejo U6 snRNP (122). Además, el complejo

LSM2-8, al igual que el complejo LSM1-7 en el citoplasma, está implicado en el proceso de degradación de ARNm en el núcleo (123) (124).

Los complejos LSM se han relacionado también con la inhibición de la degradación del ARN. LSM están implicadas en la estabilización de los extremos 3' de los intermediarios en las vías de procesamiento de ARNr y snoARN (ARN nucleolar pequeño) (125).

1.5.2. Relación con enfermedades

Se ha descrito en levaduras que, el complejo Lsm1-7-Pat1, tiene un papel importante en la infección viral promoviendo la traducción y el reclutamiento para la replicación viral. Los ARNm que contienen un elemento rico en AU (ARE) en la región 3' no traducida (UTR) sufren una rápida degradación del ARNm mediada por ARE (AMD) en el citoplasma (126).

LSM5 se ha descrito como marcador de la cardiopatía hipertrófica y de mortalidad por sepsis (127) (128). Además, algunos estudios revelan la posibilidad de que LSM5 pudiera ser un buen marcador de prognosis en diferentes tipos de cáncer como en hepatocarcinoma o glioma y en la resistencia a quimioterapia en cáncer gástrico y colorrectal (129) (130) (131) (132).

1.6. MEX3A

MEX3A, también conocido como RKHD4 o RNF162, es una proteína codificada por un gen situado en el cromosoma 1 (q22). El tamaño de la proteína es de 520 aminoácidos y su peso molecular es de aproximadamente 54000 Da (133).

Pertenece, junto a MEX3B, MEX3C y MEX3D, a una familia de cuatro miembros denominada MEX3. En humanos, esta familia de proteínas se caracteriza por tener un dominio C-terminal RING y dos dominios homólogos HNRNPK (KH) (Figura 9).

MEX3A se localiza a nivel subcelular principalmente en el citoplasma, asociada normalmente a los cuerpos P. Su papel principal es el de proteína de unión al ARN (134).

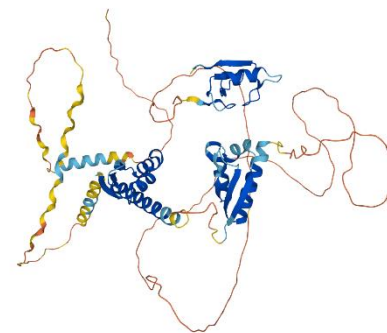


Figura 9. Representación tridimensional de la proteína MEX3A. (2017, GeneCards)

1.6.1. Función

La familia MEX3 tiene como función principal la regulación de la expresión postranscripcional de los genes por su actuación como E3 ligasa a través del dominio RING (135). Además, MEX3A regula varios mecanismos de expresión génica mediante los dominios de unión al ARN KH1 y KH2 como el proceso de degradación del ARNm mediante la unión a las regiones 3' no traducidas (UTR) (136).

MEX3A está implicada también en el proceso de transporte entre el núcleo y el citoplasma de algunos miRNAs. También se ha descrito que MEX3A podría estar implicada en el *splicing* alternativo, en concreto en el *splicing* de TIMELESS (137).

1.6.2. Relación con enfermedades

Las proteínas MEX están implicadas en diferentes procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la homeostasis epitelial, las respuestas inmunes y el cáncer. MEX3A es esencial para la proliferación, la migración celular y la apoptosis. Asimismo, MEX3A puede también inhibir la respuesta inmune innata (138) (139).

Se ha descrito su relación con diferentes tipos de cáncer como el de: ovario, cervical, pulmón, mama, colorrectal, hepatocarcinoma, glioblastoma y de tiroides. Por ello, en algunos de estos tumores podría ser un buen marcador de pronóstico, un marcador de resistencia a terapias y una buena proteína diana para su tratamiento. (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (147).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO 1: Selección de RBPs candidatas.

Objetivo 1.1: Validación y selección de RBPs candidatas mediante análisis bioinformáticos.

Objetivo 1.2: Validación de RBPs candidatas en muestras humanas y en células de MPNST.

OBJETIVO 2: Análisis funcional de RBPs candidatas en células de MPNST.

Objetivo 2.1: Ensayos funcionales *in vitro* de RBPs en células de MPNST.

Objetivo 2.2: Ensayos funcionales *in vivo* de RBPs en el crecimiento de MPNST utilizando ensayos de xenoinjerto.

OBJETIVO 3: Mecanismo de acción de las RBPs candidatas en células de MPNST.

Objetivo 3.1: Identificación de dianas de RBPs.

Objetivo 3.2: Validación del mecanismo de acción de las RBPs candidatas en células de MPNST.

OBJETIVO 4: Disección de la red de RBPs en MPNST.

Caracterización del RBPoma de MPNST mediante la captura de interactoma de ARN.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Las proteínas de unión al ARN podrían estar implicadas en el desarrollo tumoral de MPNST. El estudio de las RBPs candidatas podría ayudar al descubrimiento de dianas para el tratamiento o el diagnóstico de los MPNST.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Los experimentos con células realizados en esta tesis se han llevado a cabo con líneas celulares establecidas o comercializadas de células de Schwann, de neurofibromatosis y de MPNST.

4.1.1. Líneas celulares de Schwann humanas inmortalizadas

Se utilizaron dos líneas de células de Schwann humanas inmortalizadas: iHSC λ 1 e iHSC λ 2, obtenidas de Nancy Ratner en el *Cincinnati Children's Hospital Medical Center*. Ambas derivan del nervio ciático de un paciente sano, son *wildtype* (silvestre) para NF1 y fueron inmortalizadas por la expresión exógena de hTERT y CDK4 (53).

Estas líneas celulares se cultivan en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) de alto contenido en glucosa (4500 mg/L) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y con 1% de antibiótico/antimicótico, a 37°C y con un 5% de CO₂.

4.1.2. Líneas celulares de neurofibromatosis

Se utilizaron dos líneas celulares de neurofibromatosis: CRL3388 y CRL3389, ambas compradas en ATCC:

- La línea celular CRL3388 proviene de un neurofibroma plexiforme de la mano y fue inmortalizada por la expresión exógena de hTERT y CDK4. Estas células presentan una mutación germinal de pérdida de heretocigosidad (LOH, según sus siglas en inglés) en el gen NF1.

- La línea celular CRL3389 proviene de un neurofibroma plexiforme del nervio craneal XII y fue inmortalizada por la expresión exógena de hTERT y CDK4. Estas células presentan una mutación germinal LOH en el gen NF1.

Estas líneas celulares se cultivaron en DMEM de alto contenido en glucosa suplementado con 10% de FBS y con 1% de antibiótico/antimicótico, a 37°C y con un 5% de CO₂.

4.1.3. Líneas celulares de MPNST

Se utilizaron tres líneas celulares de tumores de la vaina del nervio periférico obtenidas de Nancy Ratner en el *Cincinnati Children's Hospital Medical Center* (148):

- La línea celular S462 proviene de un MPNST de grado IV derivado de neurofibroma y localizado en el muslo con dos mutaciones germinales LOH, una en el gen NF1 y otra en el gen p53.

- La línea celular T265 proviene de un MPNST derivado de neurofibroma localizado en el retroperitoneo con una mutación LOH en el gen NF1.

- La línea celular NF90-8 proviene de un MPNST derivado de neurofibroma localizado en el antebrazo izquierdo con dos mutaciones LOH, una en el gen NF1 y otra en el gen p53.

Las líneas celulares S462, T265 y 90-8 se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS y con 1% de antibiótico/antimicótico, a 37°C y con un 5% de CO₂.

4.1.4. Línea celular HEK293T

La línea celular HEK293T se utilizó para la producción de partículas lentivirales. Esta línea celular fue cultivada en DMEM suplementado con 10% de FBS y con 1% de antibiótico/antimicótico, a 37°C y con un 5% de CO₂.

4.2. MUESTRAS HUMANAS

Las muestras humanas utilizadas consisten en una cohorte independiente de nervios sanos humanos congelados (n = 4), neurofibromas (n = 7) y MPNST (n = 12) obtenidas de *Stanmore Musculoskeletal Biobank* (United Kingdom), un satélite de *University College London (UCL)/ University College London Hospitals (UCLH) Biobank* (*Human Tissue Authority License 12055*), que fue aprobado por la *National Research Ethics Committee* (NREC) (referencia 15/YH/0311). Este estudio específico fue aprobado por el NREC UCL/UCLH *Biobank Ethical Review Committee* (reference EC17.14).

4.3. SILENCIAMIENTO DE GENES MEDIANTE PARTÍCULAS LENTIVIRALES

El silenciamiento de genes en esta tesis se realizó mediante infección con partículas lentivirales. La generación de partículas lentivirales se llevó a cabo mediante transfección de la línea celular HEK293T con una mezcla de plásmidos de empaquetamiento y el plásmido de interés.

4.3.1. Crecimiento de plásmidos y aislamiento de ADN plasmídico

En primer lugar, se realizó el aislamiento y selección de colonias bacterianas con el plásmido de interés en el interior (**Tabla 2**). Para ello, se realizó una triple estría del glicerol comercial en placas Petri con LB agar con 100 mg/ml de ampicilina. Se incubó a 37°C durante 16 horas.

El crecimiento de las bacterias con el plásmido de interés se llevó a cabo seleccionando una colonia e inoculándola en un Erlenmeyer con medio LB con 100 mg/ml de ampicilina. Se crecieron las bacterias en rotación a 37°C durante 16 horas.

El aislamiento de ADN plasmídico se realizó con el *Kit Midiprep de plásmidos HiPure PureLink™* (*Thermofisher, K210005*) siguiendo el siguiente protocolo comercial:

- Previo a comenzar el protocolo se equilibraron las columnas añadiendo 10 ml de tampón de equilibrado (EQ1) a la columna *HiPure* y se dejó caer el líquido por gravedad.

- Se centrifugó el cultivo de bacterias a 4.000 g durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El precipitado de bacterias se resuspendió en 4ml de tampón de resuspensión (R3) hasta obtener un precipitado homogéneo. Se añadieron 4 ml de tampón de lisis, se invirtió el tubo cinco veces

y se incubó la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 4ml del tampón de precipitación (N3) y se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea. Se centrifugó el lisado a 12.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- El sobrenadante se añadió a la columna previamente equilibrada y se dejó caer por gravedad. Se hicieron 2 lavados con 10 ml de tampón de lavado (W8), dejando que drenase por gravedad en ambas ocasiones. Una vez completados los lavados, se cambió la columna de tubo y se añadieron 5 ml el tampón de elución a la columna (E4) y, de nuevo, se dejó drenar por gravedad. Se añadieron 3.5 ml de isopropanol al eluido. Se mezcló bien y se centrifugó a 12.000 g durante 30 minutos a 4°C.

- Se retiró el sobrenadante y se añadió etanol 70% al pellet. Se centrifugó 5 minutos a 12.000 g a 4°C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 10 minutos. El ADN plasmídico purificado se resuspendió en tampón TE. El plásmido se cuantificó en el *Nanodrop 2000 (ThermoScientific)* y se guardó a -20°C hasta su uso.

Nombre	Secuencia	Código	Casa Comercial
LSM5.1	GTTGGTACTCTTCTAGGATTT	TRCN0000074456	Sigma-Aldrich
LSM5.2	CATCGTGATGAAGAGTGATAA	TRCN0000074455	Sigma-Aldrich
MEX3A.1	CTAGTGAAGACACGTACAAAT	TRCN0000218253	Sigma-Aldrich
MEX3A.2	CAAACCAACACATACATTATC	TRCN0000230493	Sigma-Aldrich
CTRL	Secuencia aleatoria		Sigma-Aldrich

Tabla 2. Plásmidos utilizados para el silenciamiento de genes candidatos.

4.3.2. Producción de partículas lentivirales e infección de células

El proceso de producción de partículas lentivirales e infección de células para el silenciamiento de genes duró varios días (**Figura 10**):

- Día 1. Se sembraron 3 millones de células HEK293T en una placa de 100 mm, y 6 horas después se realiza una mezcla de los siguientes plásmidos en 1ml de medio sin FBS (**Tabla 3**):

Plásmidos	Cantidad
MDL	2.55 µg
VSV-G	1.37 µg
REV	0.98 µg
Plásmido de interés	10 µg

Tabla 3. Plásmidos utilizados para la producción de partículas lentivirales.

A la mezcla se añadieron 18 µl de TURBOfect (Thermo Scientific, R0531) y se realizó una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla a las placas con el medio fresco y se incubó durante 16 horas en condiciones normales.

- Día 2. Completadas las 16 horas se retiró el medio con los plásmidos y el turbofect.

- Día 3. 24 horas después del cambio de medio, se recogió el medio con las partículas lentivirales y se filtró con filtros de CA (acetato de celulosa) de 45µm de poro para evitar la contaminación con células HEK. La mitad del medio se añadió a placas de cultivo con 250.000-

400.000 células de MPNST o iHSC λ 2, y se completó el medio de estas placas con el medio DMEM completo.

- Día 4. Se repitió el mismo proceso del día 3.

- Día 5. Se realizó un cambio de medio a las células de MPNST y se añadió un tratamiento con puromicina a una concentración de 4 μ g/ml durante 72 horas, para seleccionar las células infectadas con los lentivirus. Una vez seleccionadas se utilizaron para realizar una serie de experimentos.

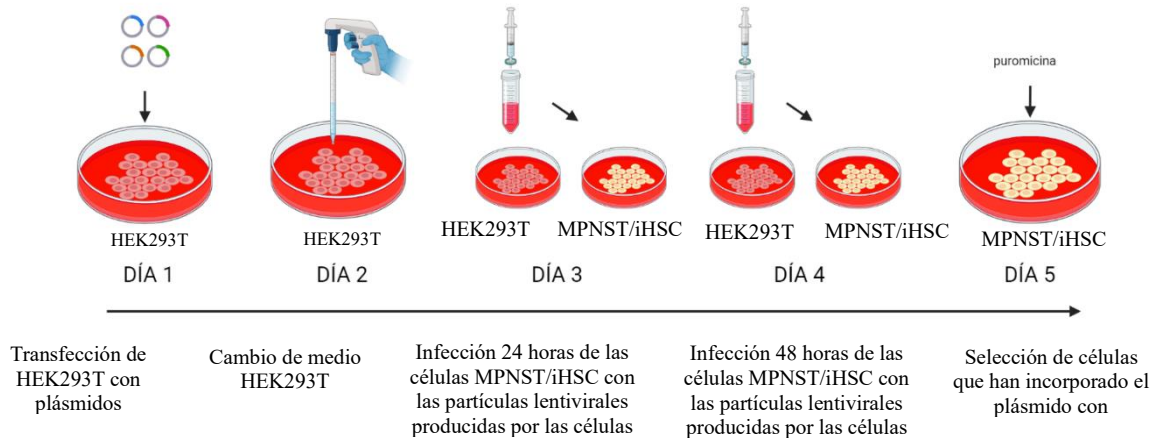


Figura 10. Esquema del proceso de silenciamiento de genes mediante la producción de partículas lentivirales. (Elaboración propia)

4.4. ENSAYOS FUNCIONALES *IN VITRO*

Con el objetivo de estudiar las posibles implicaciones del silenciamiento de los genes de nuestras proteínas diana en líneas celulares de MPNST y iHSCs, se realizaron ensayos funcionales con células silenciadas con el plásmido de interés y con el plásmido control (Figura 11).

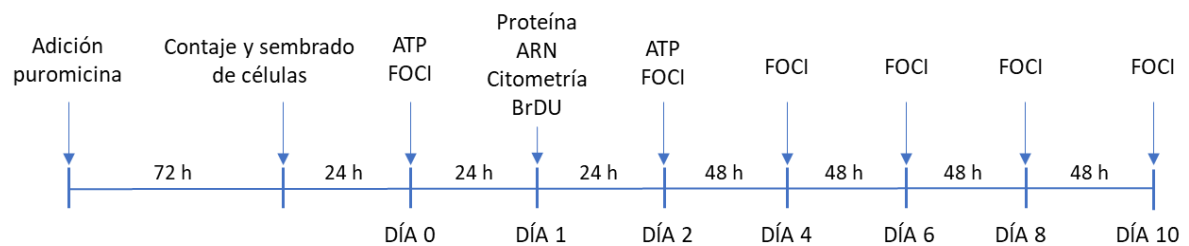


Figura 11. Esquema de la recolección de los ensayos funcionales.

4.4.1. Ensayo de ATP

El ensayo de ATP se utiliza para la medición de la viabilidad celular, debido a que el ATP está presente en células metabólicamente activas.

Para la realización del ensayo se debe cultivar 1000 células por cada pocillo en una placa de 96 pocillos. Cada condición se realizó por triplicado y se realizaron dos placas diferentes (día 0 y

día 2). Ambos días se realizó el ensayo de la misma forma, utilizando el kit ATPlite *1step Luminescence Assay System* (PerkinElmer, 6016731).

Se realizó una curva de ATP estándar, para ello, se prepararon diluciones en H₂O de 100 μM, 10 μM, 1 μM, 0.1 μM, 10 nM y 1 nM. Se añadieron 10 μl por pocillo de cada dilución por duplicado, incluyendo un blanco con 10 μl de H₂O y, además, se añaden 100 μl de medio completo sin células.

Se añadió 100 μl de reactivo de la solución sustrato a los pocillos con células y a los pocillos de la curva de ATP. Con el fin de lisar las células y estabilizar el ATP, se agitó 10 minutos en un *orbital shaker* a 700 rpm. Se transfirieron los 200 μl a una placa blanca de 96 pocillos y se incubaron 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Se realizó una medición de la luminiscencia en el lector de placas *BertholdTech Mithras, Driver Version: 1.08 (1.0.8.0)*. Se midió la luminiscencia a 1 segundo por cada pocillo de la placa.

El análisis de datos se realizó calculando la cantidad de ATP mediante la extrapolación de los datos obtenidos de las muestras en la recta patrón. Se realizó la media de lo triplicados y se relativizó el día 2 respecto al día 0. Los resultados de las células silenciadas se relativizaron respecto al plásmido control (shCTRL).

4.4.2. Ensayo de formación de colonias

El ensayo de formación de colonias es un ensayo de supervivencia celular *in vitro* que está basado en la capacidad de una sola célula de formar una colonia.

Para su realización, se sembraron por triplicado 150 células por pocillo en seis placas de 12 pocillos por cada condición. Las placas se recogieron a día 0 (24 horas después de ser plaqueadas), y en los días 2, 4, 6, 8 y 10. La recolección consistió en retirar el medio a las placas de cultivo, lavar con PBS 1X y añadir formalina 10% como fijador. Las placas fueron almacenadas a 4°C con la formalina hasta completar la recolección de todas las placas.

Una vez fijadas todas las placas se retiró la formalina, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se añadió una solución 0.1% Cristal violeta diluido en metanol 20% (Sigma-Aldrich, C6158). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el cristal violeta y se realizaron 4 lavados con H₂O miliQ. Las placas se escanearon con *EpsonScan*.

Los cristales se resuspendieron con 250 μl de una solución de ácido acético 10%, se realizó una incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente, se transfirieron 200 μl a una placa de 96 pocillos y se midió en el espectrofotómetro a OD595. Se añadió un control de ácido acético.

El análisis de datos se hizo calculando la media de los pocillos de cada condición del día 10 y los datos obtenidos se relativizaron respecto al blanco y respecto al shCTRL.

4.4.3. Ensayo de conteo celular

El ensayo de conteo celular permite el estudio de la proliferación y viabilidad celular.

Se realizó cultivando por cuadruplicado 10.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. 48 horas después se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS 1X y se añadieron 50 μl de 0.05% tripsina-EDTA. Se añadieron 100 μl de DMEM completo para parar la reacción.

Se retiraron 10 μ l de las células y se mezclaron con Trypan Blue. Se añadieron 10 μ l en la cámara de conteo y se cuantificó el número de células en *LUNA-II™ Automated Cell Counter* con un protocolo adaptado a la línea celular correspondiente.

El análisis de datos se realizó relativizando el número total de células contadas por el aparato respecto al número de células cultivadas (10.000 células), se realizó la media de las réplicas técnicas y se relativizó respecto a las células shCTRL.

4.4.4. Ensayo de incorporación de BrDU

El ensayo de incorporación de BrDU (o 5-bromo-2-desoxiuridina) es una técnica enfocada en la identificación de células en proliferación mediante la incorporación del compuesto BrDU, análogo de la timidina, al ADN durante su síntesis.

Para su realización, se cultivaron por cuadruplicado 10.000 células en cubreobjetos de vidrio para microscopios de 40 mm tratados previamente con PDL (Poly-D-lysina) situados en placas de 24 pocillos. Después de 48 horas, se añadieron 20 mM de BrDU y se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Se retiró el medio de cultivo, se añadió HCl 2N durante 10 minutos para fijar las células y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se añadieron 70 μ l de una solución de borato de sodio para neutralizar durante 7 minutos. Se retiró el líquido y sin lavar, se añadieron 50 μ l de anticuerpo primario anti-BrDU (Sigma-Aldrich 11170376001) a una concentración 1:100 en PBS con 0,1% Tritón X-100 durante 1 hora. Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron cinco lavados con PBS 1X. Se añadió 50 μ l del anticuerpo secundario contra ratón Alexa fluor 488 (Cell Signaling Technology 4408S) (a una concentración 1:1.000) y el reactivo DAPI, se dejó incubar media hora en oscuridad a temperatura ambiente.

Se realizaron imágenes en el *Thunder Leica DM4 B Upright Microscopy*, el BrDU con un filtro de excitación BP 480/40, espejo dicromático 505, filtro de suspensión, y el DAPI con un filtro de excitación BP 350/50, espejo dicromático 400.

El análisis de datos se realizó contando el número de células totales (positivas para DAPI) y el número de núcleos positivos en BrDU, ayudándonos del software *ImageJ*. Las células positivas en BrDU se relativizaron a los núcleos totales y se obtuvo el porcentaje de células positivas. Se realizó el conteo de aproximadamente 16 imágenes por réplica, proveniente de cuatro réplicas técnicas y se realizó la media.

4.4.5. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje

El ensayo de crecimiento independiente de anclaje mide la capacidad de las células de crecer independientes de una superficie sólida, propiedad que presentan las células tumorales.

El ensayo consistió en preparar una capa de agar inferior mezclando 10 ml de DMEM completo 2X con 10 ml del 1.2 % agar noble (SigmaAldrich, A5431). Se añadieron 3ml de la mezcla por pocillo en una placa de 6 pocillos y se incubó a 4°C durante 30 minutos hasta que solidificó.

Posteriormente, se preparó la capa superior, mezclando 1ml de DMEM completo con 60.000 células, 3 ml 2X DMEM completo frío y 2 ml de agar de bajo punto de fusión a 0.9% (Pronadisa, 8050.55). Se pipetearon 1.5 ml de esta mezcla a cada pocillo de la placa M6 a la que previamente se añadió la capa inferior, de tal forma que había 15.000 células por pocillo y

se hicieron triplicados de cada condición. La placa se incubó a 4°C durante media hora y, pasado este tiempo, se cultivó a 37°C y con un 5% de CO₂. Las colonias fueron visibles a las 3 semanas.

El posterior análisis de los datos en esta tesis se realizó escaneando las placas con *EpsonScan* a 300 ppp. Con *ImageJ* se dibujó un diámetro en un pocillo y se estableció la distancia ya conocida (35mm), se dibujó un cuadrado de 3 cm² y se hizo binaria la imagen. Se cuantificaron las partículas con un tamaño de 0.01-0.8 mm². Los datos de las células silenciadas se relativizaron respecto al shCTRL.

Las imágenes de microscopio óptico fueron realizadas a 40X y 100X en el microscopio invertido *Olympus IX73*.

4.4.6. Ensayo de apoptosis

El ensayo de apoptosis consiste en cuantificar el porcentaje de células viables y de células muertas por apoptosis o necrosis.

Para este protocolo, se plaquearon 150.000 células por sextuplicado en una placa de 6 pocillos. El ensayo se realiza 48 horas después de sembrar las células. El kit comercial utilizado para la realización del ensayo fue *Bd annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, 559763). En este *Kit* la Anexina V está conjugada con el fluoróforo ficoeritrina (*PE*, por sus siglas en inglés) y el 7AAD con isotiocianato de fluoresceína (*FICT*, por sus siglas en inglés).

Se transfirió el medio de cultivo a un tubo de 15 ml, se lavó con PBS 1X y se pasó al mismo tubo. Se añadieron 150 µl de tripsina 0.05% sin EDTA y sin rojo fenol, y una vez levantadas las células, se transfirieron al mismo tubo, que se completó con PBS 1X. Se centrifugaron las células a 1500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en *Binding tampón* 1X y se transfirió a un tubo de 1.5 ml.

Se realizó una nueva centrifugación para lavar las células, se añadió *binding tampón* 1X y se realizó el marcaje de la siguiente forma:

- Controles:
 - Células sin ningún marcaje (1 tubo).
 - Células con Anexina V-*PE* (1 tubo).
 - Células con 7AAD-*FICT* (1 tubo).
 - Células con Anexina V-*PE* (1 tubo) tratadas a 65°C durante 3 minutos.
 - Células con 7AAD-*FICT* (1 tubo) tratadas a 65°C durante 3 minutos.

- Experimental:
 - Células con Anexina V-*PE* y 7AAD-*FICT* (3 tubos).

Una vez añadido el marcaje se realizó una incubación en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Terminado este tiempo, se centrifugaron las muestras para retirar el exceso de marcador y se resuspendió el precipitado en 400 µl de *Binding tampón* 1X. Se transfirió el líquido a un tubo de citómetro y se mantuvieron en hielo hasta su lectura en el citómetro.

Los tubos fueron medidos en el citómetro Accuri:

- FL3→ Láser 488 nm y filtro *long pass* (LP, por sus siglas en inglés) 670 nm.
- FL1→Láser 488 nm y filtro *band pass* (BP, por sus siglas en inglés) 575-25 nm.

Los datos fueron analizados con el *software FlowJo*. Este programa permite calcular una matriz de compensación con los controles sin marcaje y marcados con un solo fluoróforo. Esta matriz de compensación se aplica de forma automática a todas las muestras, reduciendo la pérdida de sensibilidad producida por la superposición de los espectros de emisión de los fluoróforos. Los datos de porcentaje de células muertas por apoptosis en las células silenciadas se relativizaron respecto a los datos del shCTRL.

4.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE RT-QPCR

Los análisis de la expresión génica se realizaron mediante la extracción de ARN de las muestras, la conversión de este en ADNcopia (ADNc) y posterior PCR cuantitativa en tiempo real.

4.5.1. Extracción de ARN

En los ensayos de silenciamiento se sembraron 150.000 células por pocillo de M6 y se recogieron a las 48 horas. En los ensayos de líneas celulares en estado basal se sembraron 1 millón de células en una placa de 100 mm y se recogieron a las 48 horas. El proceso de extracción de ARN se realizó de la siguiente forma:

- Se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1X y se añadieron 400 μ l (en el caso de las placas M6) o 800 μ l (en el caso de las placas de 100 mm) de TRIzol (Invitrogen, 15596018). Se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y se traspasó el líquido a un tubo de 1.5 ml libre de ARNsas. Estas muestras pueden almacenarse durante cortos periodos de tiempo en el congelador de -80°C antes de proseguir con el protocolo.
- Se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol a la muestra. Se agitó vigorosamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12.000 g y 4°C durante 15 minutos.
- Se retiró la fase acuosa, donde se encuentra el ARN, en un nuevo tubo libre de ARNsas y se añadieron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol y 2 μ l de glicógeno. Se agitó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12.000 g y 4°C durante 10 minutos con el objetivo de precipitar el ARN.
- Se retiró el isopropanol, se añadió etanol al 75% al precipitado para lavarlo y se incubó a -20°C durante 16 horas. Se realizó una nueva centrifugación a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C.
- Se descartó el etanol y se dejó secar durante aproximadamente 10 minutos. El pellet se resuspendió en agua libre de ARNsas.
- Se incubaron las muestras 10 minutos a 60° C.

La cuantificación de la cantidad de ARN se realizó en el *Nanodrop 2000 (ThermoScientific)*. La relación de absorbancia óptima de las muestras debe ser $A_{260/280} > 1.80$ y $A_{260/230} > 2.0$.

Las muestras fueron almacenadas en el congelador a -80°C hasta su uso.

4.5.2. Retrotranscripción

El primer paso del proceso de retrotranscripción consiste en la eliminación del ADN que pueda interferir en futuros pasos. Para ello, se realizó un tratamiento con ADNasa añadiendo a un tubo de 0.2 ml libre de ARNasas los siguientes componentes (**Tabla 4**):

Reactivos	Cantidad
ARN	1000ng
Tampón Dnase (10X) con MgCl ₂	1 µl
ADNsa I	1 µl
H ₂ O libre de ARNsa	hasta completar 10 µl

Tabla 4. Reactivos utilizados para el tratamiento con ADNasa.

Una vez añadidos, se realizó una incubación de 30 minutos a 37°C, temperatura a la que la enzima ADNasa es activa.

Se añadió 1 µl de EDTA 50 mM y se incubó 10 minutos a 65°C con el fin de inactivar la ADNasa.

Una vez terminado el primer paso, se realizó la retrotranscripción. Para ello se añadieron 10,3 µl de una mezcla compuesta por los siguientes reactivos (**Tabla 5**):

Reactivos	Cantidad	Casa comercial
dNTP mix 10 Mm	1 µl	Thermo Scientific (R0182)
Random primers 250ng/ µl	1 µl	Thermo Fisher Scientific (48190011)
Tampón 5X de la MLV	4,3 µl	
dTT 0.1M	2 µl	
ARNsa OUT	1 µl	Thermo Scientific (100000840)
MLV	1 µl	Thermo Scientific (28025013)

Tabla 5. Reactivos utilizados en el paso de la retrotranscripción.

Las muestras se incuban en el termociclador con las siguientes condiciones (**Tabla 6**):

Temperatura	Tiempo
25°C	10 minutos
37°C	3 horas
70 °C	15 minutos

Tabla 6. Temperaturas y tiempos del segundo paso de retrotranscripción.

El ADNc obtenido en esta reacción se diluyó en H₂O libre de ARNasas en una proporción 1/5 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.5.3. qPCR

La cuantificación del ARNm de las muestras se realizó mediante qPCR a tiempo real. Para ello, se utilizan 1,5 µl de ADNc diluido obtenido en la retrotranscripción mezclado con los siguientes componentes (**Tabla 7**):

Reactivo	Cantidad
SYBR Green	3 µl
H ₂ O libre de ARNasas	1.8 µl
PRIMER F	0.1 µl
PRIMER R	0.1 µl

Tabla 7. Mezcla de reactivos utilizados para la qPCR.

Las muestras se añadieron a una placa de 384 pocillos por triplicado y se cuantificaron mediante *QuantStudio5 applied biosystems (ThermoFisher)* (**Tabla 8**).

Fases		Temperatura (T ^a)	Tiempo
Fase Inicial	Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos
Fase de PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	5 segundos
	Hibridación	60°C	32 segundos
Curva de fusión	Desnaturalización	95°C	15 segundos
	Hibridación	60°C	1 minuto
	Disociación	95°C	15 segundos

Tabla 8. Temperaturas y tiempos del proceso de la qPCR.

Se obtuvo el valor Ct (umbral de ciclo), que es la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral. Este valor se trata de una medición relativa de la concentración del gen en la reacción de PCR.

Los datos obtenidos de Ct de un gen en nuestras muestras se relativizaron a los Ct de un gen de referencia (en nuestro caso *GAPDH*). Los cebadores de los genes cuantificados en este trabajo son los siguientes (**Tabla 9**):

Gen	Secuencia (5´-3´)	Casa comercial
LSM5	DIRECTO ATCACACCAGAAGGAAGAAGGAT REVERSO CTCTCCAGGAACCGCATTG	Sigma- Aldrich
MEX3A	DIRECTO CTGAAGGGCAGCAGCAACAC REVERSO GGCCTTAATCTTGAGCCTTGC	Sigma- Aldrich
P21	DIRECTO AAGACCATGTGGACCTGTC REVERSO GAAGATCAGCCGGCGTTTG	Sigma- Aldrich
RBM28	DIRECTO CGTGGTGACTGAAAAGGGGAG REVERSO GGTGGTAATCTCCTTGAGGGC	Sigma- Aldrich
UBAP2L	DIRECTO GTGGACGAGAGTTTCGAGGT REVERSO GAAAACCTCCTCCTCGCCT	Sigma- Aldrich
DDX56	DIRECTO GCTCCATAGGAAGGCGACAG REVERSO GACATCCGAGCACAGTAGG	Sigma- Aldrich
GAPDH	DIRECTO ACCCACTCCTCCACCTTTGA REVERSO CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	Sigma- Aldrich

Tabla 9. Cebadores utilizados en el proceso de la qPCR

4.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA MEDIANTE *WESTERN BLOT*

Las proteínas se extrajeron, se cuantificaron y se analizó su expresión mediante la realización de la técnica de *Western Blot*.

4.6.1. Extracción proteína

Las proteínas se extrajeron de cultivos celulares. Para los ensayos de líneas celulares en estado basal se sembraron 1 millón de células en una placa de 100mm y se recogieron 48 horas después. En los ensayos de silenciamiento se sembraron 150.000 células y se recogieron también 48 horas después. Para la recolección de la muestra se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1X y se añadió 150 μ l o 600 μ l de *tampón* RIPA (**Tabla 10**) dependiendo de la superficie. Nos ayudamos de un *scraper* para recoger las células de la placa y se transfieren a un tubo de 1,5 ml. Se realizaron 3 ciclos de congelación y descongelación y se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4 grados. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo con el fin de eliminar los restos de membranas celulares.

Reactivos	Cantidad	Referencia
NaF 0.5M	500 μ l	Sigma-Aldrich (67414)
Deoxicolato sódico	25 mg	Sigma-Aldrich (D6750)
Inhibidor de proteasas	50 μ l	Sigma-Aldrich (P9599)
PhosphoSTOP	½ pastilla	Sigma-Aldrich (04906837001)
RIPA <i>tampón</i>	5 ml	

Tabla 10. Reactivos del *tampón* RIPA.

4.6.2. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas se realiza con *Pierce™ Micro BCA™ Protein Assay Kit and Reagents* (ThermoScientific, 23235), un método colorimétrico para medir la concentración total de proteínas de soluciones de proteínas diluidas.

Se realizó en una placa de 96 pocillos una recta patrón por duplicado de BSA con las concentraciones 20 μ g, 15 μ g, 10 μ g, 5 μ g, 2.5 μ g, 1.25 μ g, 0.5 μ g, 0.25 μ g y 0 μ g en un volumen final de 100 μ l.

Por otro lado, se añadieron 3 μ l de la muestra que queremos cuantificar y 100 μ l de H₂O, también por duplicado. Se realizó una mezcla con los tres reactivos diferentes del kit en la siguiente proporción (Reactivo A 25/50, Reactivo B 24/50 y Reactivo C 1/50) y se añadieron 100 μ l de la mezcla a los pocillos con muestra y a los pocillos de la recta patrón.

Se incubó la placa 30 minutos a 60°C y se midió la absorbancia de la placa a 562 nm en el equipo *ThermoScientific Multiskan GO*. Los datos obtenidos en las muestras se extrapolaron a la recta patrón con la finalidad de conocer la cantidad de proteína de nuestras muestras.

4.6.3. Preparación de las muestras

Las muestras de proteínas se prepararon con 5-10 μ g de proteína, con *tampón* RIPA para igualar el volumen de las muestras y el volumen necesario de *loading tampón* 5X (**Tabla 11**) para llevarlo a una concentración 1X. Las muestras se desnaturalizaron con un choque térmico de 95°C durante 5 minutos.

Reactivos	Cantidad
Glicerol	5 ml
Tris-HCl 1M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	2.5 ml
B-mercaptoetanol	500 µl
Azul bromofenol	0.0375 g

Tabla 11. Reactivos loading tampón 5X.

4.6.4. Western Blot

Se prepararon los geles de acrilamida en cristales de 1.5 mm. En la parte inferior se colocó el gel separador (8-15%) y en la parte superior el gel concentrador (4%) (Tabla 12).

Reactivos	8%	15%	4%	Referencia
H ₂ O	4.6 mL	2.3 mL	1.4 mL	
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	-	
Tris-HCl 1 M pH 6.8	-	-	1.0 mL	
Acrilamida 30%	2.7 mL	5 mL	0.4 mL	Bio-Rad (1610158)
SDS 10%	100 µl	100 µl	30 µl	
APS	100 µl	100 µl	30 µl	Bio-Rad (1610700)
Temed	10 µl	10 µl	3 µl	Avantor (A1148.0025)

Tabla 12. Reactivos de los geles de acrilamida.

Se acoplaron las estructuras con los geles a la cubeta de electroforesis, se completó con tampón de electroforesis (Tabla 13) y se añadieron las muestras a los pocillos, seguidas de un marcador de peso molecular. La fuente de electroforesis se programó a 180 voltios durante aproximadamente 1 hora.

Completado este proceso se procedió a realizar la transferencia en húmedo a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 mm de poro. Para ello, se colocó un casete en una fuente de transferencia completa con tampón de transferencia (Tabla 13) a 4°C durante 16 horas a 25 mA constantes.

Reactivos	Tampón de electroforesis	Tampón de transferencia
Tris-glicina 10 x	100ml	100 ml
SDS 10%	10 ml	-
H ₂ O	890 ml	700 ml
Metanol	-	200 ml

Tabla 13. Reactivos del tampón de electroforesis y transferencia.

Completada la transferencia, se extrajo de la cubeta la membrana de nitrocelulosa y se tiñó con rojo *Ponceau* para comprobar que la técnica se ha realizado de forma correcta. Se lavaron los restos de reactivo para no contaminar los siguientes pasos y se incubó 1 hora a

temperatura ambiente con reactivo para bloquear las uniones inespecíficas de la proteína (BSA 2% o leche 5%) dependiendo del anticuerpo utilizado.

Se retiró el bloqueo y se añadió el anticuerpo primario que correspondía (**Tabla 14**). Los anticuerpos se prepararon en leche o BSA al 2% y se diluyeron en una proporción 1:1.000. Se incubaron 16 horas a 4°C.

Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS/Tween para eliminar los restos de anticuerpo que pudieran dar señal inespecífica. Se añadió el anticuerpo secundario correspondiente, anti-*rabbit* o anti-*mouse* HRP (diluido 1:5.000 en leche 2%) dependiendo del anticuerpo primario añadido previamente. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

Nombre del anticuerpo	Referencia
Anti-LSM5	Abcam (ab184568)
Anti-Actina	Sigma-Aldrich (A5441)
Anti-CDK2	Cell Signaling Technology (2546T)
Anti-PCNA	Cell Signaling Technology (13110)
Anti-UBAP2L	Cell Signaling Technology (40199S)
Anti-MTOR	Cell Signaling Technology (2972S)
Anti-p-MTOR	Cell Signaling Technology (2974S)
Anti-AKT	Cell Signaling Technology (4691)
Anti-p-AKT	Cell Signaling Technology (9271S)
Anti-S6	Cell Signaling Technology (2217)
Anti-p-S6	Cell Signaling Technology (4857S)
Anti-HuR	Santa Cruz Biotechnology (sc-5261)
Anti-Mouse HRP	Cell Signaling Technology (7076)
Anti-Rabbit HRP	Cell Signaling Technology (7074)

Tabla 14. Lista de anticuerpos utilizados.

Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS/Tween. Se añadió una mezcla de los reactivos del ECL (Bio-Rad, 1705061) en proporción 1:1 y se visualizó la señal con *iBright1500* (Invitrogen).

La cuantificación de proteína en *WB* se realizó con el software *ImageJ*, relativizando los datos al control de carga (*Ponceau* o actina).

4.7. VALIDACIÓN DE LOS CANDIDATOS DE PCR

La validación de los candidatos de *splicing* se realiza mediante PCR. Para ello se mezclan los siguientes reactivos:

- 0.5 µl del cebador directo.
- 0.5 µl de cebador reverso.
- 5 µl de *DreamTaq*.
- 4 µl de ADNc.

El ADNc utilizado se obtuvo de células MPNST S462 silenciadas y controles, siguiendo los pasos de silenciamiento, extracción de ARN y retrotranscripción explicados previamente. Las muestras se pusieron en el termociclador y se programó con diferentes ciclos de temperatura (Tabla 15).

	Fases PCR	Temperatura (T ^a)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos
32 CICLOS	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	Alineamiento	T _m cebadores	30 segundos
	Elongación	72°C	30 segundos
	Elongación final	72°C	10 minutos

Tabla 15. Temperaturas y tiempos de la PCR de splicing.

La temperatura de fusión (T_m, por sus siglas en inglés) correcta de cada pareja de cebadores (Tabla 15) fue calculada en la web *Tm Calculator* | *Thermo Fisher Scientific* – US.

Nombre	Variante	Secuencia	Tamaño de los fragmentos
CDK2	HsaEX0014297	GCTATCTGTTCCAGCTGCTCC TCCCAGAGTCCGAAAGATCC	243-345
CCNT1	HsaEX0013676	CAAGCAAGGACTTAGCACAGACT TCCAATTCCAAATGCGTTTGAGC	115-279
AXIN1	HsaEX0007386	TCCAGACCCTTGCCCTTGAG ACAACGATGCTGTCACACGG	254-362
CEACAM1	HsaEX0014466	ACCTCAGCCTCTCCTGCTATG ATGCCAGGGCTACTGCTATCA	300-588

Tabla 16. Cebadores de las variantes de splicing seleccionadas.

4.8. ENSAYOS IN VIVO XENOGRAFTS

4.8.1. Animales de experimentación.

Los procedimientos experimentales relacionados con animales realizados en esta tesis fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la responsabilidad del Dr Ashwin Woodhoo. El número de registro de estos procedimientos es: 15012/2023/003. Estos procedimientos se han realizado bajo el cumplimiento del amparo legislativo de la Directiva 2100/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 transpuesto a la norma española en el RD 53/2013 del 1 de febrero, en el cual se establecen las normas para el uso y protección de animales utilizados en experimentación y con otros fines científicos.

Todos los procedimientos se realizaron en el centro Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) de la Universidad de Santiago de Compostela.

La cepa de ratones utilizada para la realización de los experimentos *in vivo* de trasplante de xenografts fue *Nude-Foxn1nu/nu mice*. Estos ratones están modificados genéticamente para ser inmunodeprimidos y se usan típicamente en estudios biomédicos, en concreto, en oncología.

4.8.2. Preparación de células de MPNST e inyección

Se escogió la línea celular de MPNST S462 para los experimentos *in vivo* debido a que datos registrados en la bibliografía confirman en varios estudios la capacidad de las células S462 de formar tumores en ratones *Nude* mediante la inyección de células a través de la vía subcutánea.

Las células S462 se infectaron siguiendo el protocolo explicado previamente en el apartado 4.3 denominado silenciamiento de genes a partir de partículas. En este caso, las secuencias utilizadas fueron la secuencia shCTRL y la secuencia shLSM5.2. Una vez seleccionadas con la puromicina se diluyeron 4 millones de células en 100 μ l de una mezcla de 1:4 PBS:Matrigel.

Se inyectaron los 100 μ l con los 4 millones de las células vía subcutánea en ambos flancos del ratón. Unos ratones fueron inyectados con células shCTRL y otros con shLSM5.2.

4.8.3. Seguimiento y extracción de tejidos

A partir del día 14 de inyectar las células a los ratones, los tumores empezaron a crecer. En ese momento se comenzó a registrar el crecimiento. Las mediciones se llevaron a cabo con un caliper dos veces por semana, y también se tomaron fotos de los ratones para llevar un seguimiento más minucioso.

Los ratones se sacrificaron siete semanas después de ser inyectados con las células tumorales. Se extrajeron los tumores con ayuda de unas tijeras y unas pinzas previamente autoclavadas y lavadas con etanol. Se realizó una foto de los tumores extraídos y se pesó en una báscula. Se dividieron los tumores en una rejilla y en un tubo de 1.5 ml. Además, se extrajeron los pulmones para confirmar si se había producido metástasis.

4.9. PERFIL DE RIBOSOMAS

Se llevó a cabo la infección de la línea celular S462 siguiendo el protocolo explicado previamente en el apartado 4.3. En este caso, las secuencias utilizadas fueron la shCTRL y la shLSM5.2. Se cultivaron 2 placas de 150 mm por condición y por réplica.

Las células fueron tratadas con ciclohexamida (CHX) durante 5 minutos a 37°C. Se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1X y se recogieron las 2 placas en 500 μ l de tampón de lisis (Tabla 17).

Reactivos	Cantidad	Casa Comercial
Tris-HCl Ph 7.4 1M	50 μ l	Invitrogen (15-567-027)
NP40	50 μ l	Sigma-Aldrich (74385)
KCl 3M	166 μ l	Merck (Sigma) P9333
MgCl ₂	50 μ l	Sigma-Aldrich (63069)
Pastilla complete-libre de EDTA	½ pastilla	Roche (11836170001)
CHX 100mg/ml	5 μ l	Carl Roth (8682)
DTT 1M	5 μ l	Thermo Scientific(R0862)
H ₂ O libre de ARNasas	4540 μ l	Sigma-Aldrich (W4502)

Tabla 17. Reactivos del tampón de lisis para el perfil de ribosomas.

Se añadieron 10 μ l de TurboDNAsa 2U/ μ l (Invitrogen, AM2238) por ml de muestra, y se incubó 10 minutos en hielo. Se lisó la muestra con ayuda de una jeringa de 23 G, se incubó

10 minutos en hielo y se centrifugó a 16.100 g durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml.

Se prepararon las soluciones de sacarosa (Tabla 18):

Reactivos	Solución de sacarosa al 10%	Solución de sacarosa al 50%
Sucrosa	5g	25g
Tris-HCl Ph 7.4 1M	750 µl	750 µl
KCl 3M	1335 µl	1335 µl
MgCl ₂	250 µl	250 µl
CHX 100mg/ml	50 µl	50 µl
DTT 1M	50 µl	50 µl
H ₂ O libre de ARNasas	Hasta 50 ml	Hasta 50 ml

Tabla 18. Reactivos para la realización de los gradientes de sacarosa.

Se añadió al tubo (Beckman Coulter, 344060) la solución del 10% y, a continuación, por debajo, la solución del 50% hasta llegar a la mitad del tubo. Se pusieron los tubos en el *Gradient master 108* (Biocomp), para generar los gradientes 10-50% de sacarosa.

Se añadió la muestra al gradiente y se ultracentrifugó a 36000 rpm 2 horas y 45 minutos a 4°C. Las muestras se fraccionaron con el *Pistón Gradient Fractionator* (Biocomp).

El análisis de los datos fue realizado midiendo el área bajo la curva de polisomas y monosomas con *ImageJ*. Se relativizó el área obtenida de polisomas al área obtenida de los monosomas y se comparó la condición de silenciamiento con la condición shCTRL.

4.10. CAPTURA DEL INTERACTOMA DEL ARN (RIC)

El ensayo de la captura del interactoma (RIC, por sus siglas en inglés), consiste en la captura del ARN con cola de poliA mediante la unión a unas *beads* magnéticas unidas a una cola de oligodT (**Figura 12**).

La realización de este protocolo es de varios días, realizando 3 réplicas biológicas de cada línea celular por separado. En primer lugar, se deben cultivar 12 placas de 150 mm por condición y réplica. Cada réplica tiene dos condiciones:

- La condición de *crosslinking* (CL). Las células se someten a radiación ultravioleta a 254 nm con el objetivo de que las uniones entre las RBPs y el ARN se hagan covalentes. De esta forma será difícil perder su unión.
- La condición de *no crosslinking* (nCL). Las células son utilizadas en su estado basal, no se someten a luz ultravioleta. Es el control negativo de la técnica. Las uniones entre el ARN y las RBPs son débiles y se pierden con los lavados.

Las placas de cultivo se mantienen en el incubador a 37°C y con un 5% de CO₂ hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia cuando se procede a su recolección para el ensayo. Para su recolección, se retira el medio de cultivo, se lavan con 5 ml de PBS 1X asegurándose de que recubre toda la placa, se retira y se añade 1 ml de PBS 1X cubriendo la placa con una capa fina. La placa se posiciona en el interior del *CL1000 crosslinker* (UVP) y se programa a 0.12 J/cm² de energía. Se recoge de la misma forma el control, en este caso sin

usar el *crosslinker*. Se debe alternar la recolección de las placas de la condición CL y de la condición nCL con el objetivo de que las células se recojan en un estado basal similar.

Una vez recogidas todas las placas, se centrifugan las muestras a 2.000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante y se almacena el precipitado a -80°C.

Reactivos	Casa comercial	TAMPÓN DE LISIS	TAMPÓN 1	TAMPÓN 2	TAMPÓN 3
Tris-HCl pH 7.5	Invitrogen (15-567-027)	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
LiCl	Sigma-Aldrich (L9650)	500 mM	500 mM	500 mM	200 mM
LIDS	Thermoscientific (413301000)	0.5%	0.1%	-	-
EDTA	Invitrogen (01273874)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
IGEPAL	Milipore (1003375764)	0.1%	0.1%	0.01%	-
DTT		5mM	5mM	5mM	5mM

Tabla 19. Reactivos de los diferentes tipos de tampones utilizados en el RIC.

El día del ensayo de precipitación se prepararon los tampóns de trabajo, añadiendo dTT. Se añadieron 7 ml de tampón de lisis al pellet (Tabla 19) y se lisó con ayuda de una jeringa con aguja de 26 G. Se recogió un 2% del lisado como input en un tubo de 1,5 ml.

- Se prepararon las Oligo d(T)₂₅ magnetic *beads* (NewEnglandBiolabs, S1419S). Para ello, se cogieron 700 µl de *beads* por muestra. Se retiró el líquido en el que vienen disueltas con ayuda de una gradilla magnética. Se realizaron 3 lavados con la misma cantidad de lisis tampón que de *beads* cogidas. Se añadieron 350 µl de *beads* a tubos libres de ARNasas de 15 ml y se añadieron las muestras.
- Se incubaron las muestras junto a las *beads* durante 1 hora a 4°C en rotación.
- La muestra se transfirió a un nuevo tubo de 15ml con otros 350 µl de *beads* para una segunda incubación en las mismas condiciones.
- Se realizaron una serie de lavados en las *beads* de la primera incubación:
 - Lavado con 7 ml de lisis tampón, incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido.
 - Lavado con 7 ml de tampón 1 (Tabla 19), incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido.
 - Repetición de lavado con el tampón 1, incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido.
 - Lavado con 7 ml de tampón 2 (Tabla 19), incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido.
 - Lavado con 2 ml de tampón 2, incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido y transferencia a tubo de 2 ml.
 - Lavado con 2 ml de tampón 3 (Tabla 19), incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido y transferencia a tubo de 2 ml.
 - Lavado con 2 ml de tampón 3, incubación de 5 minutos en hielo asegurándose de que las *beads* se homogeneicen con el líquido y transferencia a tubo de 2 ml.

En todos los lavados se aseguró de que se retiró todo el líquido, especialmente en los dos últimos para no arrastrar contaminantes.

- Se añadieron 200 μ l de tampón de elución a las *beads*. Se incubó 5 minutos a 55°C y terminado este tiempo se retiró rápidamente el líquido, que contiene el ARN unido a RBPs en un nuevo tubo de 1.5 ml libre de ARNasas.

Se realizó este mismo proceso de lavados y elución con las *beads* de la segunda incubación y se juntaron los eluidos. Se cuantificó la cantidad de ARN en el *Nanodrop 2000* (ThermoScientific).

Se retiraron 20 μ l de muestra, que no va a ser tratada con ARNasas. El resto de muestra se trata con ARNasa I y Ribonucleasa T para eliminar el ARN y quedarnos únicamente con la proteína. El tratamiento consistió en añadir ambos reactivos a las muestras y realizar una incubación de 45 minutos a 37°C y 15 minutos a 55°C. Se utilizaron 40 μ l para la realización de los controles de calidad.

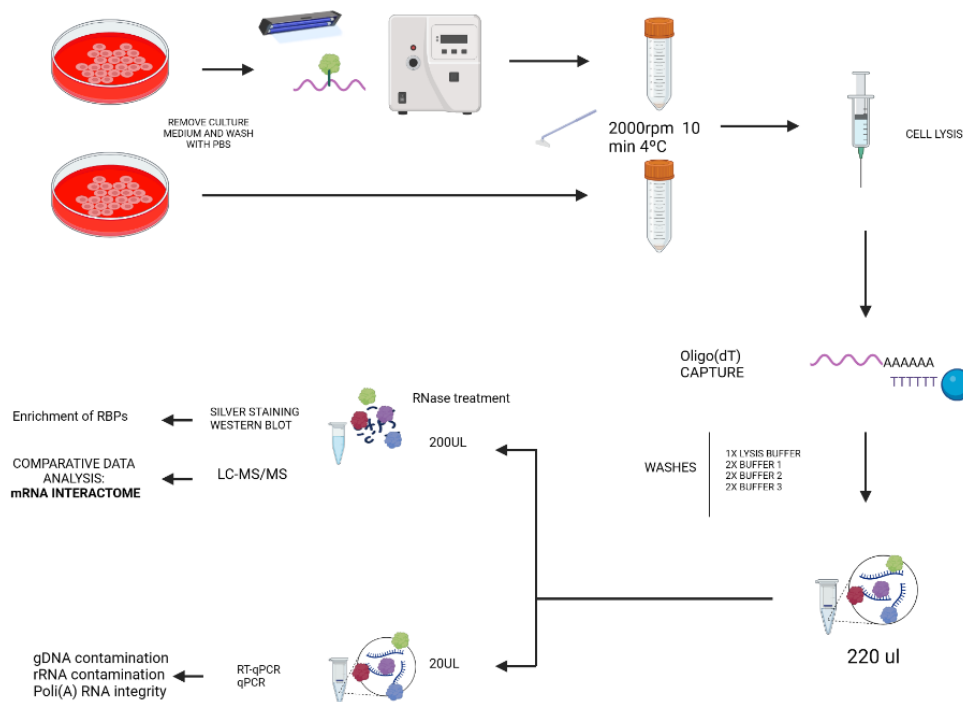


Figura 12. Esquema de flujo de trabajo del RIC. (Elaboración propia)

4.11. TINCIÓN DE PLATA

El protocolo de la tinción de plata se realizó siguiendo los pasos del kit comercial *SilverQuest™* (invitrogen LC6070).

Se prepararon las muestras añadiendo *tampón* de carga y se realizó la electroforesis en geles de acrilamida.

- Una vez completada la electroforesis, se retiraron los geles del cristal y se pusieron añadió la solución de fijación (Tabla 20) y se incubó durante al menos 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.

- Se retiró el fijador y se incubó el gel durante 10 minutos en etanol al 30% en agitación a temperatura ambiente.
- Se retiró el etanol y se añadió solución sensibilizadora (Tabla 20) que se incubó durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- Se retiró la solución sensibilizadora y se añadió de nuevo etanol al 30% que se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se retiró el etanol y se lavó el gel con H₂O ultrapura durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Es importante que el H₂O cubra completamente el gel.
- Se retiró el H₂O y se añadió solución de tinción (Tabla 20) durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- Se retiró la solución de tinción y se lavó la membrana con H₂O ultrapura 20-60 segundos.
- Se retiró el agua y se añadió solución de revelado (Tabla 20) o durante 4-8 minutos en agitación a temperatura ambiente hasta que aparecieron las bandas. Se añadió el *stopper* y se incubó durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se lavó con H₂O ultrapura y se realizó una foto en el *iBright*.

Solución de fijación	Solución sensibilizadora	Solución de tinción	Solución de revelado
10ml Ácido acético	10 ml sensibilizador	1ml de tinción de plata	10 ml de revelador
30 ml etanol	30 ml de etanol	99 ml H ₂ O ultrapura	1 gota de potenciador de revelado
60 ml H ₂ O ultrapura	60 ml H ₂ O ultrapura		89 ml H ₂ O ultrapura

Tabla 20. Reactivos de la técnica de tinción de plata.

4.12. RNASEQ

El RNA-seq se realizó con células de la línea celular S462 infectadas con partículas lentivirales con dos secuencias para el silenciamiento de LSM5 y el plásmido control. Se sembraron 250.000 células por pocillo, realizando 3 replicados biológicos. Se recogieron 48 horas después. Se retiró el medio, se lavó con PBS 1X y se añadió TRIzol. Se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se procedió a la extracción de ARN como se ha explicado previamente.

La calidad del ARN se midió en el *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen). El valor de RIN de las muestras para ser óptimas para secuenciar debe ser de más de 7. Las muestras fueron enviadas a *BGI Genomics*, donde se realizó la secuenciación.

La evaluación de la calidad se realizó con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Las bibliotecas de secuenciación de ARN se construyeron utilizando el protocolo de preparación de bibliotecas de ARNm (BGI) específico de cadena eucariota DNBSEQ y se secuenciaron en una plataforma BGISEQ-2000 utilizando lecturas de extremos emparejados de 150 pb. Los datos sin procesar con secuencias adaptadoras o secuencias de baja calidad se filtraron con los siguientes parámetros de filtro SOAPnuke (v1.6.5, BGI Tech

Solutions): "-n 0.001 -l 20 -q 0.4 --adaMR 0.25 --polyX 50 --minReadLen 150". El análisis de control de calidad de las lecturas filtradas se realizó utilizando FASTQC v0.12.1, FastQ Screen v0.15.1 y multiqc v1.14.

4.13. RIPSEQ

La técnica de inmunoprecipitación de ARN (RIP, por sus siglas en inglés) consiste en capturar la proteína de unión a ARN diana e identificar qué ARNs se unen a nuestra proteína y son regulados por ésta. El protocolo se realiza en tres días:

Día 1: Preparación de las *beads*.

- Se preparan 3 tubos por cada muestra y se pipetea la cantidad indicada de *beads* (Sepharose A) con una punta cortada con tijera:
 - Tubo IgG: 50 µl de *beads* (anti-rabbit IgG).
 - Tubo LSM5 : 50 µl de *beads* (anti-LSM5).
 - Tubo pre-lavado: 25 µl de *beads* (anti-rabbit IgG).
- Se realiza un lavado con 1ml de tampón NT2 (**Tabla 21**). Se centrifugan las muestras 5 min a 5000 G. Se descarta el sobrenadante. Se repite el lavado.
- Se preparan los anticuerpos y se añaden a los tubos con las *beads*.
 - Tubo anti IgG: 300 µl de tampón NT2 + 15 µg anti-rabbit IgG por tubo.
 - Tubo Anti-LSM5: 300 µl de tampón NT2 + 15 µg anti-rabbit anti-LSM5 por tubo.
 - Tubo pre-lavado: 150 µl de tampon NT2 + 7.5 µg anti-rabbit IgG por tubo.
- Se incuba 16 horas en rotación a 4°C.

Día 2: Inmunoprecipitación.

- Se prepara el lisado de células. Se realizó con la línea celular S462 y se utilizó una placa de 150 mm por muestras con una confluencia del 80%. Se retira el medio de cultivo, se realiza un lavado con PBS 1X, se retira y se añade 1 ml de tampón de trabajo de polisomas (tampón de polisomas al que se añade 1 mM DTT, 2.5 µl/ml RNasa OUT y 1 pastilla /10 ml de cóctel de inhibidores de la proteasa) (**Tabla 21**). Se recogen las células de la placa con ayuda de un *rascador*. Se transfieren las células a un tubo de 1,5 ml y se incuba a 4°C durante 10 minutos.
- Se centrifugan las muestras a 14.000g a 4°C durante 30 minutos. Se retira el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y se repite la centrifugación. Se recogen 50 µl de *Input*. La muestra se mantiene en hielo.
- Se realiza el prelavado de las muestras. Para ello se centrifugan los tubos de prelavado, se retira el sobrenadante y se añade el lisado total. Se incuba 30 minutos a 4°C en rotación. Se centrifugan las muestras 5 minutos a 10.000g, se recoge el sobrenadante en un nuevo tubo y se almacena en hielo.
- Se realiza la inmunoprecipitación, para ello se centrifugan 5 minutos a 10.000g los tubos de la IgG y LSM5. Se realiza un lavado con 1 ml de tampón NT2, se centrifugan 5 minutos a 10.000 g y se descarta el sobrenadante. Se divide la muestra clarificada entre

los 2 tubos y se completa con tampón NT2 hasta 1ml. Se incuba en rotación durante 1 hora a 4°C.

- Se realiza una centrifugación a 5.000 g durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante. Se añade 1ml de NT2 y se centrifuga a 10.000g durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante. Este paso de lavado se repite 5 veces.
En el último lavado se recogen 100 µl de *beads*. Se centrifugan 10.000g durante 5 minutos, se añade tampón de carga y se incuban 5 minutos a 95°C. Se centrifugan de nuevo, se retira el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 ml y se realiza un *western blot* para confirmar la precipitación de la proteína.
- Las muestras se tratan con diferentes reactivos para eliminar el ADN y proteínas contaminantes.
 - Se añaden 100 µl tampón NT2 + 5 µl DNase I por muestra, se mezcla invirtiendo el tubo y se incuba 15 min a 37 °C.
 - Se añaden 1 ml de tampón NT2 y se centrifuga 5 minutos at 5000g. Se descarta el sobrenadante.
 - Se añaden 100 µl de tampón NT2 + 1 µl SDS 10% + 5 µl Proteinasa K (por tubo) y se incuba 15 min a 55 °C en rotación a 900 rpm.
 - Se añaden 200 µl de tampón NT2 y se centrifuga 5 min at 5000g. Se recoge el sobrenadante con el ARN.
- Se realiza la extracción de ARN.
 - Se añaden 300 µl de fenol:cloroformo, se mezcla durante 1 min a máxima velocidad utilizando un vórtex y se realiza un *spin* a temperatura ambiente.
 - Se retira la fase superior en un nuevo tubo y se añaden 625 µl de etanol 100 % frío, 25 µl de acetato de sodio 3M, pH 5.5, y 10 µl de glicógeno. Se mezcla y se incuba 16 horas a -20°C

Día 3: Finalización de la extracción de ARN.

- Se finaliza la extracción de ARN.
 - Se centrifugan las muestras durante 30 minutos a 14.000 rpm a 4 °C.
 - Se lava el precipitado con etanol 70% frío y se centrifugan durante 10 min at 14.000 rpm and 4°C.
 - Se retira el sobrenadante y se deja secar durante 5 minutos.
 - El ARN se disuelve en 20 µl de H₂O libre de ARNasas.

Las muestras se cuantifican en el *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen).

Tampón NT2	Tampón de polisomas
50 mM Tris pH 7.4	10 mM Hepes pH 7
150 mM NaCl	150 mM NaCl
1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂
0.05 % NP40	0.05 % NP40
Hasta 250 µl H ₂ O libre de ARNasas.	Hasta 250 µl H ₂ O libre de ARNasas.

Tabla 21. Reactivos del RIP.

BGI Tech Solutions preparó bibliotecas específicas de cadena inversa a partir de ARN aislado en experimentos RIP de LSM5 de acuerdo con su protocolo de preparación de bibliotecas IncRNA-seq. A partir de cada muestra se prepararon tres réplicas biológicas. La integridad del ARN se evaluó utilizando un BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando nanochips de ARN. El ARN ribosomal de las muestras se eliminó con RiboZero (Illumina), este proceso se conoce en inglés como *ribodepletion*. Las bibliotecas se prepararon con el kit de preparación de bibliotecas de ARNm trenzado TruSeq (Illumina). Las bibliotecas se secuenciaron en un BGISEQ-500 (100 pb, extremo pareado).

4.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en los experimentos se representan como la media de los grupos \pm la SEM (error estándar de la media). El tamaño medio de las poblaciones de estudio de cada experimento está reflejado en los pies de figura de los resultados. Se realizó el análisis *one-way ANOVA* y en test de comparación múltiple Tukey en los casos de experimentos con más de dos grupos y el análisis *t-student* en experimentos con análisis de dos grupos. Se considera una diferencia estadísticamente significativa a partir de $p < 0.05$.

4.15. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

4.15.1. Datos públicos

Para la priorización de genes candidatos se utilizaron conjuntos de datos públicos de Gene Expression Omnibus (GEO) de muestras humanas de NF y MPNST:

- (1) GSE14038 (149): Microarray de 13 muestras de NFc , 13 muestras de NFp, 6 muestras de MPNST
- (2) GSE66743 (150): Microarray de 8 muestras de NF y 30 muestras de MPNST.
- (3) GSE41747 (151) Microarray de 3 muestras de nervio, 26 muestras de NF y 6 muestras de MPNST.
- (4) GSE141438 (152). *RNAseq* de 7 muestras de nervio, 3 muestras de NF y 7 muestras de MPNST

En el caso del conjunto de datos *RNA-seq* GSE141438, se obtuvieron datos brutos y se realizó un análisis de expresión diferencial con DESeq2 1.34.0 (R 4.1.3). Se consideraron genes expresados diferenciales (DEGs) como aquellos genes con valor $p < 0.05$ y *Fold change* > 1.5 . Los genes significativamente regulados al alza en MPNST en relación con NF se compararon entre conjuntos de datos para obtener una huella dactilar robusta de genes sobreexpresados en MPNST. Las RBPs se anotaron de acuerdo con una base de datos de referencia obtenida del repositorio alfa RBPbase v0.2.1 (<https://apps.embl.de/rbpbase/>, fecha de acceso 03.08.2023).

Además, se utilizaron datos de *GEPIA*, un servidor web interactivo recientemente desarrollado para analizar datos de expresión de ARN de 9,736 tumores y 8,587 muestras normales, provenientes de los proyectos TCGA y GTEx.

4.15.2. *Single cell*

Se obtuvieron matrices filtradas con 10X *Cell Ranger* de un experimento scRNA-seq (secuenciación de ARN de célula única) que contenía muestras humanas de 10 NF y 4 MPNST de *Gene Expression Omnibus* (GEO) con el número de acceso GSE179033 (153). Para el

análisis posterior se utilizó el paquete Seurat (v4.3.0) en R (4.1.3). Para el control de calidad, se eliminaron células con contenido mitocondrial >20%. Se aplicó un punto de corte de 200 a 9.000 genes. Los datos se normalizaron logarítmicamente y se realizó una regresión en el porcentaje de genes mitocondriales durante el escalado de los datos, utilizando la proporción de mitocondrias como argumento para *'vars.to.regress'*. Las muestras se corrigieron por lotes utilizando la función *FindIntegrationAnchors* y Reciprocal PCA (RPCA). El análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando los 3.000 genes más variables y el análisis UMAP se realizó con los 25 PCA principales. El agrupamiento se realizó con una resolución de 0.5. Para la anotación de células, se realizó una puntuación de los diferentes marcadores de tipo de célula descritos en el artículo original¹¹ utilizando la función *AddModuleScore()* en el paquete Seurat con parámetros predeterminados. Para la visualización de los datos también se utilizó SCpubr (v2.0.1). Este análisis fue llevado a cabo por la Dra. Cristina Riobello.

4.15.3. RNAseq

Para el análisis de expresión diferencial:

Las lecturas filtradas se alinearon con el genoma humano de referencia (GRCh38 Ensembl release 105) y los recuentos brutos se obtuvieron utilizando el alineador STAR (versión 2.7.9a). El análisis de expresión diferencial se realizó con DESeq2 1.44.0 (R 4.4.0). El umbral para determinar si un gen se expresa diferencialmente (DEG) fue $p_{adj} < 0.05$ y un FC absoluto > de 1.5. En primer lugar, se realizó una comparación entre cada grupo silenciado y el grupo WT. Los genes comunes expresados diferencialmente entre ambas comparaciones se seleccionaron como DEG robustos y se utilizaron para el análisis posterior. Se realizó un análisis de *Gene Ontology*, GSEA y un análisis KEGG con los paquetes R *clusterProfiler* v4.12.0, *msigdb* v7.5.1 y *pathview* v1.44.0.

Para el análisis de splicing:

Se utilizó el conjunto de herramientas de empalme y transcripción alternativas de vertebrados (VAST-TOOLS v2.5.1) para la detección de eventos de empalme. Las muestras se compararon con la versión hg38 del genoma humano (vastdb.hs2.23.06.20). Para realizar el análisis diferencial de EA, se aplicó el módulo "Compare" -para comparar las seis muestras de ambos silenciamientos respecto al grupo WT. Este módulo utiliza una estrategia no estadística que evita que aquellos eventos de genes altamente expresados tengan más peso en comparación con el resto como ocurre con otras herramientas (o el módulo "diff" de VAST-TOOLS). Con "Compare" se seleccionaron aquellos eventos con una cobertura mínima (umbral mínimo VLOW, $--min_dPSI$ (diferencial percentage splice in) 15 para obtener solo aquellos eventos con una diferencia de PSI entre grupos mayor al 15% ($\Delta PSI > 15$), y $--min_range$ 5 para seleccionar solo eventos con al menos un $\Delta PSI > 5$ entre las muestras más estrechamente emparejadas de los diferentes fenotipos. La salida final del módulo "Compare" genera una fila para cada evento con su identificador, ΔPSI y tipo de evento, entre otra información. La canalización de VAST-TOOLS identifica cuatro tipos de eventos de *splicing*: *intron retention* (IR), *exon skipping* (AltEX, including microexons) and *alternative donor and acceptor sites* (ATL 5' and Alt3').

4.15.4. RIPseq

Después de la secuenciación, las lecturas sin procesar se filtraron con los siguientes parámetros de filtro SOAPnuke (v1.6.5, BGI Tech Solutions): "-n 0.001 -l 20 -q 0.4 --adaMR

0.25 --polyX 50 --minReadLen100". Las lecturas filtradas se alinearon con el genoma de referencia humano (GRCh38.105) utilizando el alineador STAR (versión 2.7.9a) con la opción *alignEndsProtrude 3 ConcordantPair*, que permite la protrusión de los extremos de alineación, y *peOverlapNbasesMin 5*, que permite la fusión y el mapeo de lecturas de extremos emparejados superpuestos para mejorar la precisión del mapeo para la superposición. Los recuentos de lectura se calcularon mediante HTSEQ-count con la modalidad *intersection-strict* (versión 2.0.2). Para detectar los ARNm unidos a LSM5 se realizó un análisis de expresión diferencial para la comparación LSM5-IP vs *Input* con DESeq2 1.34.0 (R 4.1.3). Los genes expresados diferencialmente (DEGs) con valor $p < 0.05$ y *Fold Change* > 1.5 se consideraron como potenciales dianas directas de LSM5 debido a su enriquecimiento significativo en la fracción IP frente al insumo total.

4.15.5. Proteómica

4.15.5.1. Digestión de proteínas:

Con el fin de realizar la identificación y cuantificación global de proteínas, se cargó un volumen igual de todas las muestras en un gel SDS-PAGE al 10%. La carrera se detuvo tan pronto como la parte delantera penetró 3 mm en el gel de resolución. La banda proteica fue detectada por tinción fluorescente Sypro-Ruby (Lonza, Suiza), extirpada y procesada para la digestión triptica manual en gel, como se describe en otra parte (1-5). Los péptidos se extrajeron realizando tres incubaciones de 20 min en 40 μ L de acetonitrilo al 60% disuelto en HCOOH al 0.5%. Los extractos peptídicos resultantes se agruparon, se concentraron en un SpeedVac y se almacenaron a -20°C .

4.15.5.2. Identificación de proteínas por LC-MS/MS (adquisición de DDA) (1-5)

Los péptidos digeridos (más de 4 g de cada muestra) se separaron mediante cromatografía de fase inversa. Se creó un gradiente utilizando un sistema de cromatografía microlíquida (Eksigent Technologies nanoLC 400, Sciex) acoplado a un espectrómetro de masas Triple TOF 6.600 de alta velocidad (Sciex) con una fuente de microflujo. La columna analítica fue una columna de fase reversa a base de sílice Eksigent C18 de 150×0.30 mm, tamaño de partícula de 3 μm y tamaño de poro de 120 \AA (Eksigent, Sciex). La columna trampa fue una YMC-TRIART C18 (YMC Technologies, Teknokroma) con un tamaño de partícula de 3 μm y un tamaño de poro de 120 \AA , conmutada en línea con la columna analítica. La bomba de carga suministró una solución de ácido fórmico al 0.1% en agua a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. La microbomba generó un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ y fue operada en condiciones de elución en gradiente, utilizando ácido fórmico al 0,1% en agua como fase móvil A, y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo como fase móvil B. Los péptidos se separaron utilizando un gradiente de 90 minutos que osciló entre el 2% y el 90% de la fase móvil B.

La adquisición de datos se realizó mediante un sistema TripleTOF 6.600 (Sciex, Foster City, CA) utilizando un flujo de trabajo de análisis dependiente de datos (DDA). Las condiciones de la fuente y de la interfaz fueron las siguientes: tensión de pulverización de iones flotante (ISVF) 5.500 V, gas de cortina (CUR) 25, energía de colisión (CE), 10 y gas de fuente de iones 1 (GS1) 25. El instrumento fue operado con el software Analyst TF 1.7.1 (Sciex, USA). Los criterios de conmutación se establecieron en iones mayores que la relación masa/carga (m/z) 350 y menores que m/z 1.400 con un estado de carga de 2-5, tolerancia a la masa de 250 ppm y un umbral de abundancia de más de 200 recuentos por segundo (cps). Los iones precursoros diana anteriores se excluyeron durante 15 s. El instrumento se calibró

automáticamente cada 4 horas utilizando péptidos trípticos de PepCalMix como calibrador externo.

4.15.5.3. *Análisis de los datos del PDD*

Después del análisis MS/MS (datos MS2), los archivos de datos se procesaron utilizando el *software* ProteinPilot™ 5.0.1 de Sciex, que utiliza el algoritmo Paragon™ para la búsqueda en la base de datos y Progroup™ para la agrupación de datos. Los datos se buscaron utilizando una base de datos Uniprot específica para humanos (<https://www.uniprot.org/>), especificando yodoacetamida en la alquilación de cisteína como modificación variable y la oxidación de metionina como modificación fija. La tasa de falsos descubrimientos se realizó utilizando un método de ajuste no lineal, mostrando solo aquellos resultados que informaron una tasa global de falsos descubrimientos del 1% o mejor. (6)

4.15.5.4. *Cuantificación relativa: Recuento espectral*

Se utilizó Scaffold (versión Scaffold-5.2.2 Proteome Software Inc., Portland, OR) y Scaffold DDA (versión Scaffold DDA-6.4.1 Proteome Software Inc., Portland, OR) para realizar un análisis semicuantitativo mediante conteo espectral (7, 8). Se utilizaron archivos de andamio que contenían muestras de CL y nCL de cada línea celular para generar un archivo de informe de muestras con un umbral de proteína del 99%, péptidos mínimos = 2 y un umbral péptido del 95%. Se aplicó el paquete DEP R v1.16.0 para obtener los ACP y la Matriz de Correlación de los datos. Se aplicó el módulo de preprocesamiento APOSTL *galaxy toolshed* (<http://apostl.moffitt.org/>) SAINT para obtener los archivos de entrada de SAINTexpress. Se realizó el análisis de SAINTexpress v3.6.3 para detectar las posibles RBPs. Se seleccionaron proteínas significativas como aquellas con $BFDR \leq 0.05$.

Los análisis bioinformáticos fueron llevados a cabo por la Dra. Cristina Riobello.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. PAPEL DE LSM5 EN LA PROGRESIÓN Y METÁSTASIS TUMORAL

Los MPNSTs, como se ha mencionado previamente, no disponen de tratamientos terapéuticos eficientes. Por esta razón, la búsqueda de nuevas proteínas diana para el tratamiento de los MPNSTs es fundamental para la mejora de la supervivencia global, así como de la calidad de vida de los pacientes.

5.1.1. Selección de LSM5 como RBP candidata a través de análisis bioinformáticos

Se realizó un análisis bioinformático con 4 bases de datos de *microarray* o *RNA-Seq* (GSE14038, GSE41747, GSE66743, GSE141438) que contienen información de muestras de tejido nervioso de pacientes sanos, muestras de tejido de neurofibroma y muestras de tumores MPNST. Se realizó un análisis de expresión diferencial de las muestras de MPNST respecto a neurofibroma utilizando como criterio - un p-valor ajustado < 0.05 y *fold change* > 1.5 (Figura 13A). Realizando un análisis comparativo entre todas las bases de datos, se obtuvo una lista de 127 genes que se mostraron desregulados significativamente en todas ellas.

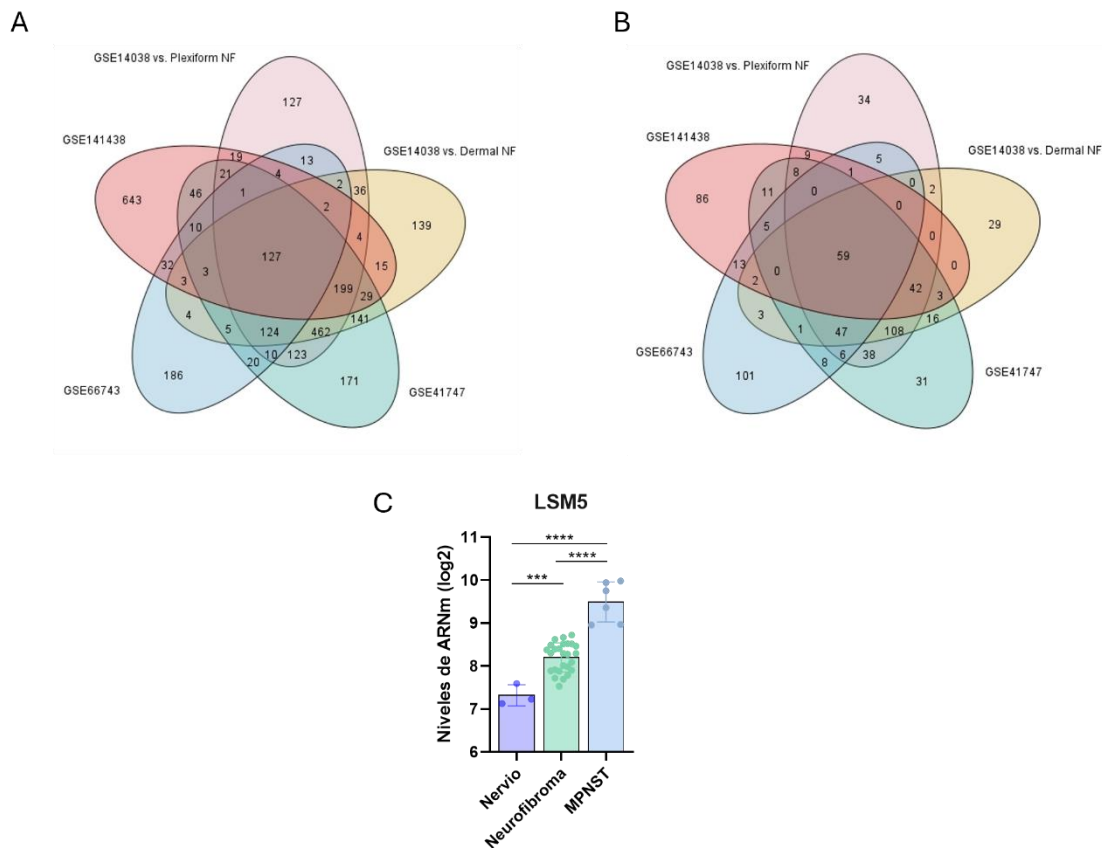


Figura 13. LSM5 se expresa más en MPNST que en neurofibroma. (A, B) Diagramas de Venn de diferentes bases de datos de *microarray*/*RNA-Seq*, (A) comparación de la expresión de todos los genes. (B) comparación de la expresión de genes de proteínas de unión al ARN. (C) Gráfico de barras de una de las bases de datos

representativas (GSE41747), demostrando la expresión de LSM5 en nervio humano (n= 3), neurofibroma (n=26) y MPNST (n=6). One-way Anova; *** p<0.001, ****p<0.0001. (Elaboración propia)

Dado que las proteínas de interés en este estudio son las proteínas de unión al ARN (RBPs por sus siglas en inglés: *RNA binding proteins*), por su papel en la regulación de la expresión génica, se aplicó el filtro de genes que codifican proteínas de unión al ARN conocidas a los datos obtenidos en el análisis anterior. De los 127 genes obtenidos inicialmente, 59 constituyen genes que codifican RBPs que se expresan diferencialmente en MPNST respecto a neurofibroma con p-valor ajustado < 0.05 y *fold change* > 1.5 (**Figura 13B**). Se realizó una búsqueda manual de los posibles candidatos y se seleccionaron aquellos genes que no se habían relacionado previamente con cáncer. Los datos preliminares (no mostrados en esta tesis) nos condujeron a seleccionar *LSM5* como el principal candidato.

Según la base de datos GEPIA2, que recoge datos de muestras de pacientes con diferentes tipos de tumores y de muestras del tejido sano, *LSM5* tiene una mayor expresión en la mayoría de los tumores respecto al tejido sano correspondiente (**Figura 14A**). Utilizando la misma base de datos, se realizó un análisis de la supervivencia global en pacientes con sarcoma (MPNST es un tipo de sarcoma de tejido blando) y se vio que los pacientes con mayor expresión de *LSM5* tenían tendencia a tener una menor supervivencia que aquellos pacientes que tenían niveles más bajos de *LSM5* (**Figura 14B**). Además, se realizó un análisis de supervivencia global de los datos de pacientes registrados en la base de datos GSE66743. Los pacientes de MPNST con mayor expresión de *LSM5* tienen un porcentaje de supervivencia significativamente menor que aquellos pacientes que tienen una expresión de *LSM5* menor (**Figura 14C**).

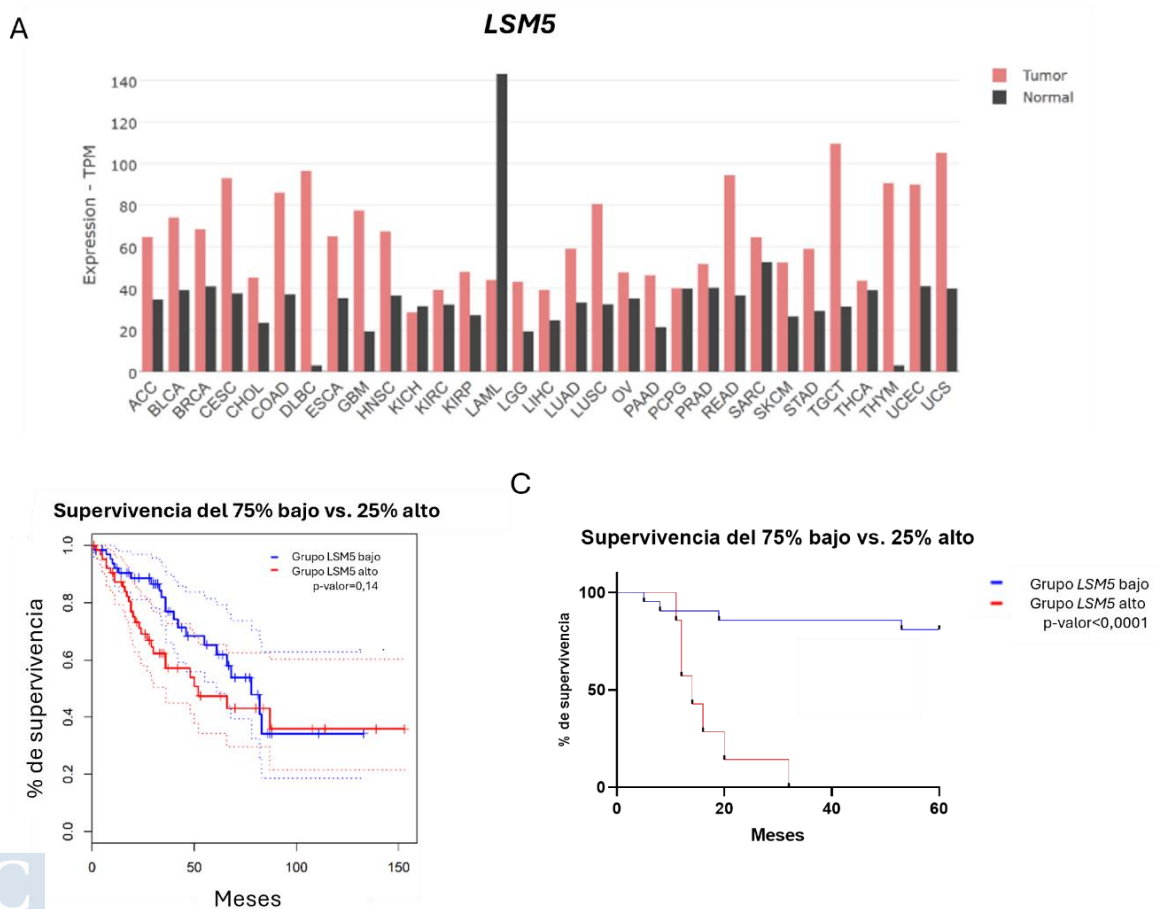


Figura 14. LSM5 podría tener una implicación en el desarrollo tumoral. (A) Gráfico de barras de la expresión

de *LSM5* (Transcripciones por millón de kilobases, TPM) en muestras de varios tumores y su tejido sano correspondiente. (B) Gráfico de supervivencia global de pacientes con sarcoma con alto nivel de expresión de *LSM5* respecto a pacientes con bajo nivel de *LSM5*. (C) Gráfico de supervivencia global de pacientes con MPNST de la base de datos GSE66743 con alto nivel de expresión de *LSM5* respecto a pacientes con bajo nivel de *LSM5* (el 25% de pacientes con mayor expresión de *LSM5* vs. el 75% con menor expresión). (Elaboración propia)

Para examinar más a fondo la expresión de *LSM5* en MPNST, se realizó un análisis de la base de datos GSE179043, la cual contiene datos de *single-cell RNA sequencing* (scRNA-seq) de muestras de tumores de MPNST (n=4) y muestras de neurofibroma (n=10). Esta base de datos nos permitió estudiar los niveles de expresión de *LSM5* en diferentes poblaciones celulares del tumor, incluidas las células de Schwann. Los datos obtenidos revelaron que *LSM5* se expresa en un mayor porcentaje de células en MPNST que en NF (**Figura 15A, B**).

Los datos obtenidos de los análisis bioinformáticos sugieren que *LSM5* puede tener un papel relevante en la patogénesis de los MPNST.

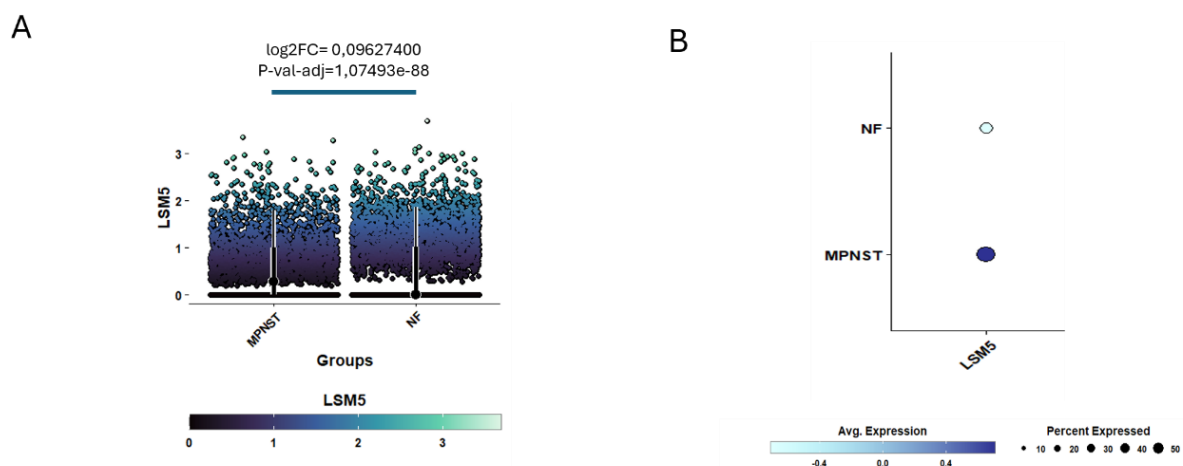


Figura 15. *LSM5* se expresa en un mayor porcentaje de células en MPNST que en NF en el clúster de células de Schwann (A) GeyserPlot que representa los counts normalizados en células individuales de los grupos MPNST y NF. Cada punto representa una célula, y el color indica el número de counts por célula. (B) Dotplot que muestra la expresión media del gen *LSM5* en cada fenotipo; el color representa la expresión media del gen en ese fenotipo, y el tamaño del círculo indica el porcentaje de células que expresa el gen. Resultados del análisis de expresión diferencial de *LSM5* en la comparación MPNST vs. NF en células de Schwann, realizado con un Wilcoxon rank sum test (Seurat 4.3.0). (Elaboración propia)

5.1.1. Validación de la expresión de *LSM5* en muestras humanas y líneas celulares

Una vez completados los análisis bioinformáticos, validó la expresión diferencial de *LSM5* en diferentes líneas celulares. En concreto, en dos líneas celulares de Schwann humanas inmortalizadas (iHSC λ 1 e iHSC λ 2), dos líneas celulares de neurofibroma (CRL3388, CRL3389) y tres líneas celulares de MPNST (S462, 90-8 y T265). La validación se realizó a nivel de ARN y a nivel de proteína. Se pudo confirmar la mayor expresión a nivel de ARN y proteína de nuestra RBP candidata en muestras de líneas celulares de MPNST respecto a muestras de líneas celulares de neurofibroma y de células de Schwann inmortalizadas (**Figura 16A, B**).

Esta expresión diferencial de *LSM5* se confirmó, además, en muestras de pacientes de tejido sano, de tejido de neurofibroma y de tejido de MPNST a nivel de proteína (Figura 16C, D). No obstante, a nivel de ARN solo pudimos confirmar una tendencia de aumento de la expresión de *LSM5* en las muestras de paciente de MPNST derivado de NF, pero no en las muestras de MPNST esporádico.

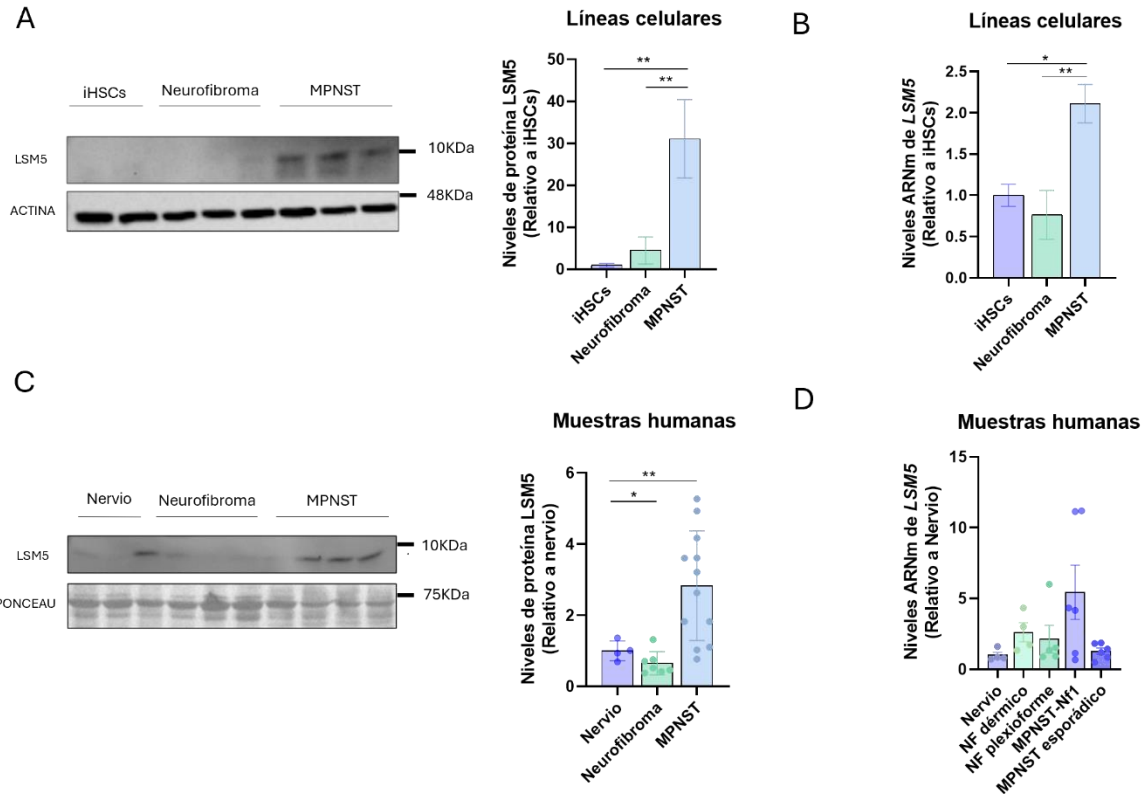


Figura 16. *LSM5* está sobreexpresado en líneas celulares de MPNST y en muestras de tumores de MPNST. (A, C) *Western blot* que muestra el aumento de los niveles en de *LSM5* en (A) líneas celulares MPNST, y (C) muestras de pacientes con MPNST, comparado con líneas o muestras sanas o de neurofibroma. Los gráficos a la derecha representan la densitometría de los *Western blots*. (B, D) qPCR que muestra el aumento de los niveles de *LSM5* en (B) líneas celulares MPNST, y (D) muestras de pacientes con MPNST, comparado con líneas o muestras sanas o de neurofibroma (ΔCt relativo a *GAPDH*). Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

5.1.2. El silenciamiento de *LSM5* reduce las propiedades tumorales en células de MPNST

A raíz de los resultados positivos obtenidos en las muestras de líneas celulares y humanas, consideramos que *LSM5* podría tener un papel clave en el proceso de transformación de neurofibromatosis a MPNST. Para comprobarlo, decidimos silenciar la expresión de *LSM5* para ver qué implicaciones podría tener en distintos aspectos del desarrollo tumoral. El silenciamiento se realizó mediante infección lentiviral de células de MPNST, usando dos secuencias de ARN de horquilla corta (*shRNA*, por sus siglas en inglés). Las células silenciadas se seleccionaron mediante la adición de puomicina. Se utilizaron las líneas celulares T265 y S462 para los ensayos funcionales. Ambas son líneas celulares de MPNST procedente de neurofibroma.

En primer lugar, decidimos estudiar el papel de *LSM5* en la proliferación y citotoxicidad de las células. Para ello, medimos los niveles de ATP en líneas celulares de MPNST, comparando células control con líneas en las que se silenció *LSM5*. Primero, comprobamos que las 2 secuencias de *shRNA* que utilizamos fueron efectivas para silenciar la expresión de *LSM5* (Figura 17A). El silenciamiento de *LSM5* redujo los niveles de ATP en líneas celulares tumorales respecto al control, lo cual parece indicar que una disminución en la expresión de *LSM5* puede provocar una reducción en la proliferación o en la viabilidad de las células de MPNST (Figura 17B).

Para comprobar que los efectos del silenciamiento se producen de manera específica en las células malignas, se repitió este mismo ensayo en una línea celular de células de Schwann immortalizadas (iHSC λ 2). El descenso de los niveles de ATP en células tumorales fue significativamente mayor que en las células de Schwann immortalizadas, por lo que se concluyó que efecto del silenciamiento de *LSM5* es mayor en células tumorales que en células procedentes de tejido sano (Figura 17C).

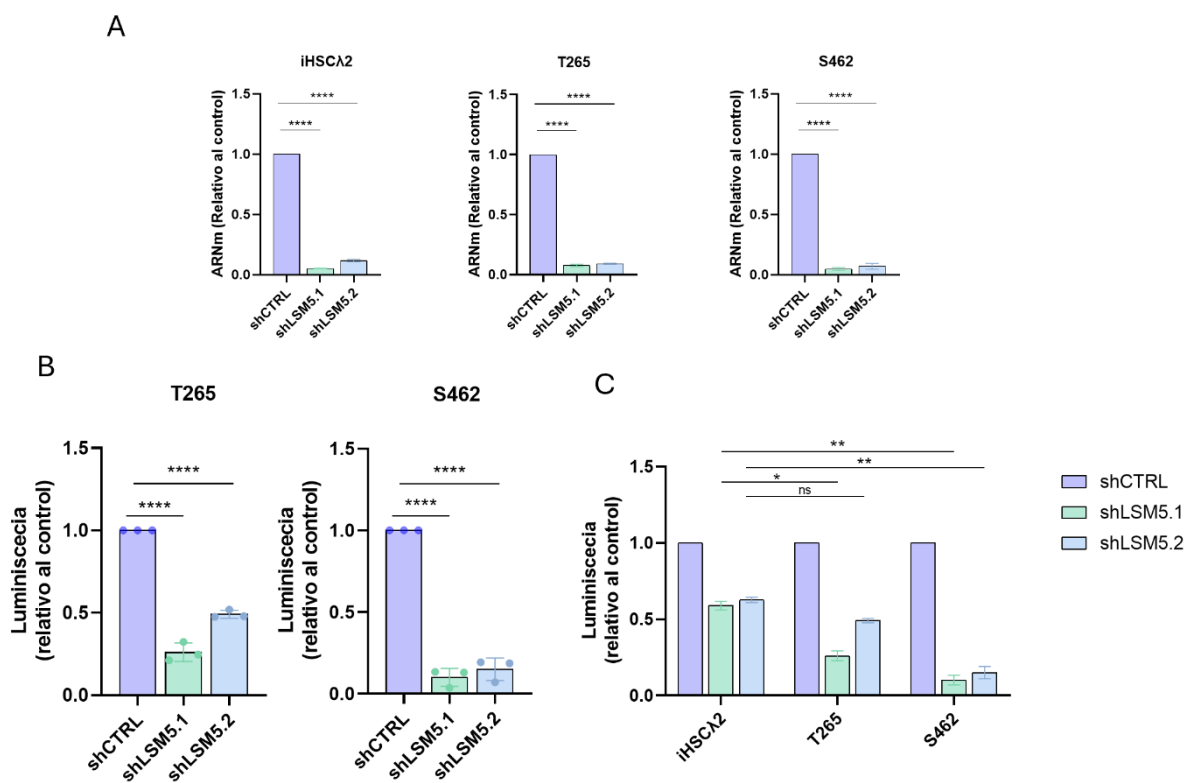


Figura 17. Los niveles de ATP se reducen al silenciar *LSM5*. (A) Comprobación del silenciamiento de *LSM5* en las diferentes líneas celulares (iHSC λ 2, T265 y S462) ($\Delta\Delta$ Ct relativo a *GAPDH* y shCTRL). (B) Los niveles de ATP se reducen al silenciar *LSM5* en líneas de MPNST. (C) Comparación de la reducción de los niveles de ATP en líneas MPNST respecto a la línea iHSC λ 2. Los experimentos de ATP se realizaron con una n=3, cada replicado biológico procede de la media de tres replicados técnicos. Los datos se representan como media \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. (Elaboración propia)

Una vez comprobado que el silenciamiento de *LSM5* tiene un mayor impacto en células tumorales se decidió estudiar si tenía implicaciones en otros procesos relacionados con la progresión tumoral. En primer lugar, se comprobó el efecto en la viabilidad celular realizando un conteo del número de células dos días después de ser seleccionadas con puromicina (Figura

18A). Se confirmó que el silenciamiento de *LSM5* en dos líneas celulares de MPNST reduce el número de células viables respecto a las células con silenciamiento control (**Figura 18B**).

Además, realizamos un ensayo de formación de colonias, basado en la capacidad de una sola célula de crecer hasta formar una colonia. Comprobamos que la reducción de la expresión de *LSM5* en las dos líneas celulares de MPNST disminuye drásticamente la capacidad de las células tumorales de crecer en forma de colonia, es decir, de crecer de forma ilimitada. De hecho, no pudimos observar la formación de colonias después del silenciamiento (**Figura 18C**).

También estudiamos la propiedad de las células tumorales de crecer independientemente de tener una superficie de anclaje, mediante el ensayo de formación de colonias en agar blando. Comprobamos que el silenciamiento de *LSM5* reduce esta propiedad de las células tumorales en la línea celular S462 (**Figura 18D**). La línea celular T265 no tiene la capacidad de crecer en estas condiciones.

Con la finalidad de conocer si la reducción de las propiedades tumorales se debe a una disminución de la proliferación de estas células, se realizó un ensayo de incorporación de BrDU. Confirmamos que las células silenciadas poseen una menor capacidad de proliferación que las células tumorales (**Figura 19A, B**). Además, se utilizó la línea celular S462 para medir los niveles de proteína de dos componentes indispensables en el ciclo celular, PCNA y CDK2. Se comprobó que ambos marcadores disminuyen sus niveles de proteína en las células silenciadas, por lo que la reducción de la proliferación podría deberse a una perturbación del ciclo celular (**Figura 19C**). Finalmente, se evaluaron los niveles de ARNm de *P21*, un gen implicado en el bloqueo del ciclo celular (**Figura 19D**). Se observó un aumento en la expresión de *P21* tras el silenciamiento de *LSM5* en comparación con las condiciones control. Estos resultados parecen confirmar la importancia de *LSM5* para el correcto funcionamiento del ciclo celular.

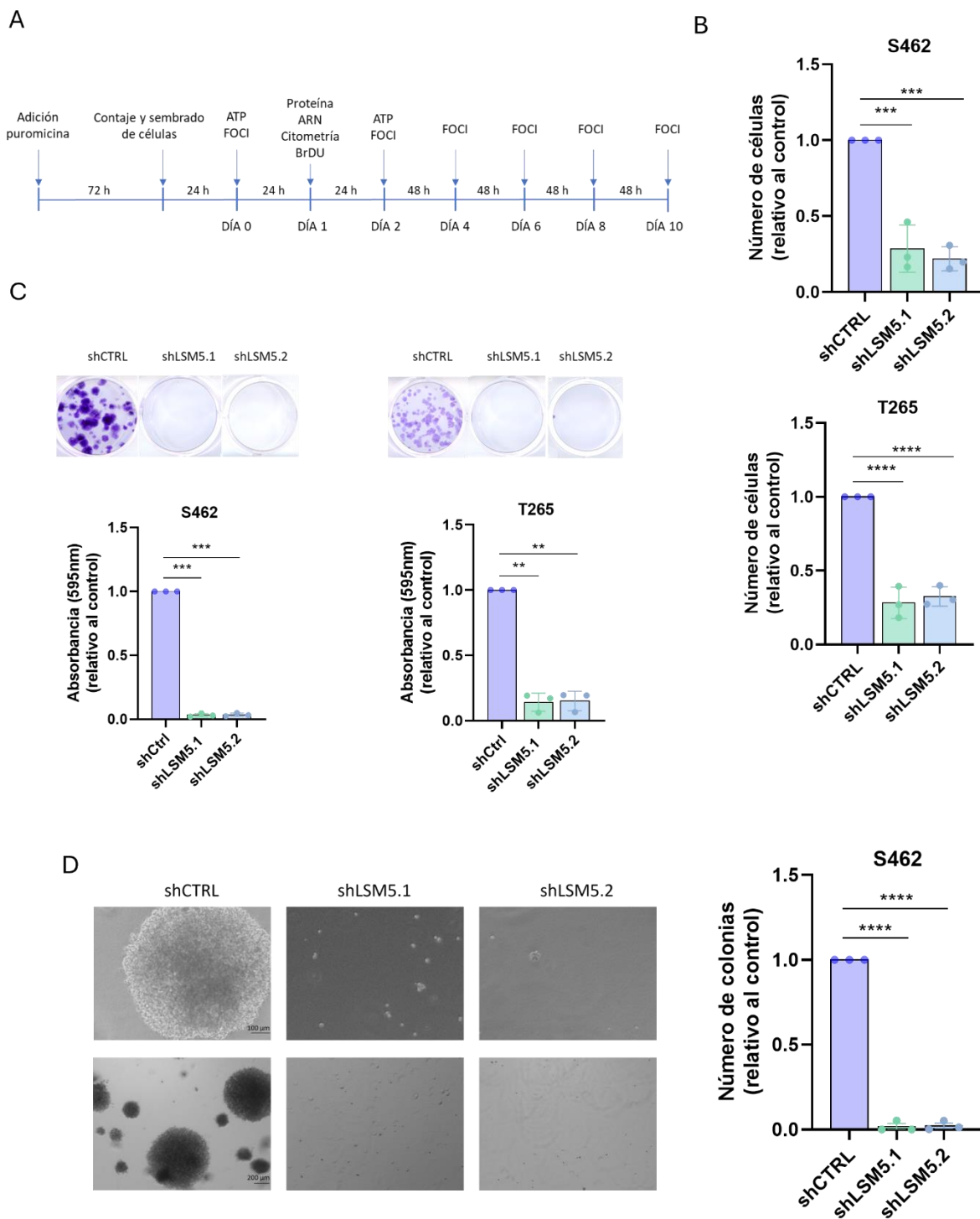


Figura 18. Reducción de las propiedades tumorales en células de MPNST al reducir la expresión de *LSM5*. (A) Esquema temporal de los diferentes ensayos funcionales. (B) Representación gráfica de la reducción del número de células en el silenciamiento de *LSM5*. (C) Representación gráfica y visual del ensayo de formación de colonias en células controles y silenciadas. (D) Representación gráfica y visual del ensayo de *soft agar* en células de MPNST con reducción de los niveles de *LSM5* respecto a los controles. Estos ensayos están realizados con $n=3$, cada replicado biológico se ha obtenido de la media de 3 replicados técnicos. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. (Elaboración propia)

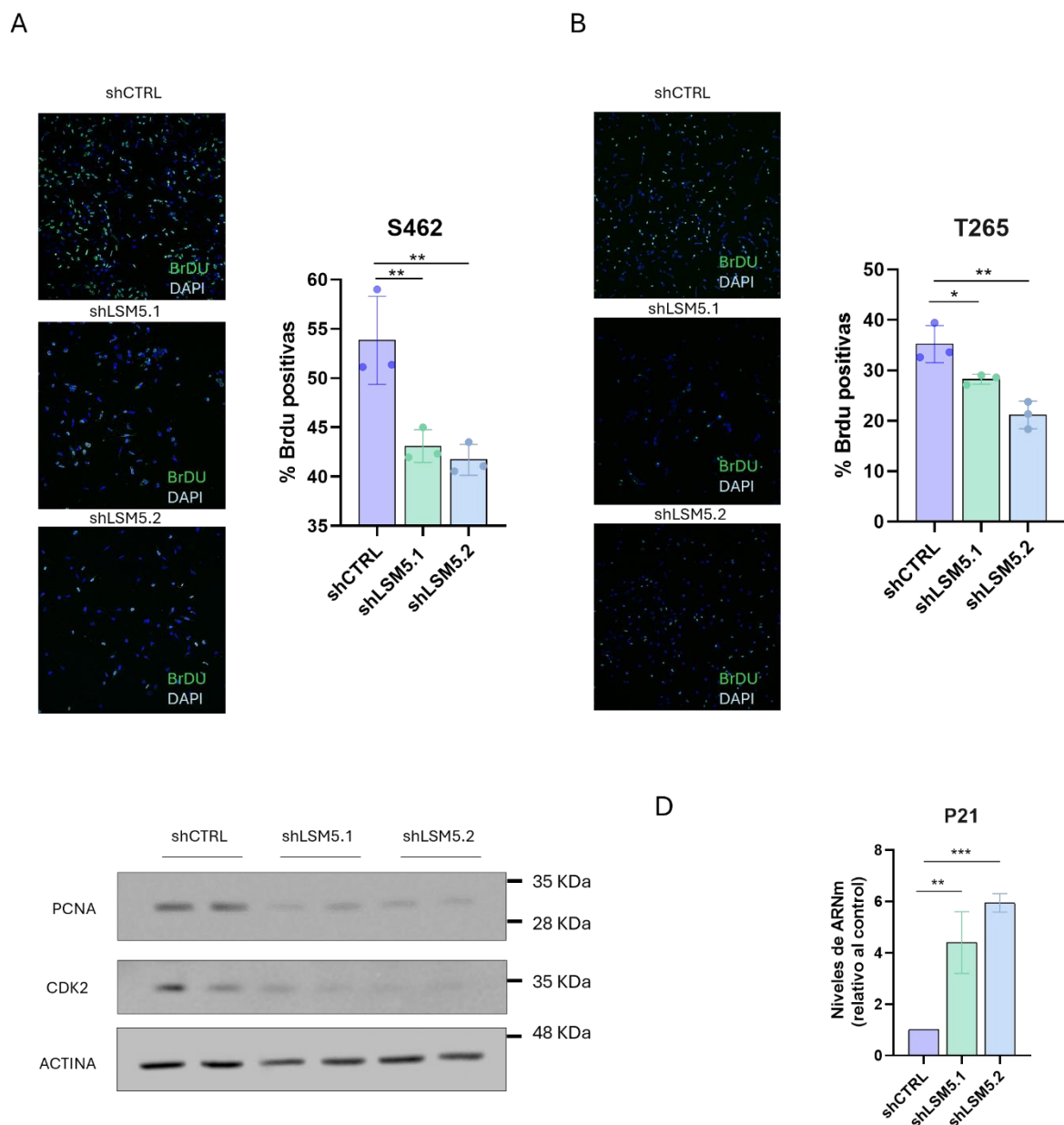


Figura 19. El silenciamiento de *LSM5* reduce la capacidad proliferativa de las células tumorales. (A, B) Representación visual y gráfica del ensayo de incorporación de BrDU en las líneas celulares de MPNST (A) S462 y (B) T265. (C) *Western blot* de dos proteínas importantes implicadas en el ciclo celular: PCNA y CDK2. (D) Datos de qPCR del aumento de la expresión de *P21* en células silenciadas ($\Delta\Delta C_t$ relativo a *GAPDH* y shCTRL). Los ensayos de BrDU están realizados con n=3, cada replicado biológico se ha obtenido de la media de 3 replicados técnicos. Los datos se representan como media \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. (Elaboración propia)

5.1.2. Las células silenciadas no tienen capacidad de formar un tumor en los trasplantes de xenoinjertos

Una vez comprobado que el silenciamiento de *LSM5* reduce las propiedades tumorales de las líneas de MPNST *in vitro*, se decidió estudiar si las células silenciadas tenían capacidad de formar tumores en ratones de tipo *Nude*, unos ratones utilizados frecuentemente en este tipo de estudios porque tienen el sistema inmunitario debilitado y la formación de tumores se produce más fácilmente.

Para la realización de este ensayo, se utilizaron células de la línea celular S462, ya que previamente se había publicado que son capaces de formar tumores en ratones *Nude* mediante inyección subcutánea (44). Se inyectaron de forma subcutánea células silenciadas con *LSM5* y células controles a ratones *Nude* y se llevó a cabo el seguimiento de los ratones, midiendo los tumores dos semanas después de la inyección. Los ratones fueron sacrificados a las 7 semanas post-inyección (**Figura 20A**). Primero, se comprobó que efectivamente en las células infectadas con shLSM5.2 no se expresaba LSM5 (**Figura 20B**). Se observó que solo los ratones con las células S462 control fueron capaces de formar tumor. Los ratones inyectados con células con *LSM5* silenciado no fueron capaces de formar tumor (**Figura 20C, D**).

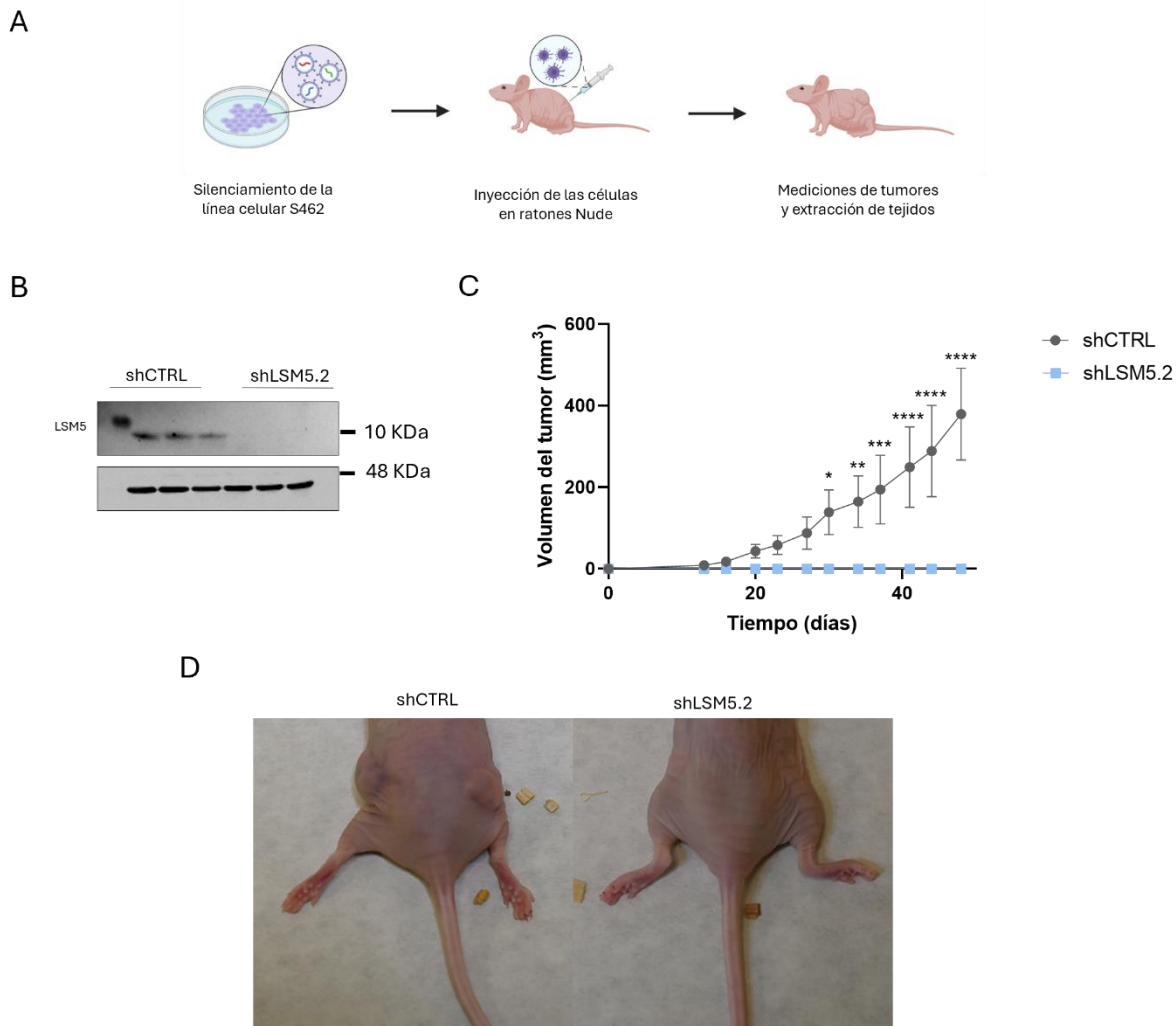


Figura 20. Las células tumorales silenciadas pierden la capacidad de formar tumores mediante trasplante de xenograft. (A) Representación gráfica del procedimiento. (B) Western blot demostrando el silenciamiento de LSM5 en células silenciadas a nivel de proteína. (C) Curva de crecimiento del tumor en los ratones *Nude* (D) Fotos representativas de los tumores formados en células control (izquierda) y células silenciadas (derecha). Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

5.1.3. El silenciamiento de *LSM5* modifica el transcriptoma

Para descifrar el mecanismo por el cual LSM5 podría reducir las propiedades tumorales de células de MPNST, se realizó un experimento de secuenciación de ARN (*RNA-seq*) en muestras de la línea celular S462 en células silenciadas y en células controles. Se realizó con dos secuencias de silenciamiento de *LSM5* diferentes, usadas previamente para los

experimentos *in vitro*. El estudio de componentes PCA revela que las réplicas del experimento se realizaron correctamente (**Figura 21A**). Hasta 6.127 genes se expresan de forma común en las células con *LSM5* silenciado, independientemente de la secuencia de *shRNA*, y de forma diferencial respecto al silenciamiento control (**Figura 21B**). Los genes expresados diferencialmente en el silenciamiento de *LSM5*, se dividen equitativamente en genes regulados a la alta y genes regulados a la baja (**Figura 21C**).

Mediante análisis de *Gene Ontology*, encontramos que el silenciamiento de *LSM5* regula a la baja genes implicados en el desarrollo axonal, como la axonogénesis, el desarrollo de la proyección neuronal o la guía de la proyección neuronal. Por otro lado, se desregulan negativamente genes implicados en el catabolismo de ácidos orgánicos, carboxílicos o de moléculas pequeñas. Destaca también la desregulación de la ruta de señalización celular Wnt, que, como vimos anteriormente, está implicada en el desarrollo tumoral de MPNST (**Figura 21D**). Por el contrario, el silenciamiento de *LSM5* conlleva a una mayor expresión de genes de biogénesis ribosomal, de procesamiento de ARNr y ARNnc, de respuesta a proteínas desplegadas y de respuesta a estrés. También cabe destacar el aumento de genes implicados en el *splicing* del ARN vía reacciones de transesterificación (**Figura 21E**).

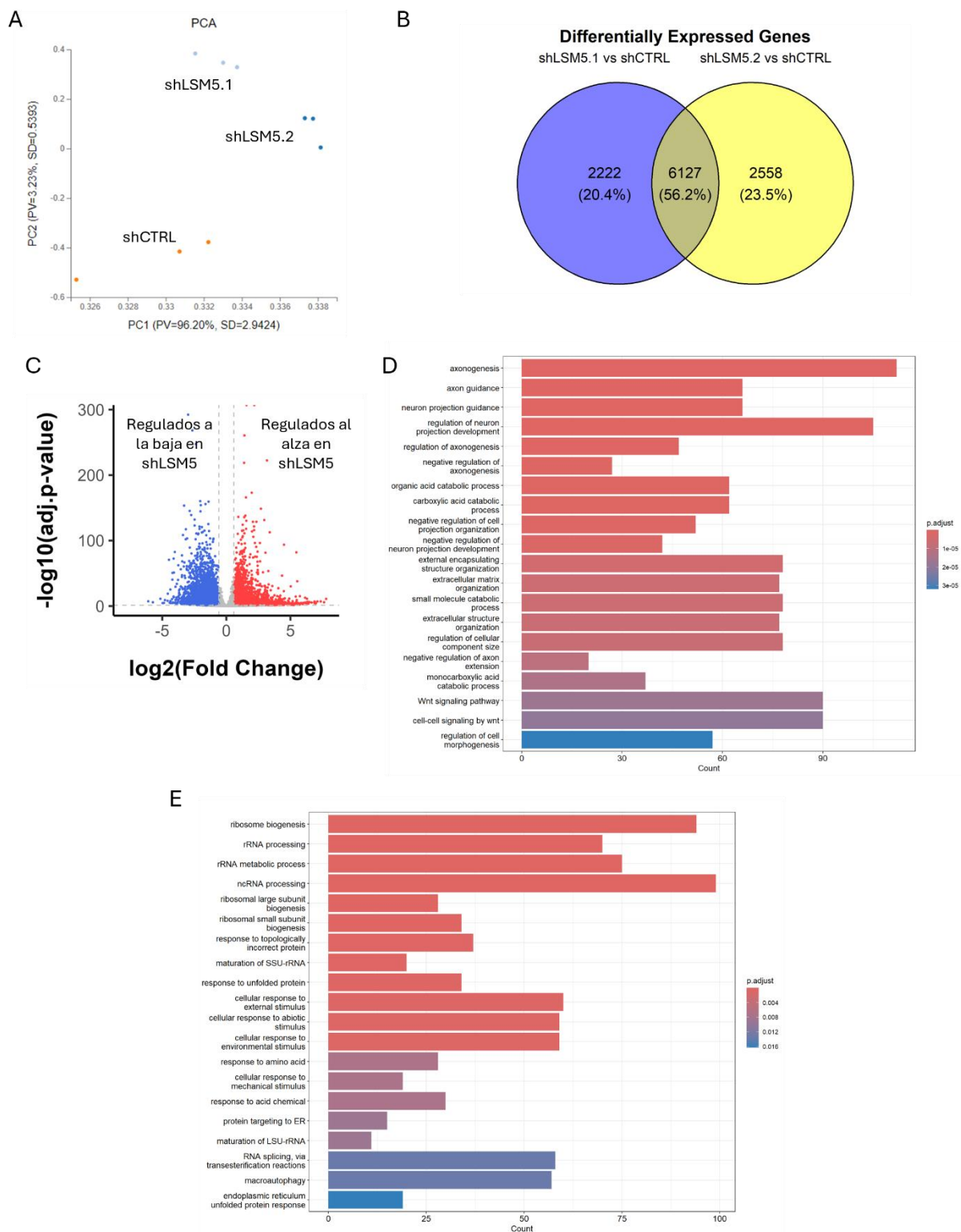


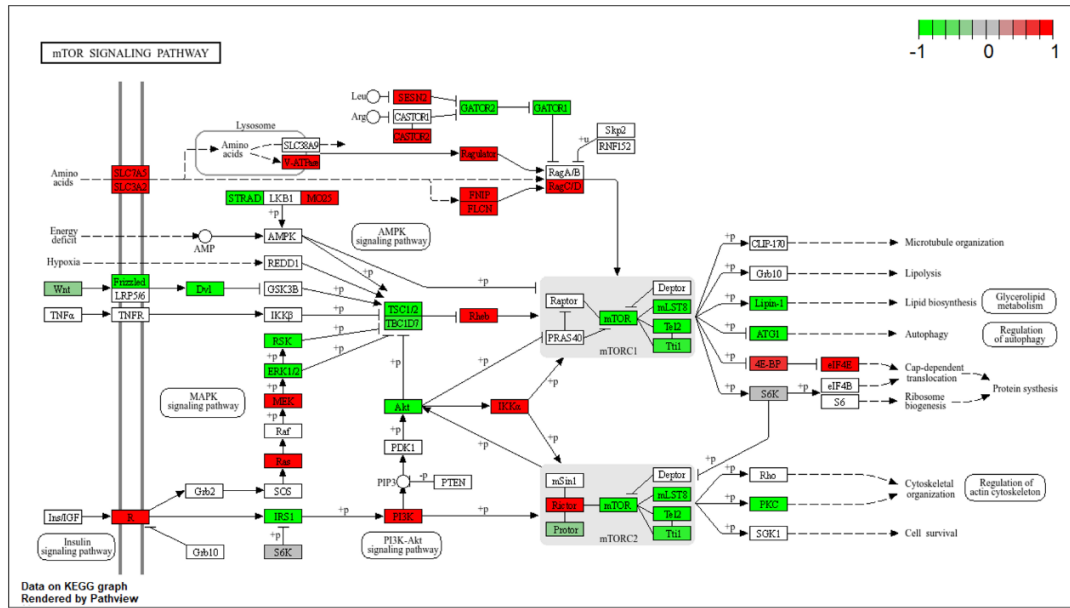
Figura 21. Cambios en el transcriptoma de la línea celular S462 inducidos por el silenciamiento de *LSM5*. (A) Análisis de componentes de las muestras, cada punto representa una muestra. (B) Diagrama de Venn los genes expresados diferencialmente con $FC > 1.5$ y $p\text{-valor} < 0.05$ en shLSM5.1 respecto al control y de shLSM5.2 respecto al control (C) *Volcano Plot* de los genes expresados en ambos silenciamientos respecto al control. (D, E). Análisis de *Gene Ontology* de procesos biológicos de (D) genes con mayor expresión en el control y de (E) genes con mayor expresión en el silenciamiento de *LSM5*. (Elaboración propia)

5.1.4. El silenciamiento de *LSM5* afecta a la ruta mTOR

Varias rutas de señalización celular se ven desreguladas a nivel de transcriptoma en el silenciamiento de *LSM5* respecto al control, entre ellas la ruta de mTOR (**Figura 22A**). La ruta de mTOR es una ruta importante, como se describe en la introducción, en el desarrollo de MPNST. La activación de esta se produce por la activación constitutiva de la proteína Ras, consecuencia de la pérdida funcional de la neurofibromina. De hecho, es una de las rutas de señalización diana para el tratamiento de estos tumores, por lo que prevenir su activación podría disminuir la proliferación de las células tumorales. Validamos los datos obtenidos en el *RNA-seq* (**Figura 22A**) a nivel de proteína. El silenciamiento de *LSM5* reduce tanto la expresión, como la activación de proteínas clave en esta ruta de señalización como mTOR, AKT y la proteína ribosomal S6 (**Figura 22B**).

La menor activación de esta ruta podría implicar una reducción de la proliferación, del crecimiento y de la supervivencia celular.

A



B

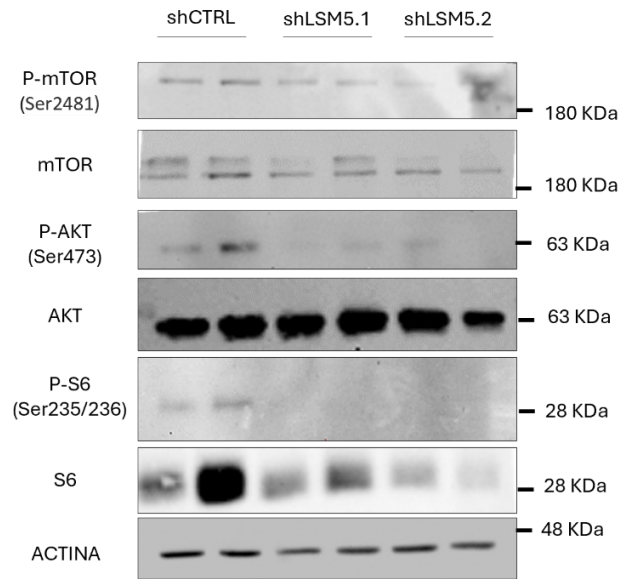


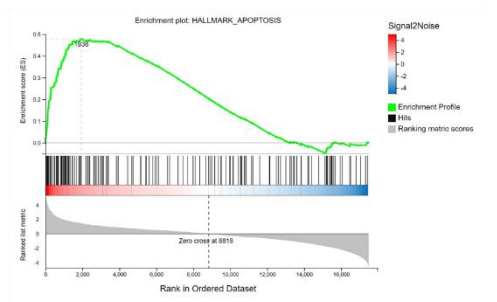
Figura 22. El silenciamiento de *LSM5* desregula la ruta de señalización de mTOR. (A) Los datos de *RNA-seq* revelan que el silenciamiento de *LSM5* desregula genes implicados en la ruta de señalización celular de mTOR. En rojo se representan los genes que aumentan su expresión al silenciar *LSM5* y, en verde, los genes que disminuyen. (B) Comprobación por *Western blot* de la desregulación de proteínas implicadas en esta ruta de señalización. (Elaboración propia)

5.1.5. El silenciamiento de *LSM5* promueve la apoptosis de las células tumorales

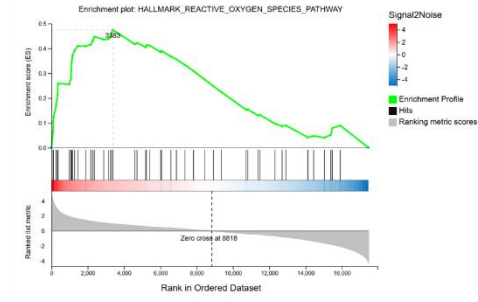
Usando el *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), encontramos que los datos de *RNA-seq* revelaron que una gran cantidad de genes implicados en apoptosis (**Figura 23A**) o en especies reactivas de oxígeno (**Figura 23B**) tenían una expresión más elevada en células en las que se silenció *LSM5* que en células con silenciamiento control.

Se decidió realizar un ensayo de citometría de flujo con Anexina V-PE y 7-aminoactinomicina D (7-AAD)-FICT. La Anexina V se une a la fosfatidilserina, una molécula que, en condiciones normales aparece en la cara interna de la membrana, pero que queda expuesta en células apoptóticas. La 7-AAD es una molécula capaz de intercalarse en el ADN, por lo que es un indicador de muerte celular. Las células capaces de teñirse con ambos marcadores moleculares son consideradas células muertas por apoptosis. En nuestro caso, podemos observar que el número de células muertas por apoptosis se incrementa en células *con LSM5* silenciado respecto a las células con silenciamiento control (**Figura 23C, D**). El aumento de la apoptosis en células silenciadas podría explicar la reducción de las propiedades tumorales de MPNST, este aumento podría estar relacionado con el incremento de las especies reactivas de oxígeno.

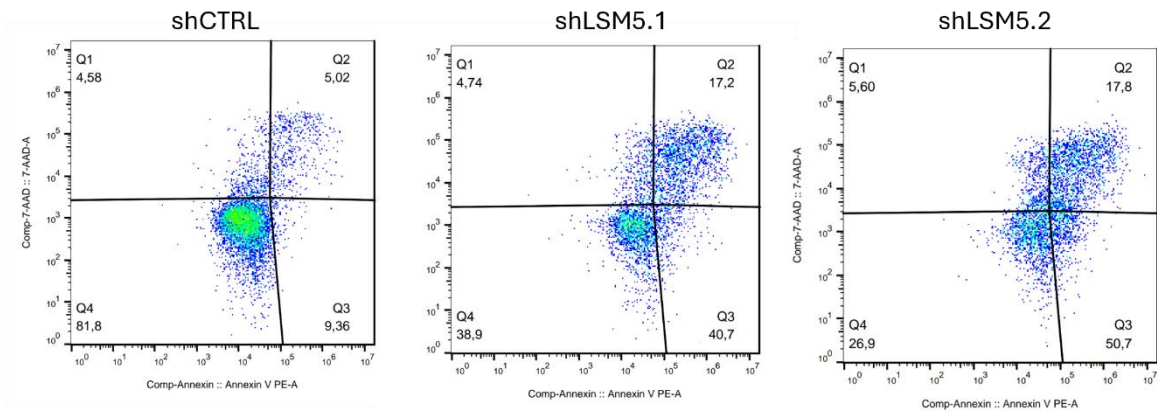
A



B



C



D

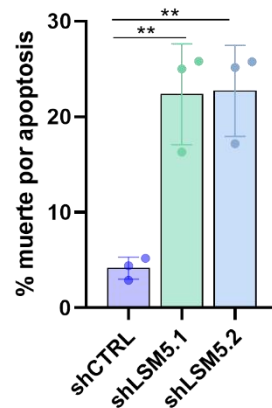


Figura 23. Las células con LSM5 silenciado presentan un mayor porcentaje de células muertas por apoptosis que las células control. (A y B) Gráficos GSEA que muestran el enriquecimiento de la categoría de apoptosis (A) y de especies reactivas de oxígeno (B) en células MPNST infectadas con shCTRL en comparación con las células MPNST S462 infectadas con shLSM5 (C). Imagen representativa de citometría de Anexina V y 7-AAD en células de MPNST controles y silenciadas con shLSM5.1 y shLSM5.2. (D) Representación gráfica del porcentaje de células muertas por apoptosis. Los datos se representan como media \pm SEM. ** $p < 0.01$. (Elaboración propia)

5.1.6. LSM5 regula directamente un gran número de ARNm

Con la finalidad de conocer las moléculas de ARNm que son reguladas directamente por LSM5, se realizó la técnica de inmunoprecipitación de ARNs unidos a LSM5 con posterior secuenciación (RIPseq) (**Figura 24A**). Comprobamos que la inmunoprecipitación resulta en la captura de ARN, mediante análisis de concentración de ARN capturado por Qubit, y la inmunoprecipitación de LSM5 usando el anticuerpo específico y no con el anticuerpo control (IgG). La matriz de correlación de los datos de secuenciación muestra una buena correlación de las muestras *input* y de las muestras de inmunoprecipitación (**Figura 24C**), y las muestras de la inmunoprecipitación de LSM5 presentan un enriquecimiento de gran cantidad de transcritos de ARNm respecto al *input*, estos son considerados los LSM5 *binders* (o ARNm unidos a LSM5) (**Figura 24D**).

Mediante análisis de *Gene Ontology*, encontramos que LSM5 se une preferentemente a transcritos con actividad: activadora de la transcripción, de unión al ADN y quinasa o fosfatasa (**Figura 24E**). Estos transcritos están implicados en procesos de morfogénesis, de señalización de la ruta Wnt o de desarrollo (**Figura 24F**).

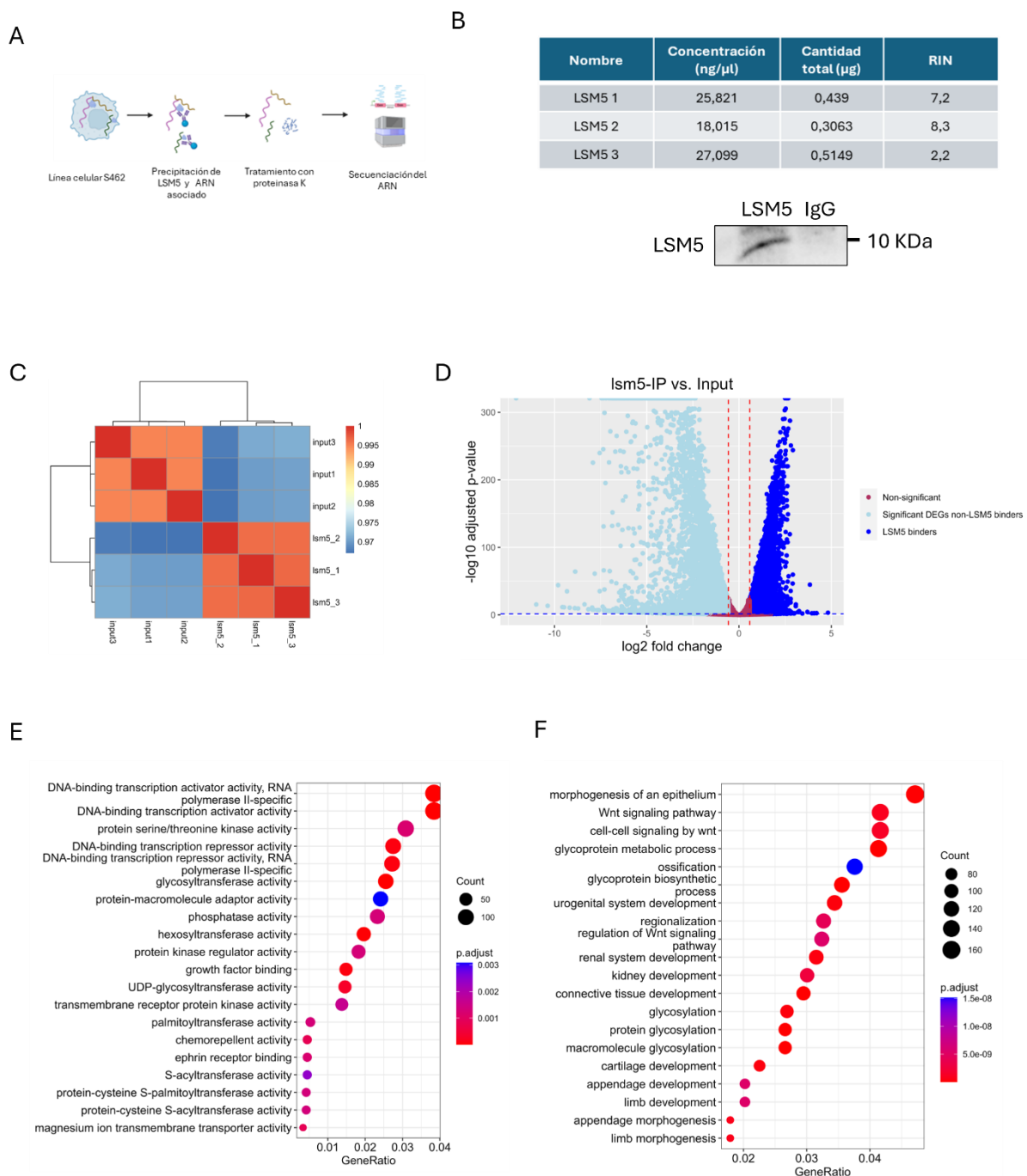


Figura 24. LSM5 interacciona con cientos de moléculas de ARNm. (A) Esquema de realización del protocolo de RIPseq. (B) Parámetros obtenidos en las muestras del RIP y *Western Blot* de confirmación de la precipitación de LSM5. (C) Matriz de correlación de las muestras de RIPseq. (D) *Volcano Plot* que representa los ARNs enriquecidos en el RIP de LSM5 respecto al *input*. (E, F) Análisis de *Gene Ontology* de la función molecular (E) y de procesos biológicos (F) de los ARN enriquecidos diferencialmente en las muestras de RIP respecto al control. (Elaboración propia)

Con la finalidad de conocer como la unión de LSM5 a estos transcritos modifica su expresión génica, comparamos los datos del RNAseq con los del RIPseq. Observamos que 903 de los 4.704 transcritos unidos a LSM5, están menos expresados en el silenciamiento de *LSM5* respecto al control (**Figura 25A**). Estos transcritos regulan procesos de axogénesis, neurogénesis, desarrollo del sistema nervioso y crecimiento celular (**Figura 25B**).

Por otro lado, observamos que 587 genes regulados por LSM5 están más expresados en el silenciamiento de *LSM5* que en el control (**Figura 25C**). Estos transcritos podrían ser aquellos que no pueden ser eliminados por un fallo en el proceso de degradación del ARN producido por la pérdida del complejo LSM1-7, que no puede reclutar las enzimas necesarias para la eliminación de la cap5'. Estos transcritos están implicados en procesos de respuesta a estímulos externos y estrés, transporte de aminas y regulación del crecimiento celular (**Figura 25D**).

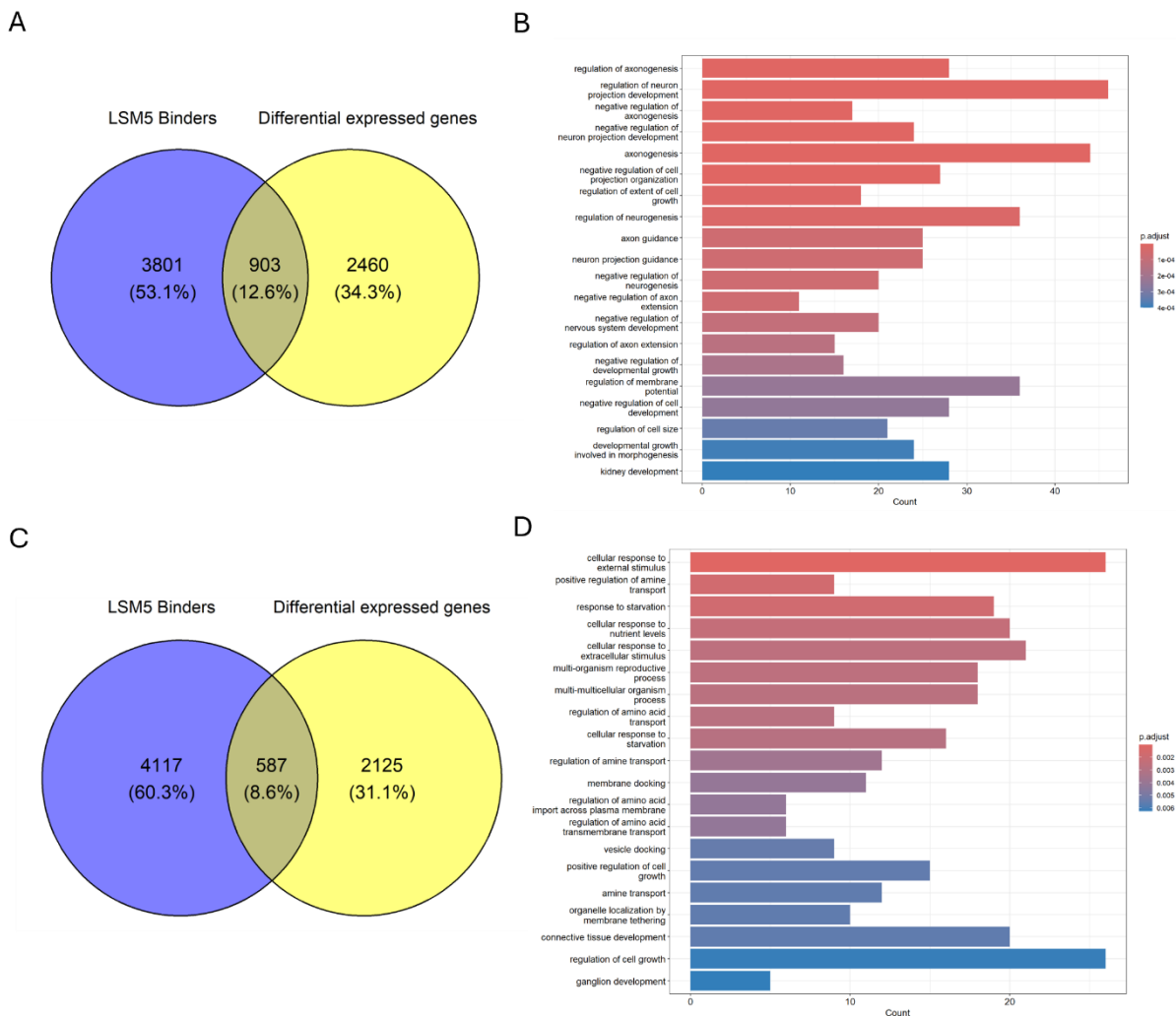


Figura 25. Relación entre los transcritos unidos a LSM5 y los datos del RNAseq. (A) Diagrama de Venn de la relación entre los transcritos que regula LSM5 y los genes regulados a la baja en shLSM5 en el RNA-seq. (B) Análisis de enriquecimiento GO de la función molecular de estos. (C) Diagrama de Venn de la relación entre los transcritos que regula LSM5 y los genes regulados al alza en shLSM5 en el RNAseq. (D) Análisis de enriquecimiento GO de la función molecular de esta relación. (Elaboración propia)

5.1.7. El silenciamiento de *LSM5* cambia el patrón del *splicing*

Con los datos obtenidos del *RNA-seq* decidimos hacer un estudio de variantes de *splicing* alternativo (AS). LSM5, como se ha descrito previamente, tiene una función importante en el *splicing*. El silenciamiento de esta proteína podría modificar el patrón de *splicing*.

Con este análisis, identificamos 3.775 eventos de *splicing* cuya inclusión cambia significativamente entre condiciones. Un dPSI positivo indica una mayor inclusión de la forma larga del transcrito en la condición shLSM5, mientras que, un dPSI negativo, indica una mayor expresión de la forma larga en el fenotipo shCTRL. De los 3.775 eventos, 2.124 tienen un dPSI positivo (hay mayor presencia de la forma larga en las células silenciadas shLSM5), y dichos eventos se clasifican en los tipos: IR (1673), AltEx (161), MicroEx (14). Alt3 y Alt5 aparecen representados exclusivamente en la **Figura 26A** debido a que los eventos de cambio de sitios aceptores y donadores de *splicing* son anotados por defecto con un dPSI positivo. Por otro lado, 1.651 eventos tienen un dPSI negativo (hay mayor presencia de la forma larga del transcrito en las células control), y se clasifican en eventos de tipo IR (72), AltEx (1552), MicroEx (27) (**Figura 26A, B**). El silenciamiento de *LSM5* lleva a un aumento de la retención de intrones.

Se realizó un estudio de la distribución del dPSI a lo largo del tamaño de los exones, se puede ver que el dPSI tiende a ser negativo en todos los tamaños de exones (**Figura 26C**), por lo que se observa un mayor porcentaje de *exon skipping*.

A través de un análisis de enriquecimiento funcional de los genes con eventos de AS regulados diferencialmente, detectamos varios términos GO y KEGG importantes, siendo la vía de señalización de mTOR, la apoptosis y los procesos de reparación, las principales vías afectadas. Además, se debe destacar la importancia de procesos como la regulación del ciclo celular, la organización de la cromatina o la reparación del ADN (**Figura 26D**).

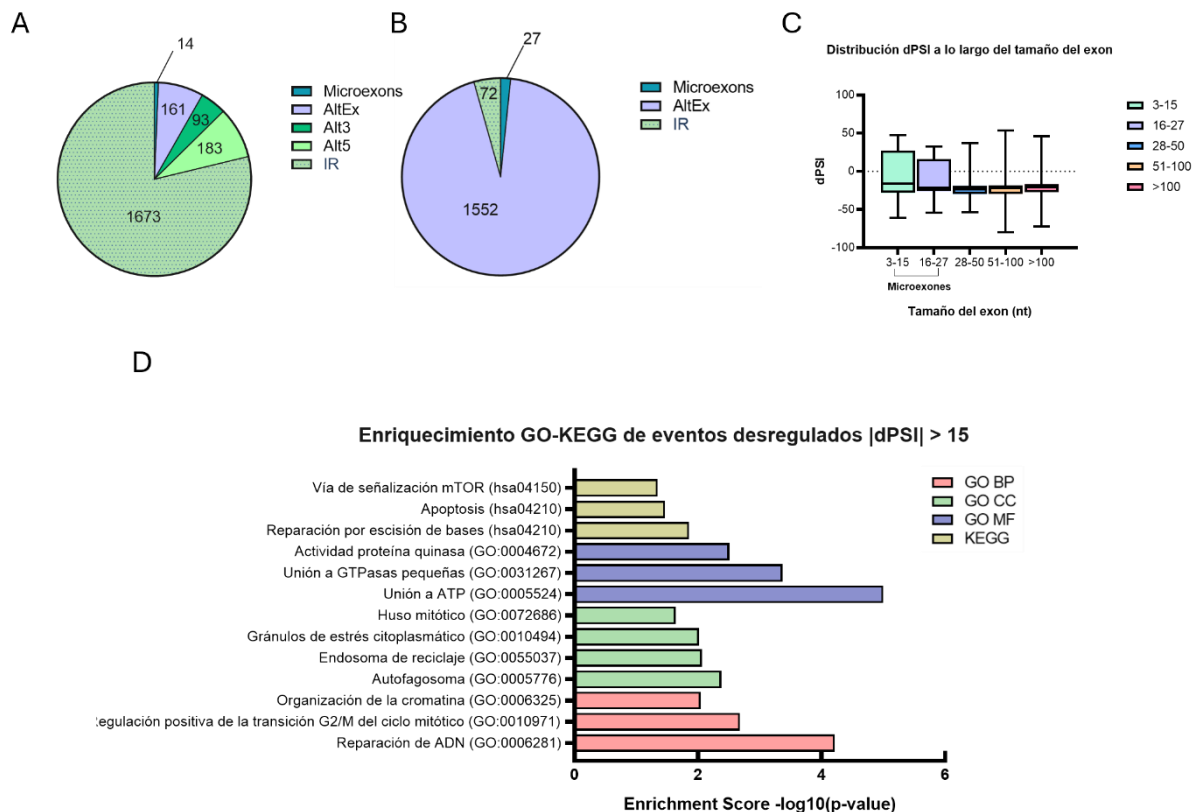


Figura 26. Las células en las que se ha silenciado *LSM5* presentan un patrón de *splicing* diferente a las células control. (A, B) Diagrama de sectores que representa la distribución de los diferentes eventos de *splicing* con (A) dPSI positivo y (B) dPSI negativo. (C) Distribución del dPSI en función de los tamaños de los exones. (D) Gráfico de barras del enriquecimiento GO y KEGG de los genes relativos a los eventos de *splicing* significativo. (IR= *Intron retention*, AltEX= *exón skipping*, Alt3= *alternative 3' site* y Alt5= *alternative 5'*). (BP= *Biological process*, CC=

Cellular component, MF= Molecular function, KEGG= Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). (Elaboración propia)

Analizando en conjunto los datos de enriquecimiento funcional y los ensayos *in vitro* de los genes con eventos de AS regulados diferencialmente consideramos la posibilidad de que el bloqueo del ciclo celular se deba a una modificación en las variantes de *splicing*. En nuestros análisis de *splicing*, encontramos que la variante HsaEX0014297 de *CDK2* se expresa más en células silenciadas que en células controles (**Figura 27A**). Esta variante, producida por la pérdida de un exón, no puede generar la proteína CDK2, lo que hace que se produzca una perturbación del ciclo celular, ya que controla el ciclo celular en las transiciones G1/S y S/G2 (**Figura 27B**) (154). Comprobamos mediante RT-PCR, que esta variante funcional de *CDK2* se expresa menos en células en las que se ha silenciado *LSM5*, lo que conduce a una bajada en la expresión de la proteína CDK2 (**Figura 27C**).

No podemos asegurar que este evento esté siendo regulado directamente por la unión de *LSM5*, aunque podemos detectar un cierto, pero no significativo, enriquecimiento del ARN de *CDK2* en el RIPseq de *LSM5* respecto al *input* (**Figura 27D**).

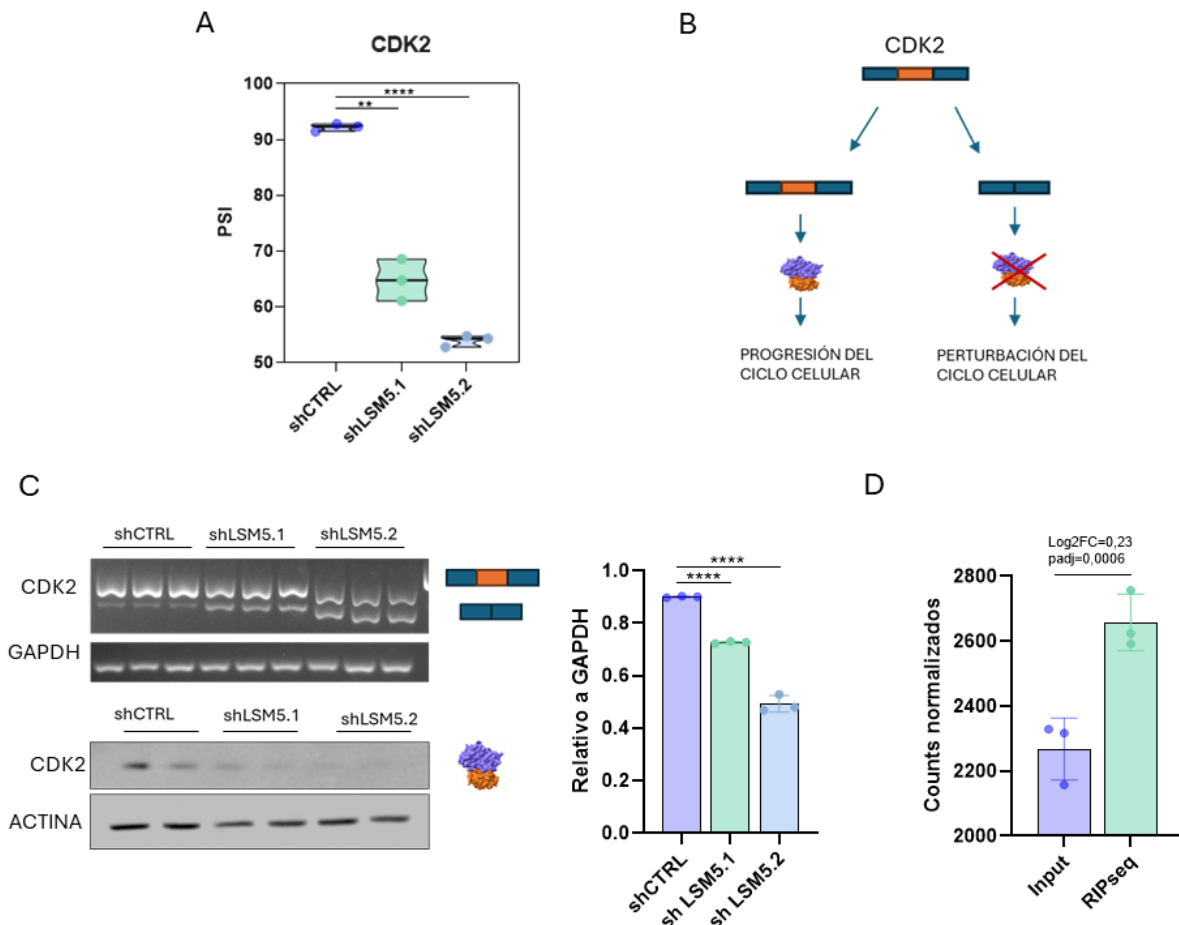


Figura 27. Las células en las que se ha silenciado *LSM5* presentan en mayor medida una forma de *CDK2* con pérdida de un exón. (A) PSI de las muestras control y silenciadas obtenidos del análisis del *splicing* alternativo. (B) Representación gráfica de la función de las variantes de *splicing* de *CDK2*. (C) Validación por RT-PCR de las variantes de *splicing* junto con la representación gráfica de la proporción y *Western blot* de la proteína *CDK2*. (D) Expresión diferencial de *CDK2* de los datos del RIPseq de *LSM5*. Los datos se representan como media \pm SEM. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

Con el fin de encontrar una relación directa entre la regulación del *splicing* alternativo y LSM5, se superpusieron los datos obtenidos en el análisis del *splicing* alternativo junto con los datos de los genes enriquecidos en la inmunoprecipitación de LSM5, y se detectaron 574 genes comunes (**Figura 28A**). Proponemos que estos genes se unen a LSM5 en su función como *scaffold* del *spliceosome* y, por tanto, el silenciamiento de LSM5 tiene consecuencias sobre el *splicing* alternativo de dichos genes.

Aproximadamente el 50% de estas variantes de *splicing* son eventos de *exon skipping*, y poco menos de la otra mitad son eventos de *intron retention*. Los eventos de *alternative donors* y *acceptors* y *microexons* son minoritarios (**Figura 28B**).

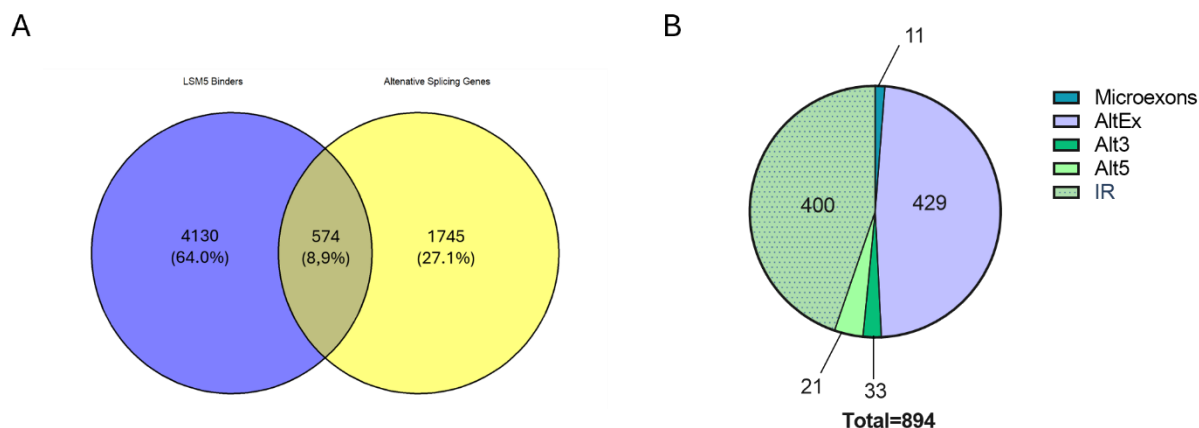


Figura 28. Relación entre LSM5 y las variantes de *splicing* alternativo. (A) Diagrama de Venn de los ARNs unidos a LSM5 y los genes con *splicing* alternativo diferencialmente expresados en el silenciamiento de LSM5 respecto al control. (B) Porcentajes de los tipos de eventos de *splicing* diferenciales entre shLSM5 y shCTRL. (IR = *Intron retention*, AltEX= *exón skipping*, Alt3= sitio alternativo 3 y Alt5=sitio alternativo 5). (Elaboración propia)

Con los datos obtenidos de este análisis, seleccionamos dos candidatos de AS que podrían estar implicados en el cambio de fenotipo tumoral en el silenciamiento de LSM5 respecto al control: *CCNT1* y *CEACAM1*.

Se ha descrito previamente que *CEACAM1*, un gen que codifica una proteína implicada en adhesión celular tiene además funciones relevantes en la regulación del crecimiento y metástasis tumoral. Algunas variantes de *splicing* de *CEACAM1* se han relacionado con una menor metástasis (155). Los datos obtenidos en el *RIP-seq* confirman la unión de LSM5 al su transcrito de ARNm (**Figura 29A**), y los datos de análisis de *splicing* alternativo revelan una menor inclusión del intrón en células en las que se ha silenciado LSM5 (**Figura 29B**). Comprobamos por RT-PCR que efectivamente el silenciamiento de LSM5 conduce a una bajada en la expresión de la variante de *CEACAM1* que está relacionada con la metástasis (**Figura 29C, D**).

En la misma línea, el gen *CCNT1* codifica para una proteína denominada CICLINA T1 que se une a CDK9 para regular la elongación de la transcripción. La forma larga de la variante de *splicing* tiene una mayor expresión en tejidos tumorales respecto a tejidos sanos (156). Según los resultados obtenidos, LSM5 se une al ARNm de *CCNT1* (**Figura 29E**), y la variante larga se expresa más en la situación control que en el silenciamiento de LSM5 según nuestros análisis de *splicing* alternativo de los datos de RNAseq (**Figura 29F**). Confirmamos estos resultados con análisis de PCR (**Figura 29G, H**). Es posible que la pérdida del exón reduzca su función y, en consecuencia, las propiedades tumorales.

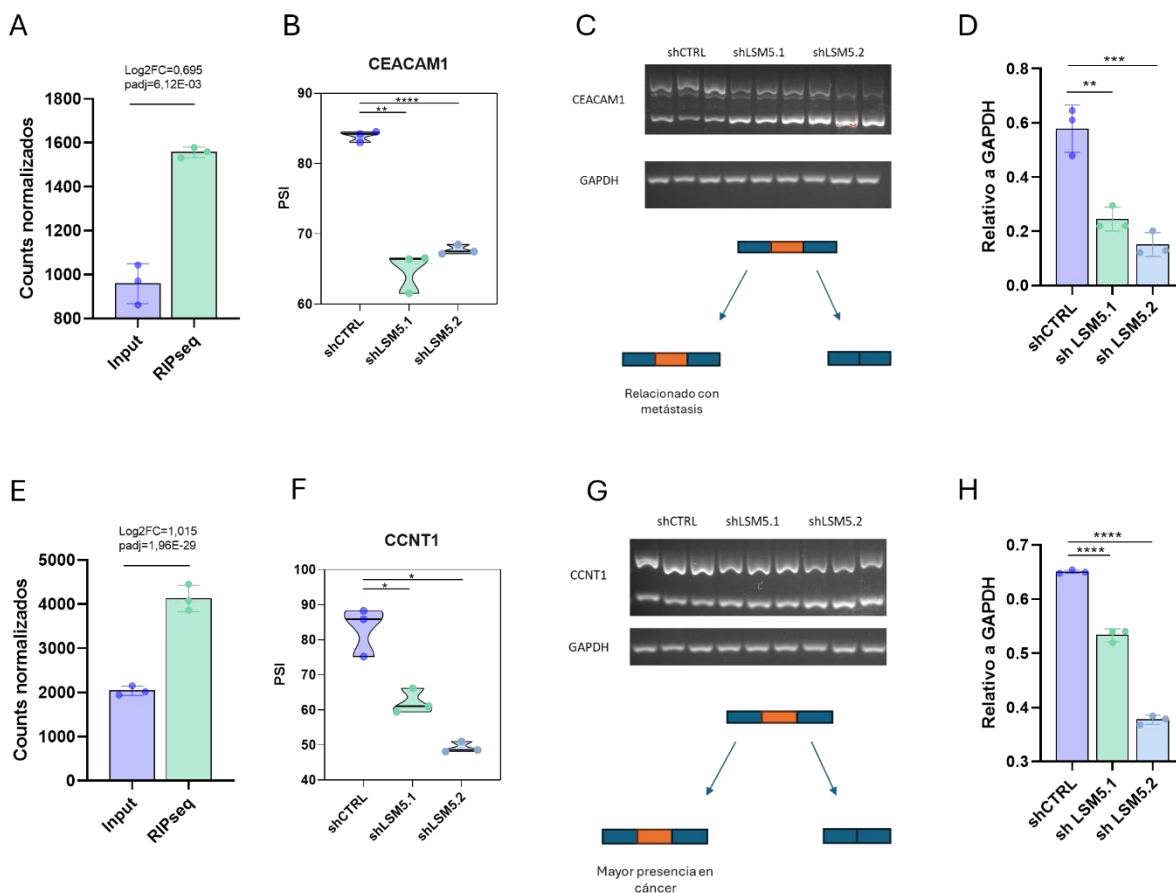


Figura 29. Las células en las que se ha silenciado *LSM5* presentan un enriquecimiento de variantes de exón skipping de los genes *CCNT1* y *CEACAM1*. (A y E) Expresión diferencial de *CEACAM1* y *CCNT1* de los datos del RIPseq de *LSM5*. (B y F) PSI de las muestras control y silenciadas obtenidos del análisis del *splicing* alternativo. (C y G) Validación por PCR de las variantes de *splicing* junto con la representación gráfica de la posible función de estas. (D) Representación gráfica de la cuantificación de las variantes de *splicing*. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

Los datos obtenidos en el RIPseq y RNAseq parecen indicar que la ruta de señalización Wnt podría estar regulada por *LSM5* (Figura 21D, 24F). Se decidió seleccionar las proteínas de la ruta de señalización Wnt que podría regular *LSM5* mediante el proceso de *splicing*. Entre los eventos desregulados destacamos *AXIN1*. *AXIN1* es una proteína de la ruta Wnt, que forma un complejo junto con *APC*, *GSK3 β* , y *CK1 α* cuya función es la degradación de la β -*CATENINA* (157). Según nuestros análisis de *splicing* alternativo de los datos de RNAseq, *LSM5* se une al ARNm de *AXIN 1* (Figura 30A), y la variante larga se expresa más en las células silenciadas que en las células controles (Figura 30B). Confirmamos estos resultados con análisis de RT-PCR (Figura 30C, D). En estudios anteriores, se ha relacionado la retención del exón 9 de *AXIN 1* con una inhibición de la ruta Wnt (Figura 30E) (158). En nuestro caso, este podría explicar la inactivación de esta ruta en células en las que se ha silenciado *LSM5* por el descenso de los niveles de β -*CATENINA* a nivel de proteína (Figura 30F).

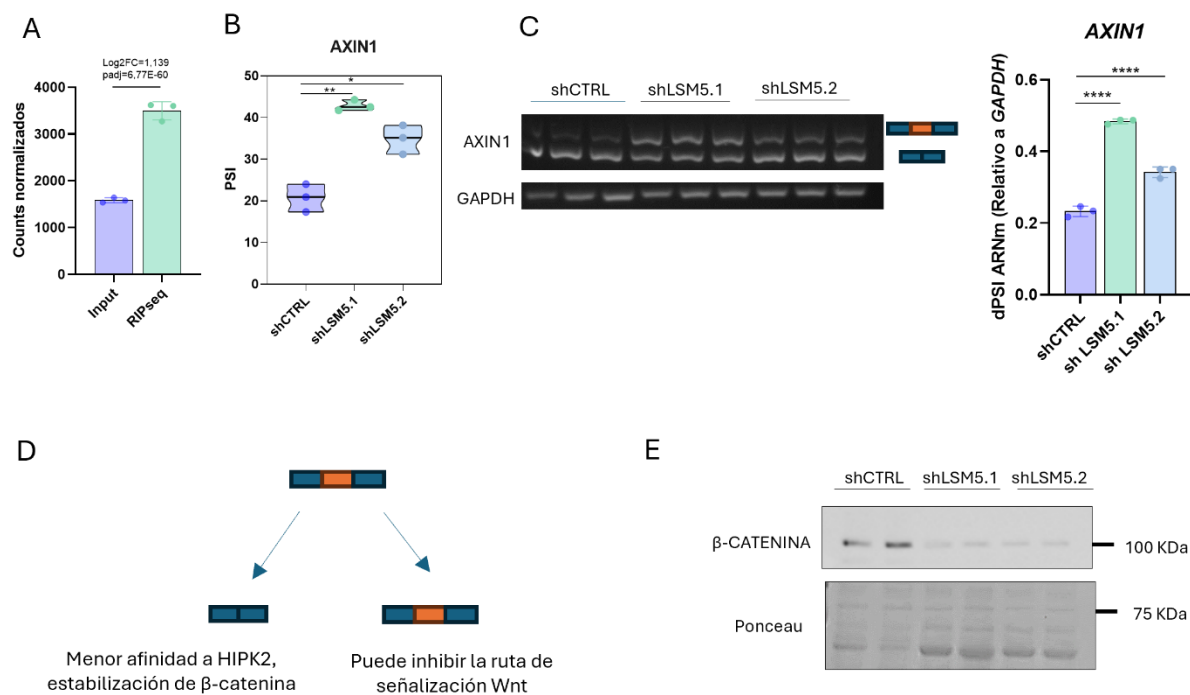


Figura 30. Las células en las que se ha silenciado *LSM5* presentan en menor medida una forma de *AXIN1* con pérdida del exón 9. (A) Expresión diferencial de *AXIN1* de los datos del RIPseq de *LSM5*. (B) PSI de las muestras control y silenciadas obtenidos del análisis del *splicing* alternativo. (C) Validación por PCR de las variantes de *splicing* junto con la cuantificación de la proporción de *exon skipping*. (D) Representación gráfica de la función de las variantes de *splicing* de *AXIN1*. (E) *Western Blot* representativo de la acumulación de la β -catenina en la condición control. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

5.1.8. El silenciamiento de *LSM5* genera cambios en la traducción global

La degradación y la traducción del ARNm son dos mecanismos muy relacionados, ambos llevados a cabo por proteínas de unión al ARN. Se ha descrito previamente que las proteínas LSM son necesarias para la maduración de los ARN ribosomales (159). Por este motivo, decidimos comprobar si la traducción estaba alterada. Para ello realizamos la técnica de perfilado de ribosomas en células de MPNST S462 shCTRL y shLSM.2 (**Figura 31A**).

Se comprobó que las células fueran silenciadas correctamente (**Figura 31B**). Confirmamos que el perfil de los ribosomas de las células shCTRL y las células shLSM5.2 eran diferentes, por lo que al silenciar *LSM5* se está produciendo un cambio en la traducción global (**Figura 31C**). Se llevó a cabo la cuantificación de los perfiles ribosomales de ambas condiciones y se concluyó que el silenciamiento de *LSM5* en células de MPNST S462 reduce la ratio de polisomas/monosomas (**Figura 31D**). Esta ratio se utiliza como medidor de la actividad traduccional, por lo que la disminución del mismo, indica una reducción de la traducción global. Este cambio al silenciar *LSM5* podría estar asociado con su papel en el complejo LSM1-7.

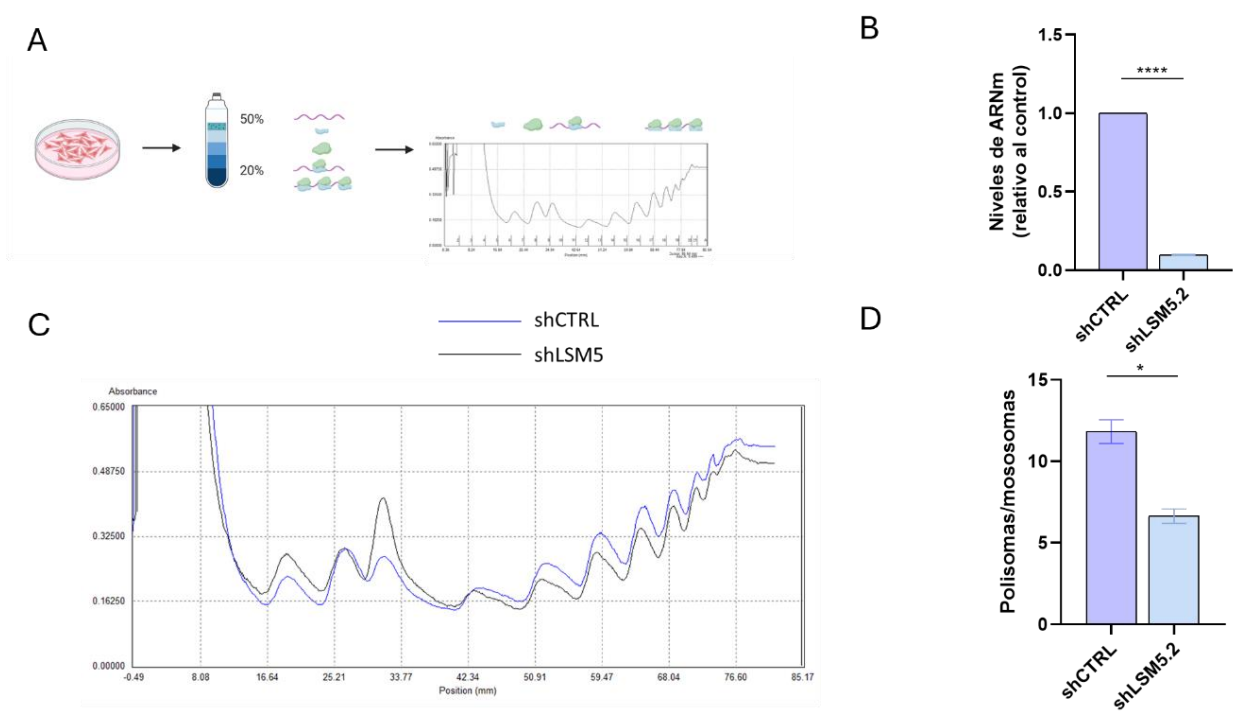


Figura 31. Las células en las que se ha silenciado LSM5 cambian su patrón de traducción. (A) Representación gráfica de la técnica de perfilado de ribosomas. (B) Validación por qPCR del silenciamiento de LSM5. (C) Perfil de ribosomas en células de MPNST S462 silenciadas y controles. (D) Ratio del área entre polisomas y monosomas. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

En resumen, en este apartado, hemos demostrado que LSM5 puede tener un papel clave en la patogénesis de los MPNSTs, regulando en particular los patrones de *splicing* en genes críticos.

5.2. CARACTERIZACIÓN DEL RBPOMA Y COMPARACIÓN EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

El RBPoma (conjuntos de RBPs que se expresan en una célula) cambia en función de los procesos fisiológicos y del contexto de enfermedad. Es por ello que el estudio de cómo varían estas proteínas de unión al ARN en los diferentes procesos, desde las células de Schwann hasta el desarrollo de MPNST, puede ser importante para entender el desarrollo tumoral. La búsqueda de marcadores tumorales y proteínas diana también puede ser crucial en el tratamiento de pacientes con esta enfermedad.

Con el fin de profundizar en la identificación de proteínas de unión al ARN que pueden tener un papel en la transformación oncogénica de células de Schwann y en la malignización de los MPNSTs, se realizó la técnica de la captura del interactoma en líneas celulares representativas de células de Schwann humanas (iHSC λ 1 e iHSC λ 2), en neurofibroma (CRL3388) y en MPNSTs (S462 y T265).

Los datos obtenidos en este apartado son datos preliminares, ya que el sistema de espectrometría de masas utilizado para realizar la técnica no es el óptimo para este tipo de técnicas, es necesario un sistema más avanzado. Actualmente estamos trabajando para mejorar el sistema de detección de proteínas, con la muestra remanente.

5.2.1. Caracterización del RBPoma de diferentes líneas celulares

5.2.1.1. RBPoma iHSC λ 1

Se realiza en la línea celular iHSC λ 1 la técnica de la captura del interactoma (RIC, por sus siglas en inglés), que consiste en unión de ARN y proteína mediante la incidencia de luz UV y la posterior precipitación con *beads* magnéticas unidas a Oligod(T) para capturar los complejos ARNm-RBP. Se realiza un tratamiento con ARNasa para eliminar el ARN y las RBPs son identificadas mediante espectrometría de masas (**Figura 32A**). Previo a la realización de la proteómica se realizan controles de la técnica RIC, comparando las muestras del ensayo (+UV; Cross-linked - CL) con las muestras control (-UV, ; no cross-linked - nCL) mediante *silver staining* y *Western Blot* (**Figura 32B**).

Con los datos obtenidos en la proteómica se realizaron dos análisis de control de las muestras: matriz de correlación y análisis de componentes (**Figura 32C**). Comparamos el proteoma total (*input*) con el RBPoma y comprobamos que 241 proteínas están enriquecidas en el RIC (**Figura 32D**). De las 140 proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL, tras aplicar el algoritmo de SAINTexpress, 98 se consideraron RBPs (BFDR < 0.05) (**Figura 32E**). De estas 98 proteínas, la mayoría son de dominio de unión no conocido, otra gran parte son proteínas con dominio RBD conocido (agrupamos los dominios clásicos y no clásicos), y una pequeña parte son proteínas RBPs no identificadas previamente (**Figura 32F**).

Las RBPs detectadas en esta línea celular destacan por regular procesos de traducción, *splicing*, estabilización y procesamiento del ARN. Se localizan principalmente en los complejos de ribonucleoproteínas, aunque también en ribosomas citosólicos y en núcleos. Regulan rutas de señalización relacionadas con el ribosoma, espliceosoma y la supervivencia del ARN (**Figura 32G**).

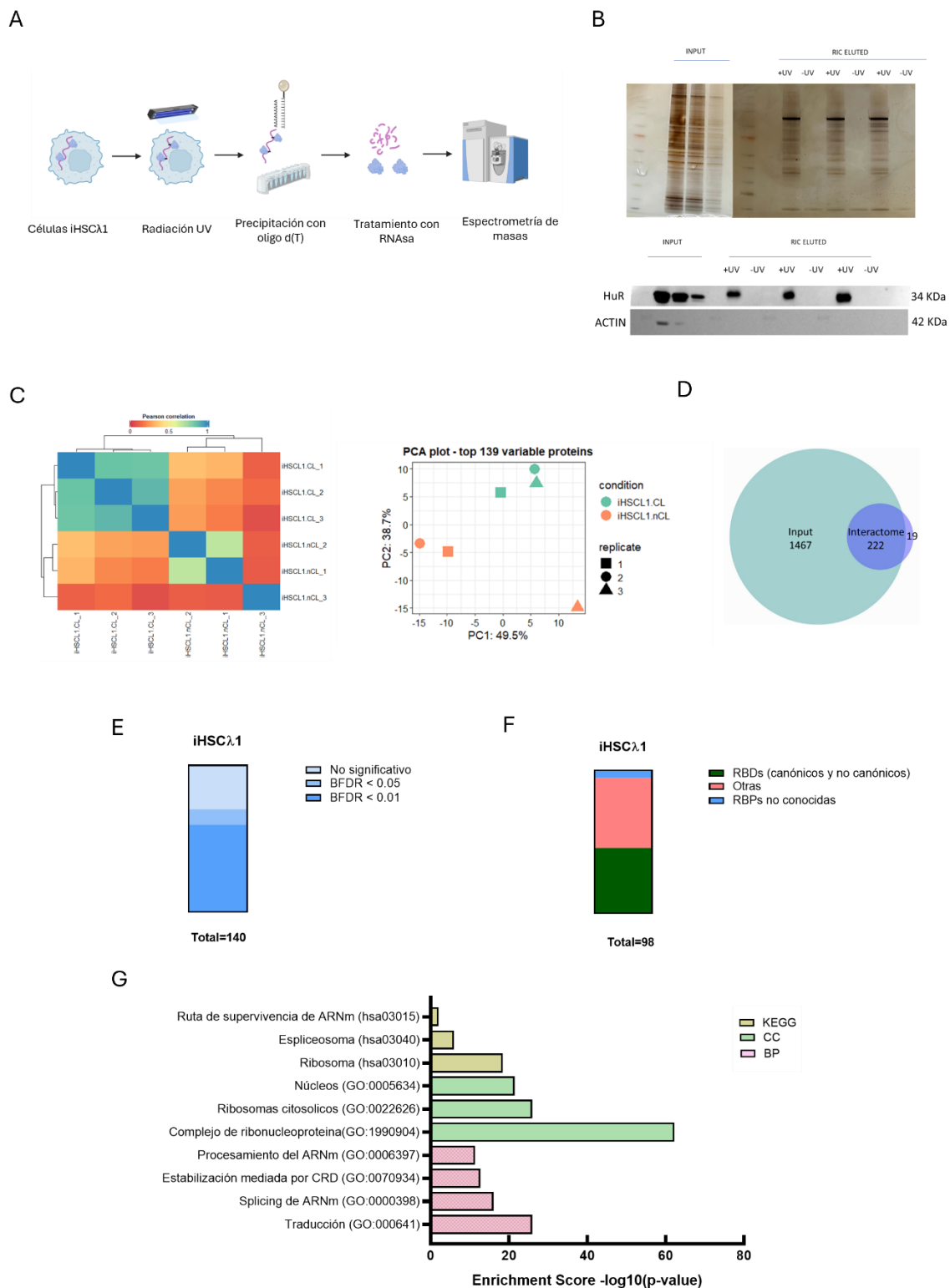


Figura 32. RBPoma de la línea celular iHSCλ1. (A) Representación gráfica del procedimiento del RIC. (B) *Silver staining* y *Western blot* de la RBP conocida HuR y Actina para la validación del correcto funcionamiento del RIC. (C) Análisis de matriz de correlación y PCA de las diferentes réplicas con los datos obtenidos en la proteómica. (D) Diagrama de Venn en el que se compara el número de proteínas obtenidas en el *input* respecto a las obtenidas en el RIC. (E) Distribución de las proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL no significativas, BFDR<0.05 y BFDR<0.01. (F) Clasificación de las RBPs (BFDR<0.05) en: RBPs con dominio de unión conocido, RBPs sin dominio de unión conocido (otras) y no consideradas RBPs previamente. (G) Análisis de *Gene Ontology* BP, CC y KEGG de las RBPs de la línea celular iHSCλ1. (Elaboración propia)

5.2.1.2. RBPoma ihsc λ 2

Se realizó en la línea celular iHSC λ 2 la técnica del RIC de igual manera que se ha descrito con la línea iHSC λ 1 (**Figura 33B**). Con los datos obtenidos en la proteómica se realizaron dos análisis de control de las muestras: matriz de correlación y análisis de componentes (**Figura 33C**). Comparamos el proteoma total (*input*) con el RBPoma y comprobamos que 799 proteínas están enriquecidas en el RIC (**Figura 33D**).

De las 569 proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL, tras aplicar el algoritmo de SAINTexpress, 319 se consideraron RBPs (BFDR < 0.05) (**Figura 33E**). De estas 319 proteínas, la mayor parte no tienen dominio de unión conocido, y el resto se distribuyen entre proteínas con dominio conocido y otras que no han sido previamente descritas como RBPs (**Figura 33F**).

Las RBPs detectadas en esta línea celular destacan por regular procesos de traducción, *splicing*, estabilización del ARN y biogénesis de la subunidad pequeña del ribosoma. Se localizan en los complejos de ribonucleoproteínas, en el exosoma extracelular o en el ribosoma citosólico. Regulan rutas de señalización relacionadas con el ribosoma, espliceosoma y el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático (**Figura 33G**).

5.2.1.3. RBPoma CRL-3388.

Se realizó en la línea celular CRL-3388 la técnica del RIC de igual manera que se ha descrito con la línea iHSC λ 1 (**Figura 34B**). Con los datos obtenidos en la proteómica se realizaron dos análisis de control de las muestras: matriz de correlación y análisis de componentes (**Figura 34C**). Comparamos el proteoma total (*input*) con el RBPoma y comprobamos que 355 proteínas están enriquecidas en el RIC (**Figura 34D**).

De las 176 proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL, tras aplicar el algoritmo de SAINTexpress, 119 se consideraron RBPs (BFDR < 0.05) (**Figura 34E**). Estas 119 proteínas se distribuyen entre RBPs que no tienen dominio de unión conocido y RBPs con RBD conocido. Una pequeña parte de las RBPs no han sido previamente anotadas como proteínas de unión al ARN (**Figura 34F**).

Las RBPs detectadas en esta línea celular destacan por regular procesos de estabilización y transporte del ARN, traducción y *splicing*. Se localizan principalmente en los complejos de ribonucleoproteínas, aunque también en los gránulos de estrés citoplasmático y en el citosol. Regulan rutas de señalización relacionadas con el ribosoma, espliceosoma y la supervivencia del ARN (**Figura 34G**).

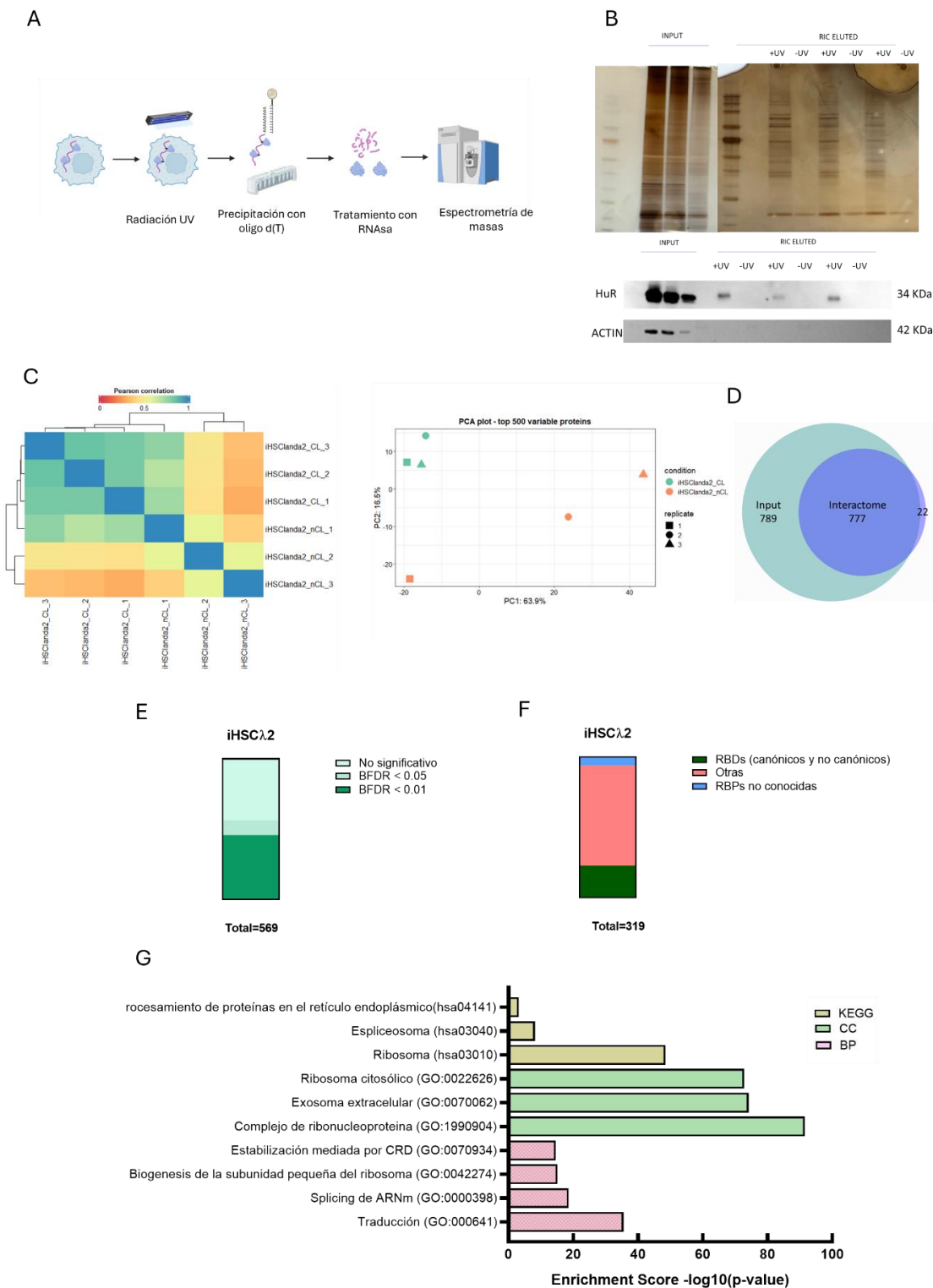


Figura 33. RBPoma de la línea celular iHSCλ2. (A) Representación gráfica del procedimiento del RIC. (B) Silver staining y Western blot de la RBP conocida HuR y actina para la validación del correcto funcionamiento del RIC. (C) Análisis de matriz de correlación y PCA de las diferentes réplicas con los datos obtenidos en la proteómica. (D) Diagrama de Venn de las proteínas del proteoma total y las proteínas del RIC. (E) Distribución de las proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL no significativas, BFDR<0.05 y BFDR<0.01. (F) Distribución de las RBPs (BFDR<0.05) en RBPs con dominio de unión conocido, RBPs sin dominio de unión conocido y no consideradas RBPs previamente. (G) Análisis de Gene Ontology BP, CC y KEGG de las RBPs de la línea celular iHSCλ2. (Elaboración propia)

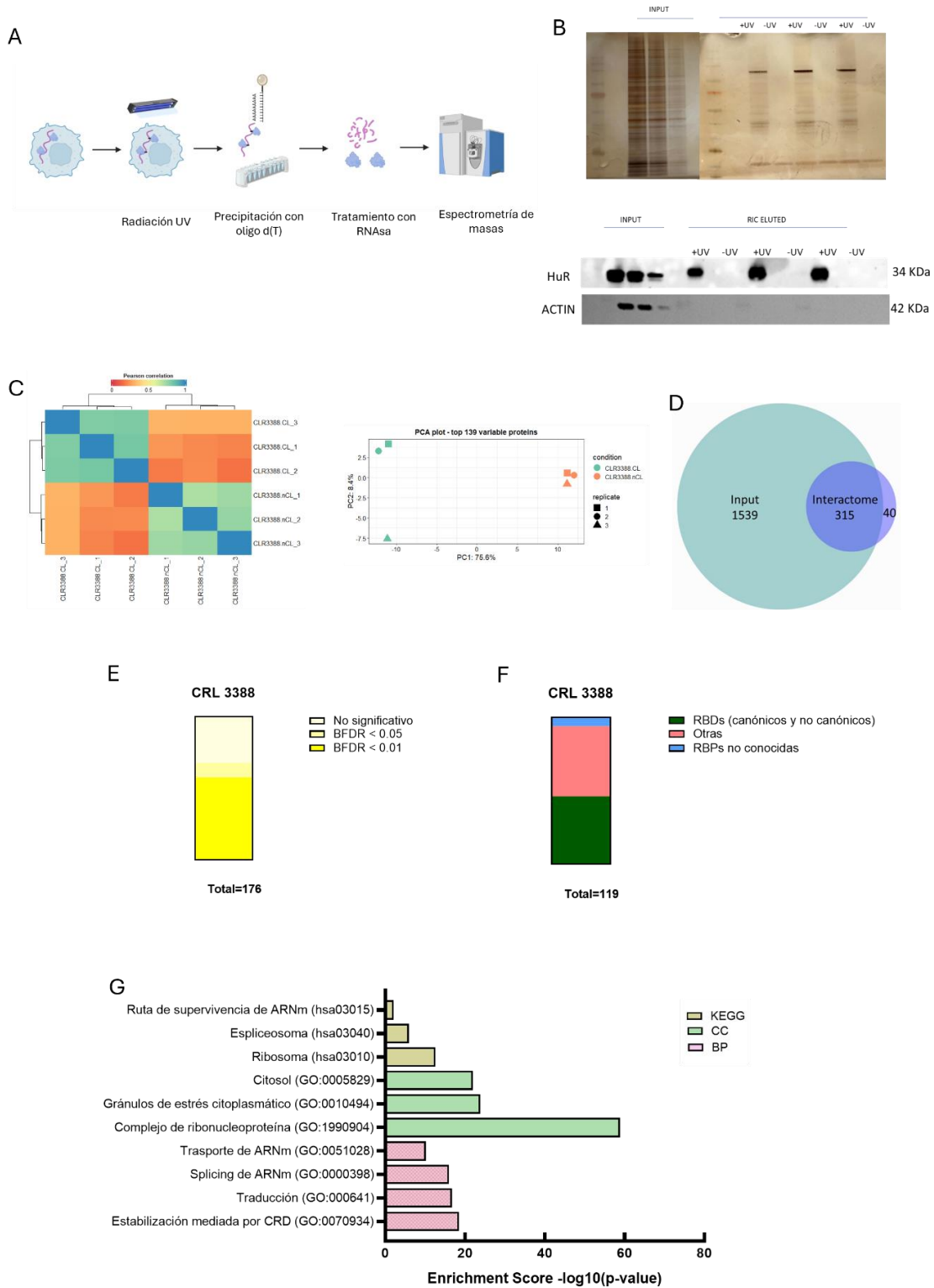


Figura 34. RBPoma de la línea celular CRL3388. (A) Representación gráfica del procedimiento del RIC. (B) Silver staining y Western blot de la RBP conocida HuR y actina para la validación del correcto funcionamiento del RIC. (C) Análisis de matriz de correlación y PCA de las diferentes réplicas con los datos obtenidos en la proteómica. (D) Diagrama de Venn de las proteínas del proteoma total y las proteínas del RIC. (E) Distribución de las proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL no significativas, BFDR<0.05 y BFDR<0.01. (F) Distribución de las RBPs (BFDR<0.05) en RBPs con dominio de unión conocido, RBPs sin dominio de unión conocido y no consideradas RBPs previamente. (G) Análisis de Gene Ontology BP, CC y KEGG de las RBPs de la línea celular CRL3388. (Elaboración propia)

5.2.1.4. RBPoma T265

Se realizó en la línea celular T265 la técnica del RIC de igual manera que se ha descrito con la línea iHSC λ 1 (**Figura 35B**). Con los datos obtenidos en la proteómica, se realizaron dos análisis de control de las muestras: matriz de correlación y análisis de componentes (**Figura 35C**). Comparamos el proteoma total (*input*) con el RBPoma y comprobamos que 669 proteínas están enriquecidas en el RIC (**Figura 35D**).

De las 337 proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL, tras aplicar el algoritmo de SAINTexpress, 105 se consideraron RBPs (BFDR < 0.05) (**Figura 35E**). Estas 105 proteínas se distribuyen entre RBPs que no tienen dominio de unión conocido y RBPs con RBD conocido. Una pequeña parte de las RBPs no han sido previamente anotadas como proteínas de unión al ARN (**Figura 35F**).

Las RBPs detectadas en esta línea celular destacan por regular procesos de traducción, *splicing* y procesamiento de ARNr y ARNm. Se localizan principalmente en los complejos de ribonucleoproteínas, aunque también en el ribosoma citosólico y en el exosoma. Regulan rutas de señalización relacionadas con el ribosoma, espliceosoma y la supervivencia del ARNm (**Figura 35G**).

5.2.1.5. RBPoma S462

Se realizó en la línea celular S462 la técnica del RIC de igual manera que se ha descrito con la línea iHSC λ 1 (**Figura 36B**). Con los datos obtenidos en la proteómica, se realizaron dos análisis de control de las muestras: matriz de correlación y análisis de componentes (**Figura 36C**). Comparamos el proteoma total (*input*) con el RBPoma y comprobamos que 254 proteínas están enriquecidas en el RIC

De las 263 proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL, tras aplicar el algoritmo de SAINTexpress, 203 se consideraron RBPs (BFDR < 0.05) (**Figura 36D**). Estas 203 proteínas, se distribuyen entre RBPs que no tienen dominio de unión conocido y RBPs con RBD conocido. Una pequeña parte de las RBPs no han sido previamente anotadas como proteínas de unión al ARN (**Figura 36F**).

Las RBPs detectadas en esta línea celular destacan por regular procesos de *splicing*, procesamiento del ARN, estabilización del ARN y traducción. Se localizan principalmente en los complejos de ribonucleoproteínas, aunque también en los gránulos de estrés citoplasmático y en el nucleoplasma. Regulan rutas de señalización relacionadas con el espliceosoma, ribosoma y la supervivencia del ARN (**Figura 36G**).

Podemos observar cómo, en las líneas celulares de cáncer, las funciones moleculares cambian su importancia respecto a las líneas de células de Schwann. El *splicing* pasa a ser la función molecular con más importancia, respecto a la traducción de las células de Schwann inmortalizadas y la estabilización del ARN de las células de neurofibroma, llegando a tener una mayor importancia en la línea celular de MPNST S462.

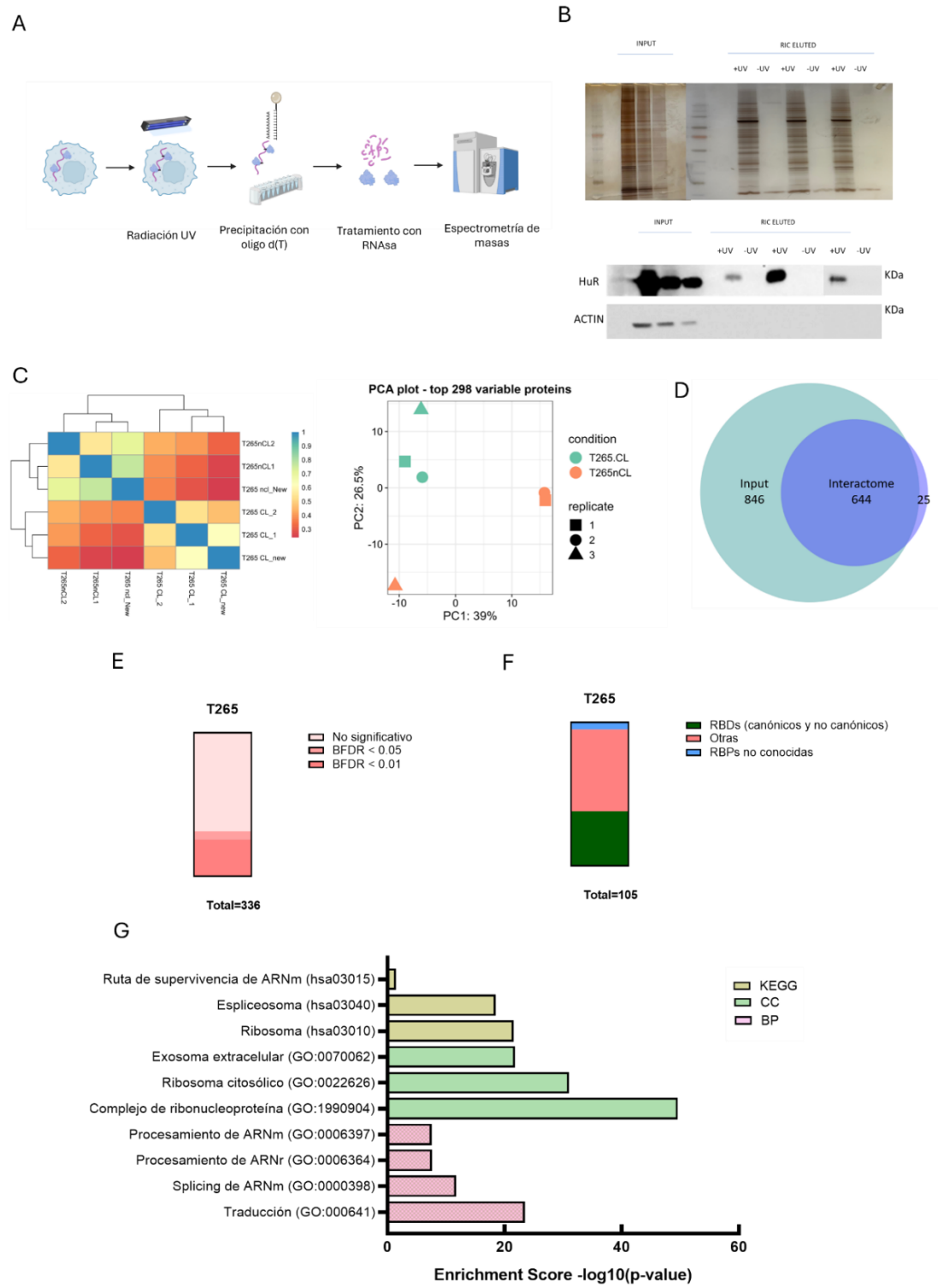


Figura 35. RBPoma de la línea celular T265. (A) Representación gráfica del procedimiento del RIC. (B) Silver staining y Western blot de la RBP conocida HuR y actina para la validación del correcto funcionamiento del RIC. (C) Análisis de matriz de correlación y PCA de las diferentes réplicas con los datos obtenidos en la proteómica. (D) Diagrama de Venn de las proteínas del proteoma total y las proteínas del RIC. (E) Distribución de las proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL no significativas, BFDR<0.05 y BFDR<0.01. (F) Distribución de las RBPs (BFDR<0.05) en RBPs con dominio de unión conocido, RBPs sin dominio de unión conocido y no consideradas RBPs previamente. (G) Análisis de Gene Ontology BP, CC y KEGG de las RBPs de la línea celular T265. (Elaboración propia)

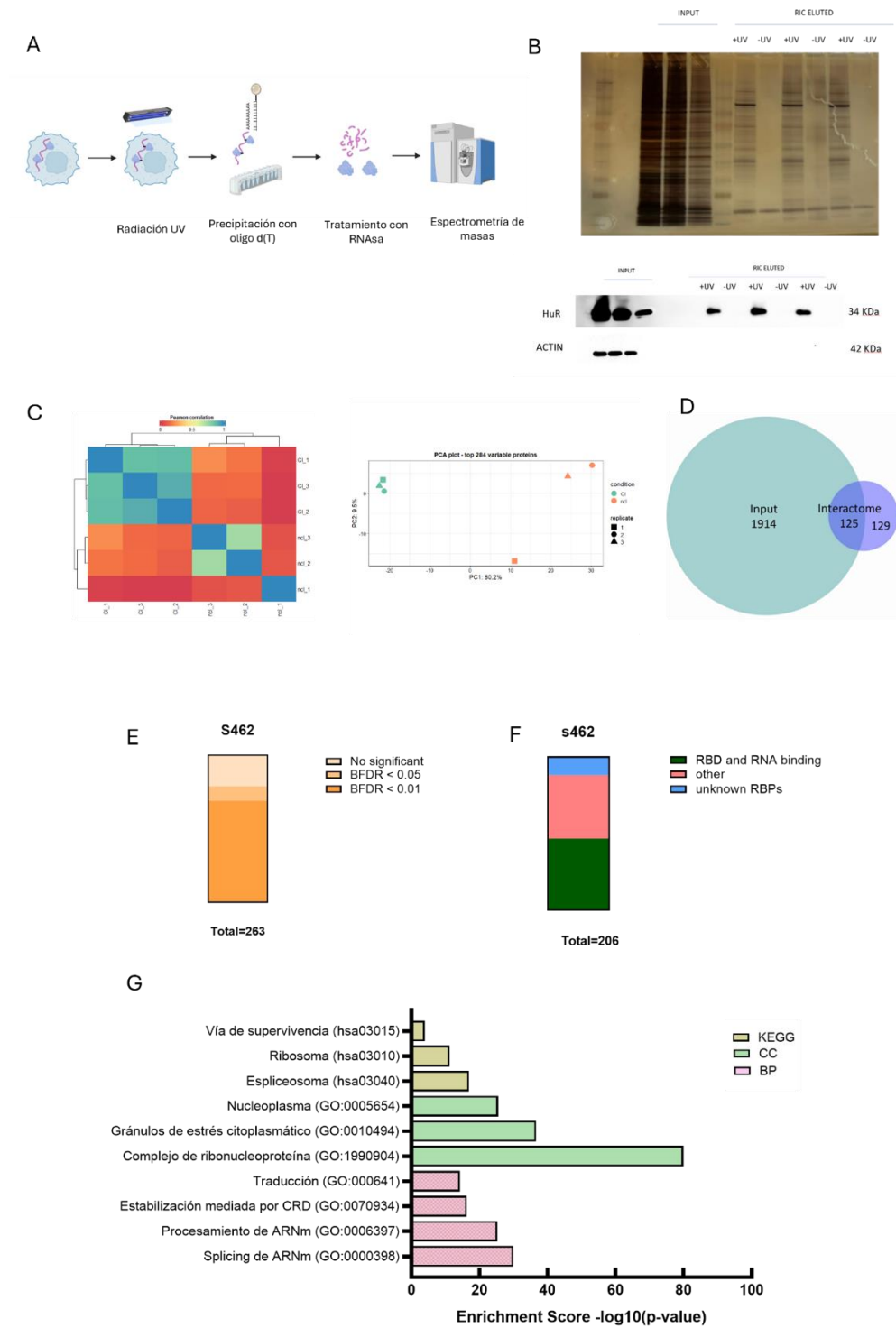


Figura 36. RBPoma de la línea celular S462. (A) Representación gráfica del procedimiento del RIC. (B) Silver staining y Western blot de la RBP conocida HuR y actina para la validación del correcto funcionamiento del RIC. (C) Análisis de matriz de correlación y PCA de las diferentes réplicas con los datos obtenidos en la proteómica. (D) Diagrama de Venn de las proteínas del proteoma total y las proteínas del RIC. (E) Distribución de las proteínas detectadas en el set de muestras CL-nCL no significativas, BFDR<0.05 y BFDR<0.01. (F) Distribución de las RBPs (BFDR<0.05) en RBPs con dominio de unión conocido, RBPs sin dominio de unión conocido y no consideradas RBPs previamente. (G) Análisis de Gene Ontology BP, CC y KEGG de las RBPs de la línea celular S462. (Elaboración propia)

5.2.2. Comparación de la actividad de las proteínas de unión al ARN en los diferentes estadios de la progresión tumoral

Con los datos obtenidos en los análisis proteómicos, se realizó una comparación entre las proteínas detectadas en las diferentes líneas celulares. Se puede observar que hay 9 proteínas que se han detectado exclusivamente en las líneas celulares de MPNST y no en el resto (**Figura 37A**). De estas, se escogieron 2 RBPs: DDX56 y RBM28. Además, se escogieron 2 RBPs adicionales, que aparecen en las S462 y no en el resto de las líneas celulares, pero que se detectan en 2 de las réplicas de las T265: MEX3A y UBAP2L. Se llevó a cabo un análisis de la expresión de estas proteínas en una base de datos de *microarray* con muestras de pacientes con MPNST. Se observó un aumento de la expresión de todas ellas en pacientes de MPNST respecto a neurofibroma (**Figura 37B**).

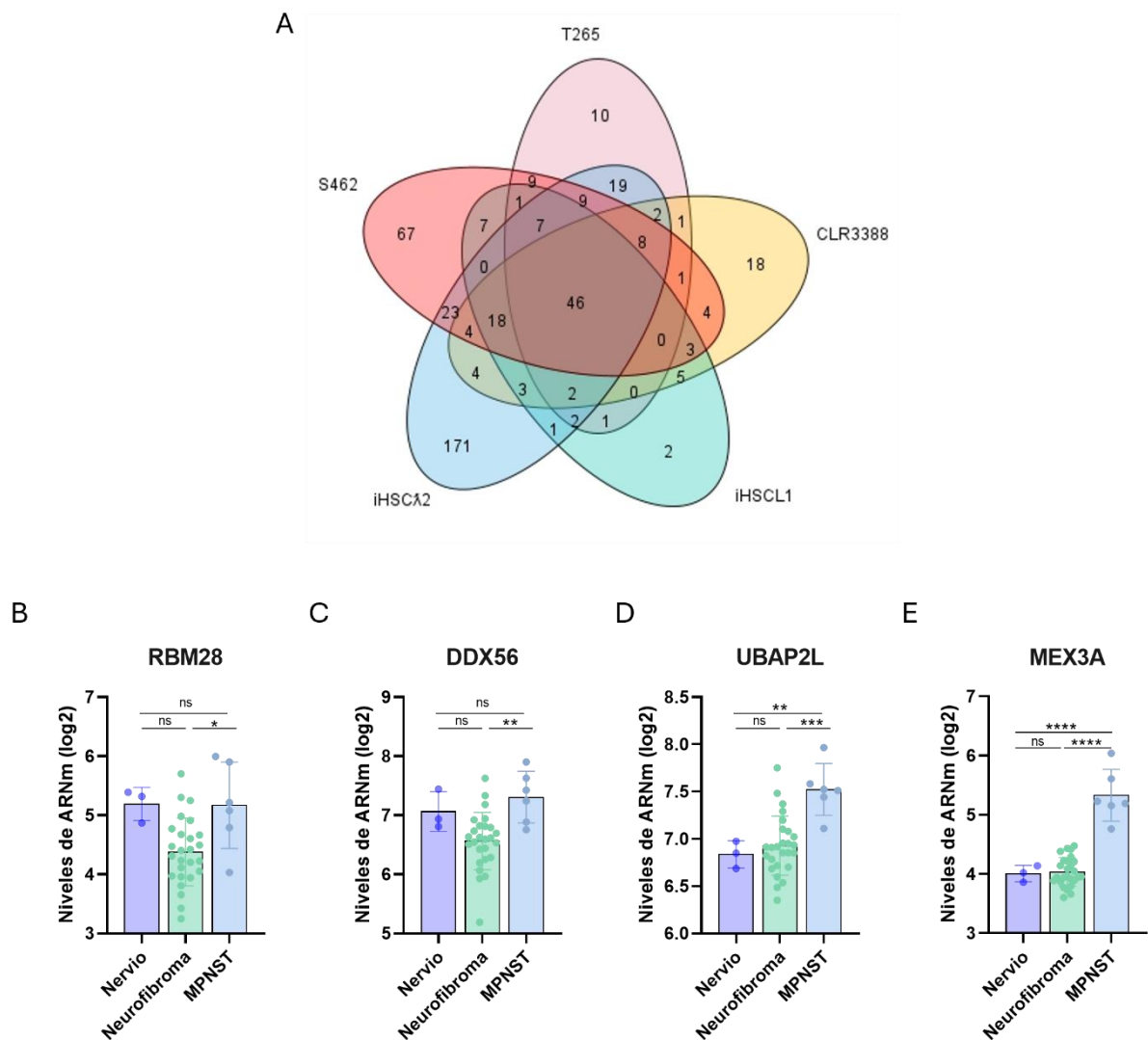


Figura 37. Expresión de RBM28, DDX56, UBAP2L y MEX3A en líneas celulares y muestras de nervios sanos, neurofibromas y MPNSTs. (A) Diagrama de Venn de las proteínas detectadas como RBPs en las diferentes líneas celulares. (B) Representación gráfica de los niveles de ARNm de RBM28, DDX56, UBAP2L y MEX3A en muestras de nervio sano, neurofibroma y MPNST. Los valores proceden de la base de datos GSE41747. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

Se validaron los datos en las líneas celulares de células Schwann, neurofibroma y MPNST por qPCR. Demostramos que estos genes se expresan más en líneas de MPNSTs que en células de neurofibroma y que en células de Schwann inmortalizadas, aunque en el caso de RBM28 y UBAP2L esta diferencia no es significativa (**Figura 38**).

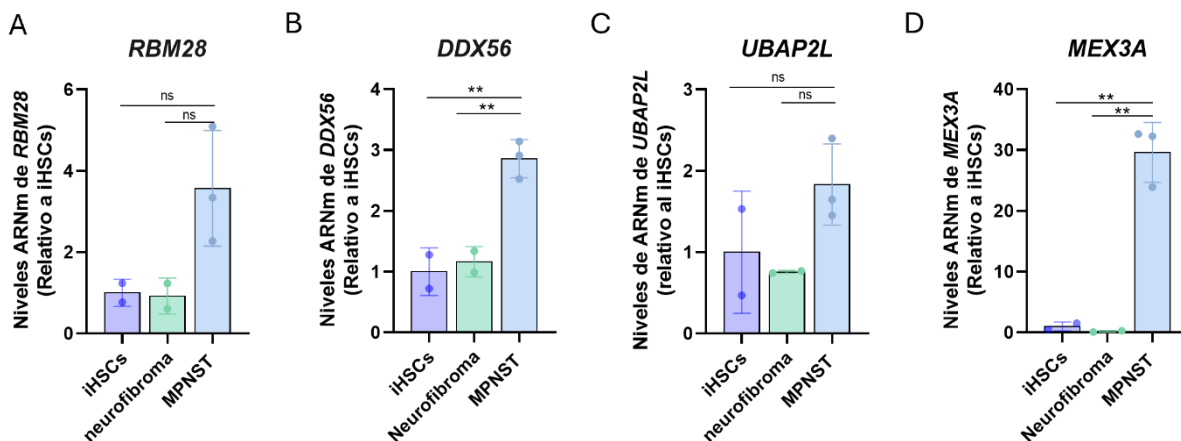


Figura 38. *RBM28*, *DDX56*, *UBAP2L* y *MEX3A* aumentan su expresión en MPSNT. Representación gráfica de los niveles de ARNm de - *RBM28*, *DDX56*, *UBAP2L* y *MEX3A* en las diferentes líneas celulares de iHSCs, neurofibroma y MPNST (A) *RBM28*, (B)*DDX56*, (C)*UBAP2L*, (D)*MEX3A*. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

Se seleccionó *MEX3A* como principal candidata a proteína marcadora de progresión tumoral o como posible proteína diana en el tratamiento tumoral. Como se ha observado en los datos previos, *MEX3A* mantiene su expresión basal en las células de Schwann inmortalizadas y en líneas celulares de neurofibroma, pero su expresión se dispara en MPNSTs. Esto parece indicar que *MEX3A* podría tener un papel importante en el desarrollo tumoral.

5.2.3. Papel de *MEX3A* en la progresión tumoral

Se decidió hacer un estudio en profundidad de *MEX3A*. En Gepia2, podemos observar que casi en la totalidad de los tipos de cáncer, *MEX3A* tiene una mayor expresión que en los tejidos sanos correspondientes (**Figura 39**).

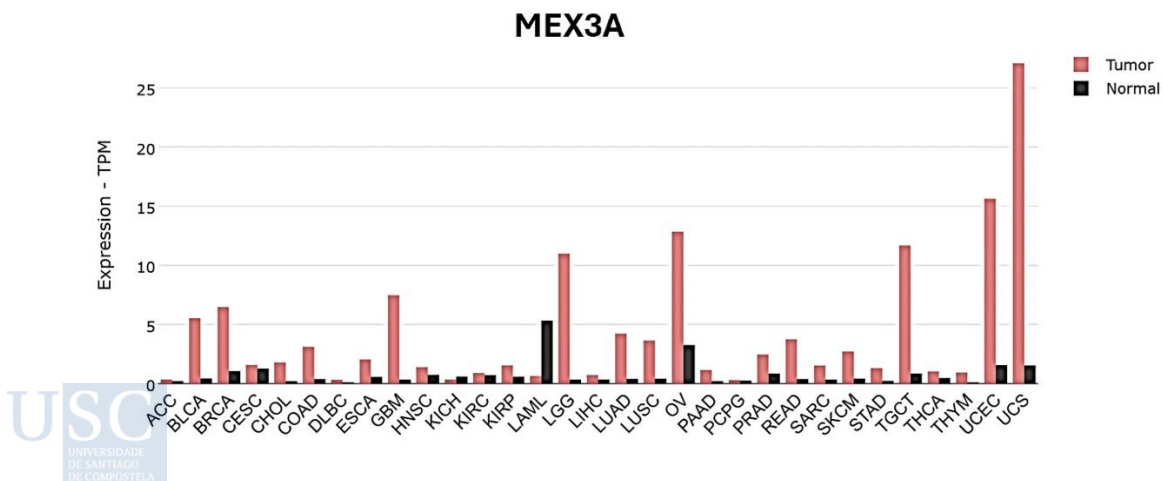


Figura 39. *MEX3A* se expresa más en tumores que en tejidos sanos. Diagrama de barras que representa la expresión de *MEX3A* en 31 tipos de tumores y en sus respectivos tejidos sanos. (Elaboración propia)

Las curvas de supervivencia en sarcoma y en el resto de los tumores, confirman que los pacientes con altos niveles de *MEX3A* tienen peor supervivencia global que los pacientes con baja expresión. Cabe destacar que es más pronunciado en sarcoma que en el dato global de todos los tumores (**Figura 40A, B**).

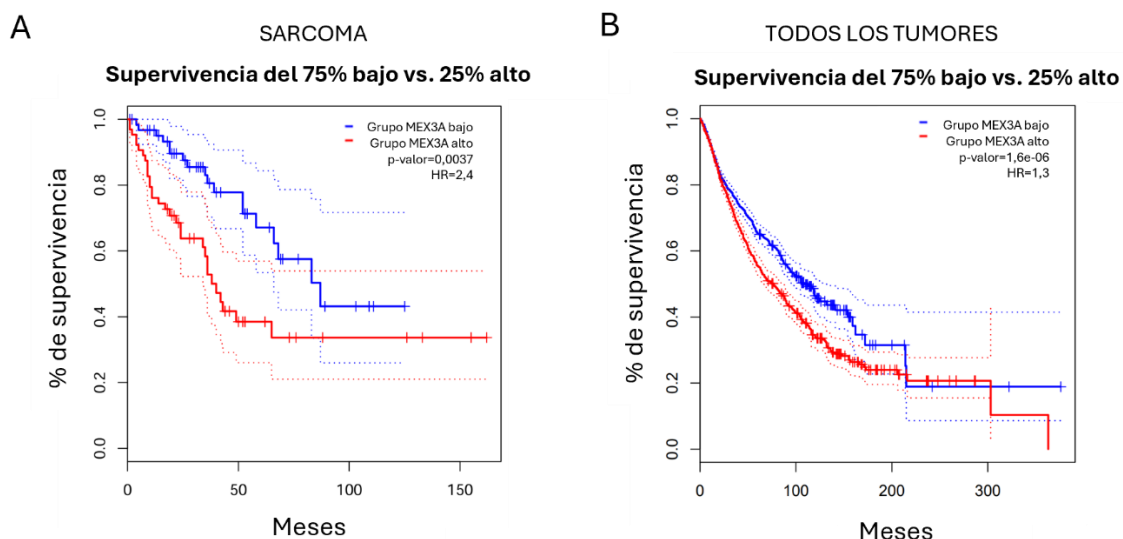


Figura 40. Los pacientes con mayor expresión de *MEX3A* tienen una tasa de supervivencia más baja. Gráfico de supervivencia con alto nivel de expresión de *MEX3A* respecto a pacientes con bajo nivel de *MEX3A* de pacientes con (A) sarcoma y (B) con cualquier tipo de tumor. (Elaboración propia)

Los datos de scRNA-Seq revelan que la expresión de *MEX3A* es más elevada en las células de Schwann que en el resto de las células que conforman estos tumores (**Figura 41A**). Además, *MEX3A* se expresa en mayor número de células de Schwann en MPNSTs que en neurofibromas (**Figura 41B, C**).

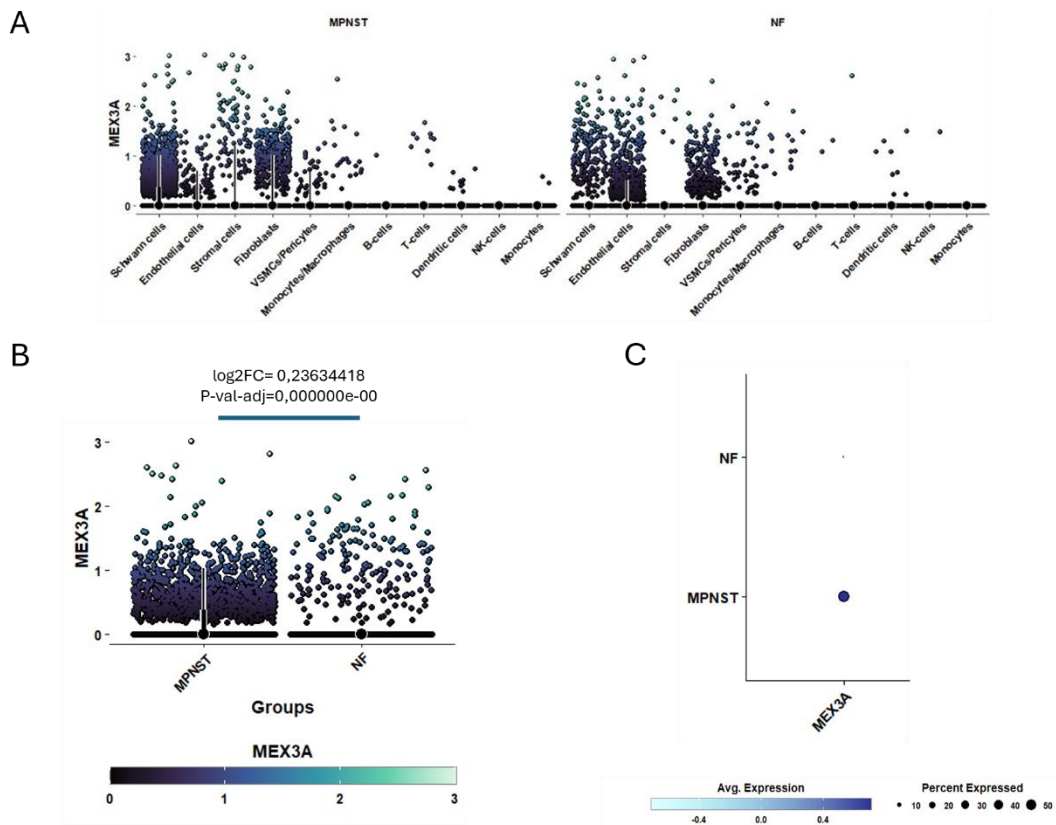


Figura 41. *MEX3A* se expresa en un mayor porcentaje de células en MPNST que en NF. (A) *GeyserPlot* de que representa los *counts* normalizados en las células únicas de los grupos MPNST y NF todos los tipos celulares que comprenden un MPNST. Cada punto representa una célula y el color, el número de *counts* por célula. (B) *GeyserPlot* que representa los *counts* normalizados en las células únicas de los grupos MPNST y NF en las células de Schwann. (C) *Dotplot* que representa la expresión media del gen *MEX3A* por cada fenotipo, el color hace referencia a la expresión media del gen en ese fenotipo, mientras que el tamaño del círculo refiere al porcentaje de células que expresa ese gen. Resultado del análisis de expresión diferencial del gen *MEX3A* en la comparativa MPNST vs. NF, realizado con un *Wilcoxon rank sum test* (Seurat 4.3.0). (Elaboración propia)

Se realizó otra validación de la expresión de *MEX3A* en una base de datos de RNAseq con datos de pacientes (GSE141438) (146). Se confirmó que los niveles de ARNm de *MEX3A* en MPNSTs aumentan respecto al tejido sano y al tejido de neurofibromas (**Figura 42A**). Validamos estos resultados por qPCR en muestras de pacientes y se confirmó el aumento de los niveles de ARNm en MPNST respecto a nervio sano y neurofibromatosis, aunque en este caso, la dispersión de los datos en muestras de MPNST impidió demostrar la significancia estadística de esta diferencia (**Figura 42B**).

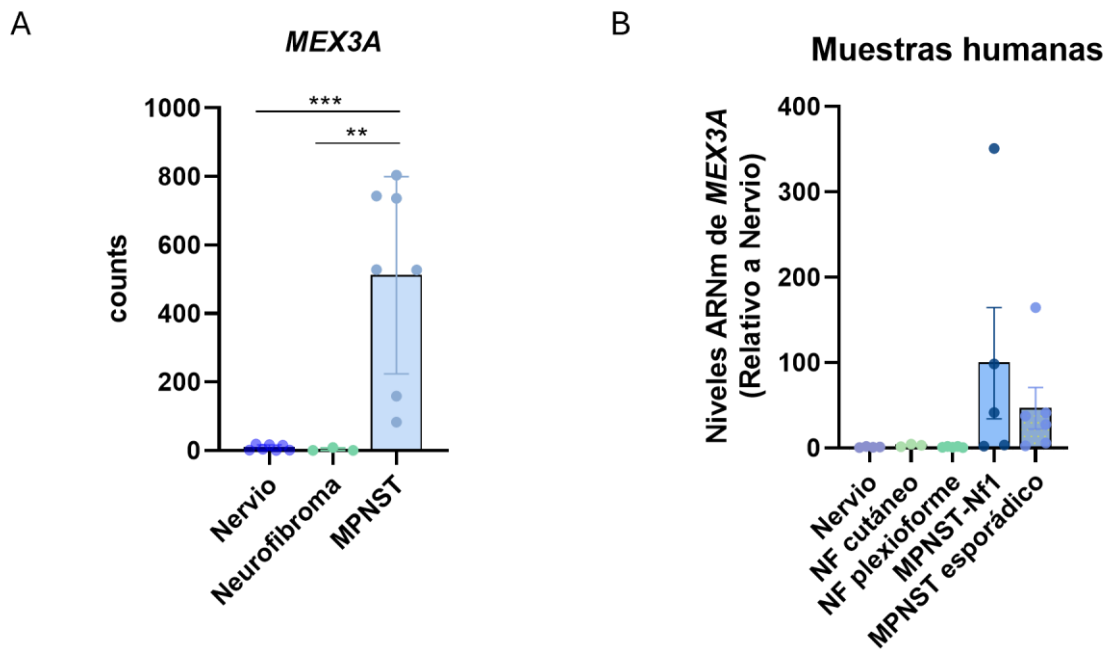


Figura 42. Los niveles de ARNm de *MEX3A* tienden a aumentar en MPNST. (A) Gráfico con representación de los datos de RNAseq de la base de datos GSE141438. (B) Gráfico de barras con los resultados de la qPCR de muestras humanas relativizados a GAPDH. Los datos se representan como media \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (Elaboración propia)

5.2.3.1. El silenciamiento de *MEX3A* reduce las propiedades tumorales de las células de MPNST.

Para ver el papel funcional de *MEX3A* en MPNST, silenciamos *MEX3A* en las líneas celulares de MPNSTs T265 y S462 y examinamos el crecimiento celular mediante el análisis de niveles de ATP y el ensayo de colonias (*Foci*). El silenciamiento de *MEX3A* fue efectivo (**Figura 43A**) y tiende a reducir los niveles de ATP de las células de MPNSTs en las que se ha silenciado *MEX3A* respecto al shCTRL, lo que se traduce en una disminución de la viabilidad de estas células (**Figura 43B**). Además, también se vio una reducción en la capacidad de las células de crecer en colonias cuando se silenció *MEX3A* (**Figura 43C**).

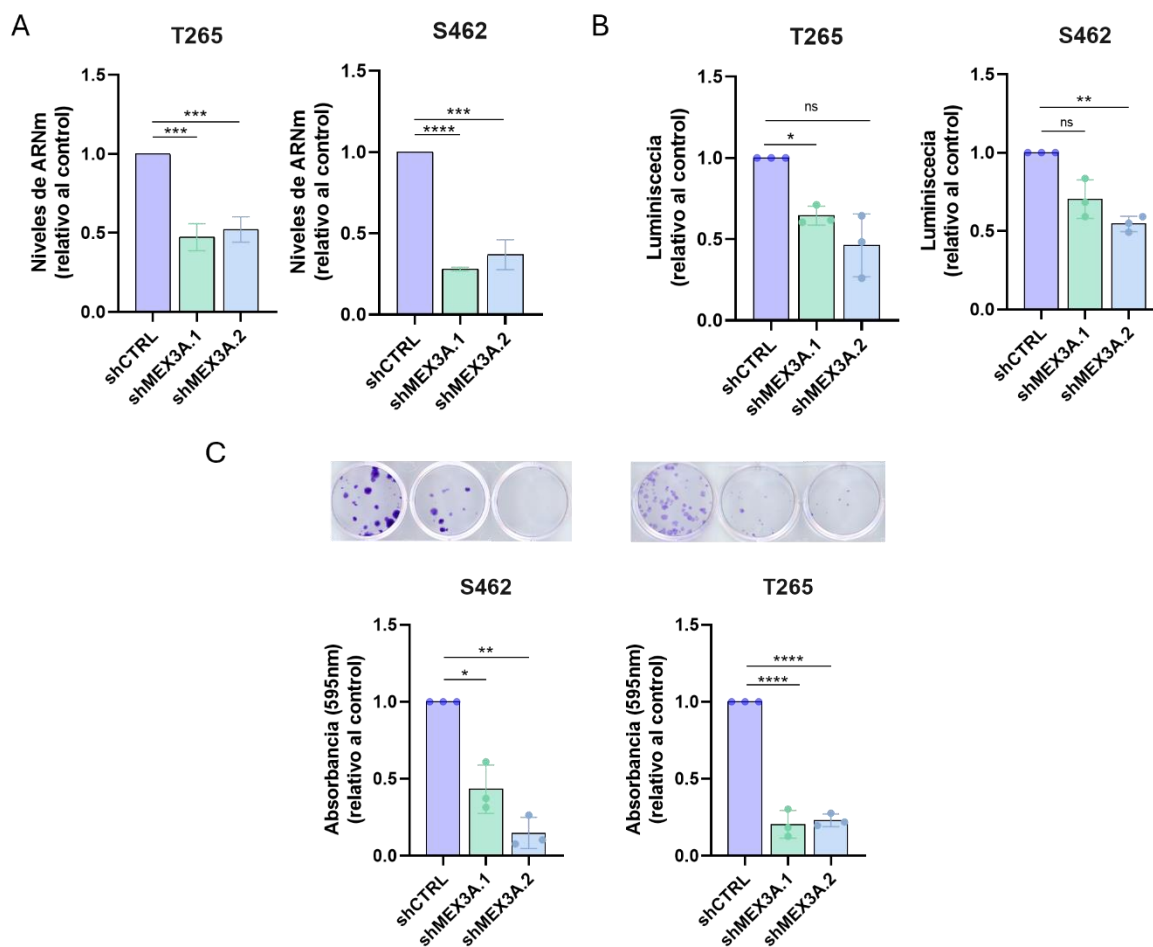


Figura 43. El silenciamiento de *MEX3A* reduce ligeramente las propiedades tumorales de las células de MPNST. (A) Datos de qPCR de los niveles de *MEX3A* tras su silenciamiento. (B) Representación gráfica de los niveles de ATP del silenciamiento de *MEX3A* respecto al control. (C) Representación gráfica y visual del ensayo de formación de colonias en células controles y silenciadas. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Elaboración propia)

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La neurofibromatosis de tipo I es una enfermedad autosómica dominante que afecta a 1 de cada 3.000 niños nacidos en el mundo. Su signo (importante distinguir entre síntoma y signo) más característico son los neurofibromas, pudiendo ser dérmicos o plexiformes, que son tumores benignos producidos principalmente por una mutación en el gen *NF1* en las células de Schwann. La mutación de *NF1* produce la pérdida funcional de la neurofibromina, una proteína inactivadora de RAS y, como consecuencia, la activación de rutas de señalización celular implicadas en procesos de proliferación y supervivencia. La esperanza de vida de estos pacientes es 15 años menor que la de la población general (160). Una de las principales causas de muerte es el desarrollo de tumores malignos; entre el 8-13% de los pacientes con esta enfermedad desarrollan tumores malignos de la vaina del nervio periférico como progresión de neurofibromas plexiformes.

Los MPNSTs son un tipo de sarcoma raro y agresivo que afecta al 0.001% de la población general. La supervivencia de los pacientes con MPNST a los 5 años es muy baja, cerca del 35%. Más del 50% de los MPNSTs se producen en el contexto de la neurofibromatosis de tipo I, el resto, se producen de forma esporádica o como consecuencia de la radioterapia. Los NF necesitan mutaciones adicionales para poder malignificarse, normalmente estas se producen en *PRC2*, *SUZ12* o *TP53*. Estos tumores pueden producir fácilmente metástasis y no hay tratamientos eficaces para su reducción. La búsqueda de nuevos tratamientos y marcadores de diagnóstico puede ayudar al manejo de los pacientes, así como a una detección temprana de MPNST en el desarrollo de la neurofibromatosis. Como consecuencia, se podría mejorar la calidad de vida y la supervivencia global de las personas con esta enfermedad.

La desregulación genética es un sello distintivo de las células cancerosas. Las alteraciones genéticas en estas células conducen invariablemente a una remodelación global de su transcriptoma, que les permite adquirir capacidades funcionales avanzadas para la supervivencia, proliferación y diseminación. Los MPNSTs tienen una firma transcriptómica única, que es distinta a la de las células de Schwann sanas y la de los neurofibromas. Una estrategia terapéutica prometedora, es manipular los programas transcriptómicos desregulados en cáncer, enfocándose en la identificación de los reguladores moleculares clave que gobiernan estos programas.

Las proteínas de unión al ARN son reguladores transcripcionales y postranscripcionales capaces de regular cientos de transcritos. Esto las convierte en los principales reguladores del transcriptoma. Pueden regular todos los aspectos de la vida del ARN: transcripción, modificación del ARN, *splicing*, transporte núcleo-citosol, localización, estabilización y degradación. Las RBPs desempeñan un papel central en la regulación de la expresión génica, su desregulación se ha relacionado con varias patologías humanas como enfermedades metabólicas, neurológicas, inmunológicas y cáncer. Estas proteínas pueden regular miles de genes relacionados funcionalmente, con lo que podrían controlar el sello genómico de las células tumorales.

En los últimos años, se han identificados varias RBPs como potenciales biomarcadores o proteínas diana en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (161) (162). En un estudio

anterior del grupo, se demostró que la RBP HuR tiene un papel fundamental en el crecimiento tumoral y la capacidad metastática de los MPNSTs (163). En esta tesis, hemos identificado otras RBPs que podrían tener un papel igual de importante en los MPNSTs. Los datos obtenidos del análisis de datos de bases de datos de *microarray* parecen indicar que las RBPs juegan un papel importante en los MPNSTs. De los 127 genes desregulados en MPNST respecto al neurofibroma, 59 codifican para RBPs.

La familia LSM se ha relacionado previamente con el crecimiento tumoral. LSM1 se ha relacionado con varios tipos de cáncer como el de páncreas, mama o próstata (164) (165) (166). LSM3 se ha relacionado con cáncer cervical (167) y LSM7 con cáncer de tiroides (168). Otros miembros como LSM4 se ha relacionado con carcinoma hepatocelular (169). Estudios computacionales en glioma, sostienen que LSM5 podría ser un buen marcador de valor pronóstico y terapéutico (130). La información obtenida de los análisis bioinformáticos de 4 bases de datos de *microarray* revela la posibilidad de que LSM5 sea una buena RBP candidata para el tratamiento y diagnóstico del MPNST. Esto es debido a que en los datos de las muestras de pacientes con MPNST respecto a las muestras de pacientes con neurofibromas, *LSM5* se expresa de forma diferencial.

Los pacientes de MPNST que presentan una mayor expresión de *LSM5* tienden a tener un pronóstico más desfavorable, su curva de supervivencia es inferior respecto a aquellos pacientes que presentan una menor expresión de este gen (los datos son de *microarrays*, no necesariamente una sobreexpresión del gen se traduce en una sobreexpresión de proteína). Además, los datos de *scRNA-Seq* evidencian que *LSM5* se expresa en un mayor número de células de MPNST que de neurofibromatosis. Estos datos se confirmaron mediante el análisis del ARNm y proteína de líneas celulares representativas de células de Schwann, neurofibromas y MPNST. También se realizó una confirmación en muestras humanas a nivel de ARN y proteína.

En este estudio, se presentan datos que demuestran que las células de MPNST dependen de manera crítica de *LSM5* para mejorar su capacidad de supervivencia y proliferación. Realizando un ensayo de viabilidad celular, se comprobó que el silenciamiento de *LSM5* afecta en mayor medida a las células tumorales de MPNST que a las células de Schwann sanas inmortalizadas. Esto es importante a la hora de escoger una proteína diana para hacer un tratamiento: el silenciamiento de *LSM5* podría no ser tóxico para las células sanas. También se confirmó que el silenciamiento de *LSM5* reduce diferentes propiedades tumorales como la proliferación, el crecimiento en colonia y el crecimiento independiente de anclaje. Además, se realizó un ensayo *in vivo* de trasplante de xenograft que validó los datos obtenidos en los ensayos funcionales *in vitro*. Las células tumorales que tienen silenciada *LSM5* no son capaces de producir tumores en ratones *Nude*. Se puede concluir, por tanto, que el silenciamiento de *LSM5* tiene un papel clave en la reducción de las propiedades tumorales en células de MPNST.

Cabe destacar que la amplia variedad de mecanismos moleculares en los que está implicado *LSM5* son desregulados como consecuencia del silenciamiento de esta proteína. Las terapias actuales con las RBPs tienen como objetivo la interacción ARN-RBP. Por tanto, identificar los ARNm a los que se unen, así como conocer los diferentes mecanismos moleculares, podría mejorar el tratamiento, aplicándolo a interacciones con ARNm más concretas y efectivas. *LSM5* es una RBP con dos funciones principales: la regulación del proceso de *splicing* como parte del complejo LSM2-8, y la degradación del ARN como parte del complejo LSM1-7. Estos dos procesos son muy importantes en la progresión tumoral. Se ha descrito que se produce una desregulación de las variantes de *splicing* en el tejido tumoral

respecto al tejido sano. Además, la degradación del ARN, que es crucial para el recambio y la vigilancia del ARNm, también está desregulada en cáncer.

El silenciamiento de *LSM5* tiene como consecuencia la disminución de genes implicados en el desarrollo axonal, como la axonogénesis, el desarrollo de la proyección neuronal o la guía de la proyección neuronal. Por otro lado, se desregulan genes implicados en el catabolismo de ácidos orgánicos, carboxílicos o de moléculas pequeñas, que podría influir en el crecimiento de las células MPNST, ya que se sabe que el metabolismo es uno de los procesos clave en el proceso tumoral. Además, el silenciamiento de *LSM5* aumenta la expresión de genes implicados en la biogénesis ribosomal, así como en el procesamiento de ARN ribosómico, que está en línea con estudios anteriores que demuestran que las proteínas LSM son necesarias para la maduración de los ARN ribosomales (159).

En la firma transcriptómica de las células en las que se ha silenciado *LSM5* destaca la desregulación de genes implicados en apoptosis, la cual se confirmó mediante un ensayo de citometría de flujo con Anexina V. Este fenómeno se había descrito previamente en levaduras, donde la mutación en algunos de los componentes del complejo implicado en la degradación del ARN (*LSM1-7*), mostraba una acumulación de intermediarios de degradación de ARNm y un aumento intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (170). Los datos de *RNA-seq* revelan que el silenciamiento de *LSM5* produce un enriquecimiento en genes implicados en vías de señalización de ROS, el cual podría ser un componente importante para la supervivencia de las células MPNST.

La desregulación del *splicing* en el ARN desempeña un papel oncogénico en ciertos tipos de cáncer. Las células cancerosas expresan selectivamente las variantes de *splicing* potencialmente oncogénicas de los genes afectados para obtener ventajas en la progresión tumoral, metástasis, resistencia a terapia y otros procesos oncogénicos. En los últimos años, han emergido nuevos enfoques terapéuticos con diana molecular en componentes de este proceso, para el tratamiento de diferentes tipos de tumores (171). El silenciamiento de *LSM5* produce una desregulación de los procesos de *splicing*. La falta de *LSM5* favorece la retención de intrones, evento que ya se había descrito previamente que ocurría en mutantes del complejo *LSM2-8* en plantas (172). El incorrecto funcionamiento de este sistema podría explicar el aumento de genes implicados en respuesta a proteínas desplegadas, que vemos en el *RNA-seq* al silenciar *LSM5*.

Algunos eventos de *splicing* interesantes, que podrían ayudarnos a describir el mecanismo molecular que lleva al fenotipo no tumoral, son las variantes de *exon skipping* de *CDK2*, *CCNT1* y *CEACAM1*. *CDK2* es una proteína implicada en el proceso del ciclo celular y favorece las transiciones G1/S y S/G2. Está descrito que la pérdida del exón 5 de *CDK2* impide la correcta formación de la proteína, lo que produce una perturbación del ciclo celular (154). En este trabajo se demuestra que el silenciamiento de *LSM5* induce una mayor pérdida del exón 5 de *CDK2*, lo que produce una disminución de los niveles de la proteína. Esta reducción podría estar relacionada con la disminución de la proliferación de las células de MPNST silenciadas.

Por otro lado, el gen *CCNT1* codifica para una proteína denominada CICLINA T1 que se une a *CDK9* para regular la elongación de la transcripción. La base de datos *The cancer genome atlas (TCGA)* confirma que la variante con mayor PSI (variante larga) se expresa más en tejidos tumorales que en tejidos sanos (156). Esto podría indicar que esta variante de AS podría estar implicada en procesos tumorales mediante la elongación de la transcripción. De

hecho, la variante larga se ha relacionado previamente con un aumento del crecimiento celular. Ya que, se ha visto que aumentan sus niveles por la expresión de señales de crecimiento, mientras que la pérdida del exón 7 se ha relacionado con una forma no activa de la proteína que se produce en un estado no patológico (173).

Finalmente, otra diana interesante es *CEACAM1*, un gen que codifica una proteína implicada en adhesión celular, que tiene además funciones relevantes en la regulación del crecimiento y metástasis tumoral. Algunas variantes de *splicing* de *CEACAM1* (como la eliminación del exón 7), se han relacionado con una menor metástasis. El silenciamiento de *LSM5* produce la eliminación del exón 5, y aunque no hay información registrada sobre la eliminación del exón 5 en este proceso, es posible que pueda tener una función similar (155).

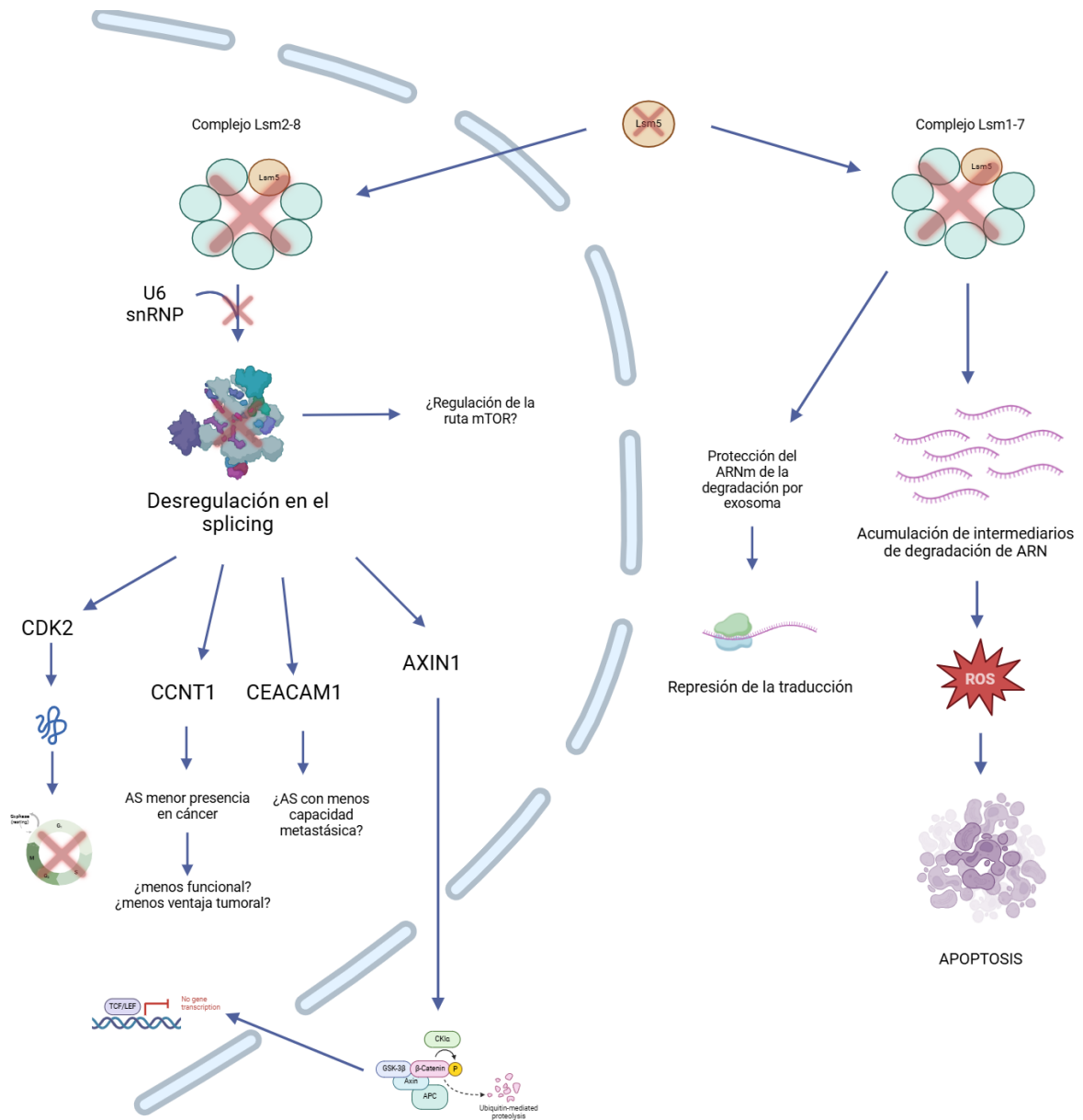


Figura 44. Figura representativa de los posibles mecanismos moleculares que se producen al silenciar *LSM5* en células tumorales. (Elaboración propia)

Los datos obtenidos en este trabajo de *RIP-seq* y transcriptómica mostraron una desregulación global de varias vías de señalización, de las que destacan las rutas PI3K/AKT/mTOR y Wnt/ β -catenina. Análisis centrados en estas vías de señalización concluyeron con alta probabilidad, que la regulación por LSM5 originó el incorrecto funcionamiento de la señalización.

La ruta de señalización Wnt/ β -catenina es esencial para muchos procesos celulares y de desarrollo, además, y se sabe que la vía Wnt desempeña un papel fundamental en la oncogénesis. En MPNST se ha visto que esta ruta está sobreexpresada por la regulación a la baja de componentes del complejo de destrucción de la β -catenina como APC y GSK3B (71). En esta tesis, se propone otro mecanismo complementario: el *splicing* alternativo del gen *AXINI* podría jugar un papel en el desarrollo de MPNST a través de la estabilización de la β -catenina. Se ha demostrado que una variante de *splicing* de *AXINI* (retención del exón 9), que induce la estabilización de β -catenina, está presente en las células tumorales, mientras que el silenciamiento de *LSM5* reduce la expresión de esta variante respecto a otra que no estabiliza a la β -catenina, y que produce una bajada de los niveles globales de esta respecto al control sin silenciar (158).

Los datos de *RNA-seq* demuestran que algunas proteínas clave en la ruta de señalización de mTOR están desreguladas en el silenciamiento de *LSM5* en MPNST respecto al control. Estos datos fueron confirmados a nivel de proteína, lo que parece indicar que el silenciamiento de *LSM5* puede ayudar a inactivar esta ruta de señalización que está sobreactivada en MPNST. Esta ruta es clave en el desarrollo de este tipo de tumores, y, de hecho, muchos de los fármacos que se encuentran en proceso de desarrollo actualmente tienen como diana componentes de la misma. La inhibición de la ruta de mTOR podría explicar el fenotipo antitumoral de las células silenciadas.

La capacidad de *LSM5* para controlar simultáneamente varios reguladores moleculares esenciales de estas células tumorales podría explicar en gran parte los efectos tan profundos de la inhibición de *LSM5* en las células de MPNST. Se ha demostrado que todas estas vías de señalización contribuyen a la patogénesis de MPNST (66)(67)(68). Sin embargo, la inhibición genética o farmacológica de estas dianas individualmente ha sido, en general, modestamente eficaz y en gran medida citostática (73). Por el contrario, se ha demostrado que la inhibición simultánea de diferentes vías es mucho más potente. Así, la inhibición conjunta de las vías de señalización mTOR y Wnt/ β -catenina podría tener un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral, y podría incluso inducir la apoptosis.

Al margen del papel de *LSM5* en el *splicing*, su función como parte del complejo LSM1-7, podría ser crucial, ya que se ha demostrado en levaduras, que en este complejo *Lsm5* expone unos dominios clave para la unión directa con el ARNm (119). La eliminación de la proteína *LSM5* en este complejo, podría impedir el correcto funcionamiento mismo, lo cual debería conducir a un aumento de los transcritos de ARNm. La superposición de los datos obtenidos en el *RIP-seq* y *RNA-seq* indican que hay una mayor cantidad de genes diana de *LSM5* regulados a la baja en la condición de silenciamiento respecto al control. Esto es lo contrario a lo que esperaríamos observar, no obstante, este fenotipo se ha observado en un estudio anterior al silenciar *Lsm1* en levaduras (174). Este estudio defiende que en algunos casos la pérdida de funcionalidad del complejo LSM1-7 podría proteger y estabilizar los ARNm de la degradación dependiente de exosomas, junto con una represión de la traducción. Los cambios producidos en la traducción global al silenciar *LSM5* en este trabajo podrían confirmar esta hipótesis. No

obstante, la relación entre LSM5 como parte del complejo LSM1-7 debe ser estudiada con mayor detenimiento.

La función de LSM5 como regulador de diferentes procesos complejos en los MPNSTs que coordinan múltiples rasgos característicos del proceso tumoral apoya una función reguladora clave de LSM5 en los MPNSTs. Así, al aumentar los niveles de LSM5, las células de MPNST han elaborado un mecanismo adaptativo para amplificar y regular señales oncogénicas clave y modular programas transcripcionales que confieren una ventaja competitiva a estas células tumorales, promoviendo el crecimiento y progresión de los MPNSTs.

Por otro lado, cabe destacar que la búsqueda de nuevos candidatos diana para el tratamiento de MPNST es esencial para mejorar la vida de los pacientes e, incluso, aumentar su supervivencia global a los cinco años. Debemos anticipar que será necesario descubrir un gran número de dianas biológicas para lograr un único fármaco nuevo. Es por ello, que, abrir el marco de posibilidades en el tratamiento de enfermedades complejas, es de vital importancia para el descubrimiento de terapias efectivas (175). En los últimos años, se han descrito varias técnicas que permiten identificar conjuntos de RBPs presentes en una célula y cómo cambian sus niveles y sus interacciones con sus ARNm dianas en respuestas a señales intrínsecas o extrínsecas y en su transformación patológica. Por otra parte, los criterios de diagnóstico de MPNST también necesitan ser mejorados para un diagnóstico precoz. A los pacientes con neurofibromas plexiformes se les puede realizar un seguimiento para un diagnóstico precoz que mejora su calidad de vida. Para ello, se necesitan biomarcadores relevantes para poder distinguir entre neurofibromas plexiformes y MPNST (46) (178) (177).

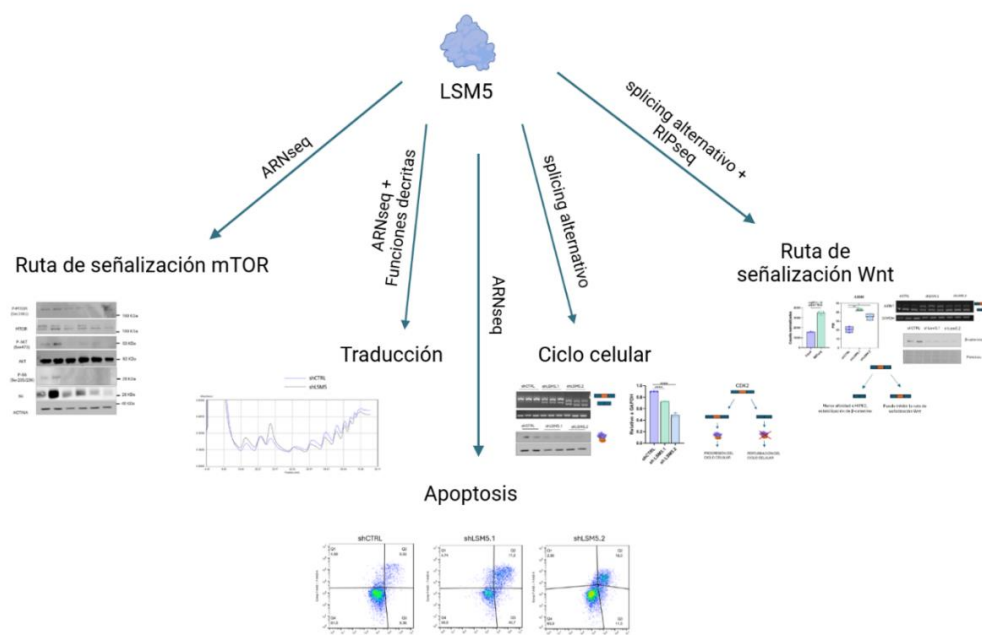
Englobado en esta búsqueda de nuevos tratamientos y biomarcadores, el objetivo de este trabajo consistía en identificar el RBPoma de las células de MPNST y compararlo con el RBPoma de células de Schwann sanas o del tumor benigno de neurofibroma. Aunque el análisis es preliminar, hemos encontrado una huella de RBPs que parecen estar exclusivamente unidas a ARNm en MPNST. Esta huella puede ser potencialmente interesante como biomarcador.

En este trabajo se pone el foco sobre *MEX3A* como posible diana terapéutica y/o biomarcador en MPNST. El análisis funcional de *MEX3A* en estudios preliminares demuestra que puede tener un papel importante en el crecimiento tumoral y el desarrollo de diferentes tumores como el de hígado, mama y ovario (137) (142) (144) (146). Además, los datos recogidos en GEPIA2 muestran una sobreexpresión de esta proteína en casi la totalidad de los tumores respecto al tejido sano. Finalmente, *MEX3A* también ha sido previamente estudiado como posible biomarcador. Varios estudios sustentan el valor pronóstico de *MEX3A* en carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, adenocarcinoma pancreático ductal y gliomas (140) (144) (145) (146) (178).

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. LSM5 podría ser un buen marcador de diagnóstico y pronóstico de pacientes con MPNST.
2. El silenciamiento de *LSM5* reduce las propiedades tumorales de las células de MPNST *in vitro*. Este efecto es menos pronunciado en las células de Schwann humanas inmortalizadas.
3. El silenciamiento de *LSM5* en células MPNST previene la formación de tumores en modelos de *xenografts in vivo*.
4. LSM5 se une a cientos de ARNms y, como consecuencia, su silenciamiento conduce a la modificación del transcriptoma.
5. El mecanismo molecular por el que LSM5 regula los procesos tumorales es complejo. La ruta mTOR y la ruta Wnt podrían ser dos dianas importantes de esta regulación.
6. El silenciamiento de *LSM5* cambia el patrón del *splicing*. Cambios en *splicing* de los genes *CDK2*, *CCNT1* y *CEACAM1* podrían tener una implicación en la reducción de la progresión tumoral.
7. El silenciamiento de *LSM5* produce un cambio en la traducción global.
8. DDX56, RBM28, UBAP2L y MEX3A pueden tener una implicación en el desarrollo de MPNST.
9. El silenciamiento de *MEX3A* reduce las propiedades tumorales de las células de MPNST.
10. MEX3A aumenta en gran medida su expresión en MPNST respecto a neurofibroma, por lo que podría ser un buen marcador diagnóstico de esta transición.



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Catala, M., & Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Peripheral Nerve Disorders*, 29–41. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52902-2.00003-5>
- (2) Yun, W., Kim, Y. J. y Lee, G., (2022). Direct Conversion to Achieve Glial Cell Fates: Oligodendrocytes and Schwann Cells. *International Journal of Stem Cells*. 15(1), 14–25. <https://doi.org/10.15283/ijsc22008>
- (3). Negro, S., Pirazzini, M., & Rigoni, M. (2022). Models and methods to study Schwann cells. *Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1111/joa.13606>
- (4). Harty, B. L. y Monk, K. R., (2017). Unwrapping the unappreciated: recent progress in Remak Schwann cell biology. *Current Opinion in Neurobiology*. 47, 131–137.: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.003>
- (5) Fledrich, R., Kungl, T., Nave, K.-A. y Stassart, R. M., (2019). Axo-glia interdependence in peripheral nerve development. 146(21), dev151704. <https://doi.org/10.1242/dev.151704>
- (6) Jessen, K. R., (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology [en línea]*. 36(10), 1861–1867. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023>
- (7) Woodhoo, A. y Sommer, L., (2008). Development of the Schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 56(14), 1481–1490. <https://doi.org/10.1002/glia.20723>
- (8) Salzer, J. L. (2015). Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020529. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020529>
- (9) Solovieva, T. y Bronner, M., (2021). Schwann cell precursors: Where they come from and where they go. *Cells & Development*. 166, 203686. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203686>
- (10) Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A. y Jessen, K. R., (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 13(2), 122–135. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2008.00168.x>
- (11) Mirsky, R., Jessen, K. R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Parmantier, E. y Lawson, D., (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *Journal of Physiology-Paris*. 96(1-2), 17–24. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(01\)00076-6](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(01)00076-6)
- (12) Jessen, K. R. y Mirsky, R., (2002). Signals that determine Schwann cell identity*. *Journal of Anatomy [en línea]*. 200(4), 367–376. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00046.x>
- (13) Newbern, J. y Birchmeier, C., (2010). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 21(9), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2010.08.008>

- (14) Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2006). The Neurobiology of Schwann Cells. *Brain Pathology*, 9(2), 293–311. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00228.x>
- (15) Einheber, S., Hannocks, M. J., Metz, C. N., Rifkin, D. B. y Salzer, J. L., (1995). Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *Journal of Cell Biology*. 129(2), 443–458. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.443>
- (16) Mirsky, R. y Jessen, K. R., (1996). Schwann cell development, differentiation and myelination. *Current Opinion in Neurobiology*. 6(1), 89–96. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(96\)80013-4](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(96)80013-4)
- (17) Boerboom, A., Dion, V., Chariot, A. y Franzen, R., (2017). Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00038>
- (18) Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2019). Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.0006>
- (19) Woodhoo, A., Alonso, M. B. D., Droggiti, A., Turmaine, M., D'Antonio, M., Parkinson, D. B., Wilton, D. K., Al-Shawi, R., Simons, P., Shen, J., Guillemot, F., Radtke, F., Meijer, D., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Mirsky, R. y Jessen, K. R., (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nature Neuroscience*. 12(7), 839–847. <https://doi.org/10.1038/nn.2323>
- (20) Cervellini, I., Galino, J., Zhu, N., Allen, S., Birchmeier, C. y Bennett, D. L., (2017). Sustained MAPK/ERK Activation in Adult Schwann Cells Impairs Nerve Repair. *The Journal of Neuroscience*. 38(3), 679–690. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2255-17.2017>
- (21) Wang, J., Chen, H., Hou, W., Han, Q. y Wang, Z., (2023). Hippo Pathway in Schwann Cells and Regeneration of Peripheral Nervous System. *Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1159/000530621>
- (22) Bacallao, K. y Monje, P. V., (2015). Requirement of cAMP Signaling for Schwann Cell Differentiation Restricts the Onset of Myelination. *PLOS ONE*. 10(2), número de artículo: e0116948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116948>
- (23) Norrmén, C. y Suter, U., (2013). Akt/mTOR signalling in myelination. *Biochemical Society Transactions*. 41(4), 944–950. <https://doi.org/10.1042/bst20130046>
- (24) Beirowski, B., Wong, K. M., Babetto, E., & Milbrandt, J. (2017). mTORC1 promotes proliferation of immature Schwann cells and myelin growth of differentiated Schwann cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), E4261—E4270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620761114>
- (25) Figlia, G., Gerber, D., & Suter, U. (2017). Myelination and mTOR. *Glia*, 66(4), 693–707. <https://doi.org/10.1002/glia.23273>
- (26) Zhang, S. H., Shurin, G. V., Khosravi, H., Kazi, R., Kruglov, O., Shurin, M. R., & Bunimovich, Y. L. (2019). Immunomodulation by Schwann cells in disease. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(2), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02424-7>

- (27) Oliveira, J. T., Yanick, C., Wein, N., & Gomez Limia, C. E. (2023). Neuron-Schwann cell interactions in peripheral nervous system homeostasis, disease, and preclinical treatment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1248922>
- (28) Trias, E., Kovacs, M., King, P. H., Si, Y., Kwon, Y., Varela, V., Ibarburu, S., Moura, I. C., Hermine, O., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2020). Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, 68(6), 1165–1181. <https://doi.org/10.1002/glia.23768>.
- (29) Ciszewski, D. K., & Ames, N. K. (1987). Diseases of the Peripheral Nerves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 3(1), 193–212. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)31190-7](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31190-7)
- (30) GRIFFIN, J. W., & SHEIKH, K. (1999). Schwann Cell-Axon Interactions in Charcot-Marie Tooth Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 883(1), 77–90. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08571.x>
- (31) Hersalis Eldar, A., & Chapman, J. (2014). Guillain Barré syndrome and other immune mediated neuropathies: Diagnosis and classification. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.033>
- (32) Querol, L., & Lleixà, C. (2021). Novel Immunological and Therapeutic Insights in Guillain-Barré Syndrome and CIDP. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01117-3>
- (33) Li, J., Guan, R., & Pan, L. (2023). Mechanism of Schwann cells in diabetic peripheral neuropathy: A review. *Medicine*, 102(1), Artículo e32653. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000032653>
- (34) Nascimento, O. J. M. (2013). Leprosy neuropathy: clinical presentations. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 71(9B), 661–666. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20130146>
- (35) Carroll, S. L. (2011). Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. *Acta Neuropathologica*, 123(3), 321–348. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0928-6>
- (36) Walsh, M., & Kresak, J. (2016). Neurofibromatosis: A Review of NF1, NF2, and Schwannomatosis. *Journal of Pediatric Genetics*, 05(02), 098–104. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579766>
- (37) Helbing, D.-L., Schulz, A., & Morrison, H. (2020). Pathomechanisms in schwannoma development and progression. *Oncogene*, 39(32), 5421–5429. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1374-5>
- (38) T F. v. Recklinghausen. (1882). Translation of case reports in Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen. *Adv Neurol*. 1981; 29:259-75.

- (39) Peduto, C., Zanobio, M., Nigro, V., Perrotta, S., Piluso, G., & Santoro, C. (2023). Neurofibromatosis Type 1: Pediatric Aspects and Review of Genotype–Phenotype Correlations. *Cancers*, 15(4), 1217. <https://doi.org/10.3390/cancers15041217>
- (40) Amaravathi, A., Oblinger, J. L., Welling, D. B., Kinghorn, A. D., & Chang, L.-S. (2021). Neurofibromatosis: Molecular Pathogenesis and Natural Compounds as Potential Treatments. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.698192>
- (41) Carroll, S. L., & Ratner, N. (2008). How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1? *Glia*, 56(14), 1590–1605. <https://doi.org/10.1002/glia.20776>
- (42) Hernández Muela S, Navío Anaya M, De la Osa Langreo A, Gargallo P, Menor F, Zúñiga A. (2022) Neurofibromatosis tipo 1. *Protoc diagn ter pediatr*.;1:341-352
- (43) Brosseau, J.-P., Pichard, D. C., Legius, E. H., Wolkenstein, P., Lavker, R. M., Blakeley, J. O., Riccardi, V. M., Verma, S. K., Brownell, I., & Le, L. Q. (2018). The biology of cutaneous neurofibromas. *Neurology*, 91(2 Supplement 1), S14—S20. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000005788>.
- (44) Allaway, R. J., Gosline, S. J. C., La Rosa, S., Knight, P., Bakker, A., Guinney, J., & Le, L. Q. (2018). Cutaneous neurofibromas in the genomics era: current understanding and open questions. *British Journal of Cancer*, 118(12), 1539–1548. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0073-2>.
- (45) Fisher, M. J., Blakeley, J. O., Weiss, B. D., Dombi, E., Ahlawat, S., Akshintala, S., Belzberg, A. J., Bornhorst, M., Bredella, M. A., Cai, W., Ferner, R. E., Gross, A. M., Harris, G. KEVJ., Listernick, R., Ly, I., Martin, S., Mautner, V.-F., Salamon, J. M., Salerno, K. E., ... Widemann, B. C. (2022). Management of Neurofibromatosis Type 1-Associated Plexiform Neurofibromas. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac146>.
- (46) Boyd, K. P., Korf, B. R., & Theos, A. (2009). Neurofibromatosis type 1. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.12.051>
- (47) Plotkin, S., Messiaen, L., Wolkenstein, P., Pancza, P., Huson, S., Evans, G., & Legius, E. (2022). Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation (S27.002). *Neurology*, 98(18_supplement). https://doi.org/10.1212/wnl.98.18_supplement.3997.
- (48) Lemberg, K. M., Wang, J., & Pratilas, C. A. (2020). From Genes to -Omics: The Evolving Molecular Landscape of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. *Genes*, 11(6), 691. <https://doi.org/10.3390/genes11060691>.
- (49) Safonov A, Nomakuchi TT, Chao E, Horton C, Dolinsky JS, Yussuf A, Richardson M, Speare V, Li S, Bogus ZC, Bonanni M, Raper A, Kallish S, Ritchie MD; Regeneron Genetics Center; Penn Medicine BioBank; Nathanson KL, Drivas TG. (2023). A genotype-first approach identifies high incidence of *NF1* pathogenic variants with distinct disease associations. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.08.08.23293676>

- (50) Riva, M., Martorana, D., Uliana, V., Caleffi, E., Boschi, E., Garavelli, L., Ponti, G., Sangiorgi, L., Graziano, C., Bigoni, S., Rocchetti, L. M., Madeo, S., Soli, F., Grosso, E., Carli, D., Goldoni, M., Pisani, F. y Percesepe, A., (2021). Recurrent NF1 gene variants and their genotype/phenotype correlations in patients with Neurofibromatosis type I. *Genes, Chromosomes and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.22997>.
- (51) Jiang, C., McKay, R. M., Lee, S., Romo, C., Blakeley, J., Haniffa, M., Serra, E., Steensma, M., Largaespada, D., & Le, L. Q. (2023). Cutaneous Neurofibroma Heterogeneity: Factors that Influence Tumor Burden in Neurofibromatosis Type 1. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.12.027>
- (52) Hirbe, A. C., & Gutmann, D. H. (2014). Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *The Lancet Neurology*, 13(8), 834–843. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70063-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70063-8).
- (53) Koselugo (selumetinib) Información general sobre Koselugo y sobre los motivos por los que se autoriza su uso en la UE (2021). https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ipe/1211552001/IPE_1211552001.pdf
- (54) Casey, D. et al., (2021). FDA Approval Summary: Selumetinib for Plexiform Neurofibroma. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-20-5032>.
- (55) Armstrong, A. E., Belzberg, A. J., Crawford, J. R., Hirbe, A. C. y Wang, Z. J., (2023). Treatment decisions and the use of MEK inhibitors for children with neurofibromatosis type 1-related plexiform neurofibromas. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10996-y>.
- (56) Somatilaka, B. N., Sadek, A., McKay, R. M. y Le, L. Q., (2022). Malignant peripheral nerve sheath tumor: models, biology, and translation. *Oncogene* <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02290-1>.
- (57) Mohamad Farid, Elizabeth G. Demicco, Roberto Garcia, Linda Ahn, Pamela R. Merola, Angela Cioffi, Robert G. Maki, (2014). Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors, *The Oncologist*, Volume 19, Issue 2, Pages 193–201, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0328>
- (58) Knight, S. W. E., Knight, T. E., Santiago, T., Murphy, A. J., & Abdelhafeez, A. H. (2022). Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors—A Comprehensive Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Multidisciplinary Management. *Children*, 9(1), 38. <https://doi.org/10.3390/children9010038>.
- (59) Yao, C., Zhou, H., Dong, Y., Alhaskawi, A., Hasan Abdullah Ezzi, S., Wang, Z., Lai, J., Goutham Kota, V., Hasan Abdulla Hasan Abdulla, M., & Lu, H. (2023). Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors: Latest Concepts in Disease Pathogenesis and Clinical Management. *Cancers*, 15(4), 1077. <https://doi.org/10.3390/cancers15041077>
- (60) Guedes, F., Zager, E. L., Garozzo, D., Rasulic, L., & Socolovsky, M. (Eds.). (2021). *Diagnostic Assessment and Treatment of Peripheral Nerve Tumors*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-77633-6>

- (61) Carroll, S. L., & Stonecypher, M. S. (2005). Tumor Suppressor Mutations and Growth Factor Signaling in the Pathogenesis of NF1-Associated Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.1.1>
- (62) Pellerino, A., Verdijk, R. M., Nichelli, L., Andratschke, N. H., Idhah, A., & Goldbrunner, R. (2023). Diagnosis and Treatment of Peripheral and Cranial Nerve Tumors with Expert Recommendations: An European Network for Rare Cancers (EURACAN) Initiative. *Cancers*, 15(7), 1930. <https://doi.org/10.3390/cancers15071930>
- (63) Mohamad, T., Plante, C., & Brosseau, J.-P. (2021). Toward Understanding the Mechanisms of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8620. <https://doi.org/10.3390/ijms22168620>
- (64) Natalie Wu, L. M., & Lu, Q. R. (2019). Therapeutic targets for malignant peripheral nerve sheath tumors. *Future Neurology*, 14(1), FNL7. <https://doi.org/10.2217/fnl-2018-0026>
- (65) Prudner, B. C., Ball, T., Rathore, R., & Hirbe, A. C. (2019). Diagnosis and management of malignant peripheral nerve sheath tumors: Current practice and future perspectives. *Neuro-Oncology Advances*, 2(Supplement_1), i40—i49. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdz047>
- (66) Endo, M., Yamamoto, H., Setsu, N., Kohashi, K., Takahashi, Y., Ishii, T., Iida, K.-i., Matsumoto, Y., Hakozaki, M., Aoki, M., Iwasaki, H., Dobashi, Y., Nishiyama, K., Iwamoto, Y., & Oda, Y. (2012). Prognostic Significance of AKT/mTOR and MAPK Pathways and Antitumor Effect of mTOR Inhibitor in NF1-Related and Sporadic Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Clinical Cancer Research*, 19(2), 450–461. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-1067>
- (67) Thomson, C. S., Pundavela, J., Perrino, M. R., Coover, R. A., Choi, K., Chaney, K. E., Rizvi, T. A., Largaespada, D. A., & Ratner, N. (2021). WNT5A inhibition alters the malignant peripheral nerve sheath tumor microenvironment and enhances tumor growth. *Oncogene*, 40(24), 4229–4241. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01773-x>
- (68) Watson, A. L., Rahrmann, E. P., Moriarity, B. S., Choi, K., Conboy, C. B., Greeley, A. D., Halfond, A. L., Anderson, L. K., Wahl, B. R., Keng, V. W., Rizzardi, A. E., Forster, C. L., Collins, M. H., Sarver, A. L., Wallace, M. R., Schmechel, S. C., Ratner, N., & Largaespada, D. A. (2013). Canonical Wnt/β-catenin Signaling Drives Human Schwann Cell Transformation, Progression, and Tumor Maintenance. *Cancer Discovery*, 3(6), 674–689. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-13-0081>
- (69) Wu, L. M. N., Deng, Y., Wang, J., Zhao, C., Wang, J., Rao, R., Xu, L., Zhou, W., Choi, K., Rizvi, T. A., Remke, M., Rubin, J. B., Johnson, R. L., Carroll, T. J., Stemmer-Rachamimov, A. O., Wu, J., Zheng, Y., Xin, M., Ratner, N., & Lu, Q. R. (2018). Programming of Schwann Cells by Lats1/2-TAZ/YAP Signaling Drives Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 33(2), 292–308.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.005>

- (70) Jour, G., Andeen, N. K., al-Rohil, R., Aung, P. P., Mehrotra, M., Duose, D., Hoch, B., Argenyi, Z., Luthra, R., Wistuba, I. I., & Prieto, V. G. (2017). Novel enriched pathways in superficial malignant peripheral nerve sheath tumours and spindle/desmoplastic melanomas. *The Journal of Pathology*, 244(1), 97–106. <https://doi.org/10.1002/path.4996>
- (71) Rad, E., & Tee, A. R. (2016). Neurofibromatosis type 1: Fundamental insights into cell signalling and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 52, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.007>
- (72) Bradford, D., & Kim, A. (2015). Current Treatment Options for Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Current Treatment Options in Oncology*, 16(3). <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0328-6>
- (73) Hassan, A., Pestana, R. C., & Parkes, A. (2021). Systemic Options for Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Current Treatment Options in Oncology*, 22(4). <https://doi.org/10.1007/s11864-021-00830-7>
- (74) Home - ClinicalTrials.gov. (s.f.). Home - ClinicalTrials.gov. <https://classic.clinicaltrials.gov/>
- (75) Wang, W., Wei, C.-J., Cui, X.-W., Li, Y.-H., Gu, Y.-H., Gu, B., Li, Q.-F., & Wang, Z.-C. (2021). Impacts of NF1 Gene Mutations and Genetic Modifiers in Neurofibromatosis Type 1. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.704639>
- (76) Gerstberger, S., Hafner, M., & Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 829–845. <https://doi.org/10.1038/nrg3813>
- (77) Kelaini, S., Chan, C., Cornelius, V. A., & Margariti, A. (2021). RNA-Binding Proteins Hold Key Roles in Function, Dysfunction, and Disease. *Biology*, 10(5), 366. <https://doi.org/10.3390/biology10050366>
- (78) Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcárcel, J., & Hentze, M. W. (2020). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00302-y>
- (79) Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., & Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 327–341. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>
- (80) Corley, M., Burns, M. C., & Yeo, G. W. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular Cell*, 78(1), 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>
- (81) Ji, X., Zhou, Y., Pandit, S., Huang, J., Li, H., Lin, C. Y., Xiao, R., Burge, C. B., & Fu, X.-D. (2013). SR Proteins Collaborate with 7SK and Promoter-Associated Nascent RNA to Release Paused Polymerase. *Cell*, 153(4), 855–868. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.028>

- (82) Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*, 582(14), 1977–1986. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.03.004>
- (83) Li, W., Deng, X., & Chen, J. (2022). RNA-binding proteins in regulating mRNA stability and translation: roles and mechanisms in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.025>
- (84) Müller-McNicoll, M., & Neugebauer, K. M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA–protein complexes. *Nature Reviews Genetics*, <https://doi.org/10.1038/nrg3434>
- (85) Zhang, P., Wu, W., Ma, C., Du, C., Huang, Y., Xu, H., Li, C., Cheng, X., Hao, R., & Xu, Y. (2022). RNA-Binding Proteins in the Regulation of Adipogenesis and Adipose Function. *Cells*, 11(15), 2357. <https://doi.org/10.3390/cells11152357>
- (86) Connerty, P., Ahadi, A., & Hutvagner, G. (2015). RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 31. <https://doi.org/10.3390/ijms17010031>
- (87) Will, C. L., & Luhrmann, R. (2010). Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- (88) Marasco, L. E., & Kornblihtt, A. R. (2022). The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>
- (89) Liu, Q., Fang, L., & Wu, C. (2022). Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases. *Genes*, 13(3), 401. <https://doi.org/10.3390/genes13030401>
- (90) Ashworth, W., Stoney, P. N., & Yamamoto, T. (2019). States of decay: The systems biology of mRNA stability. *Current Opinion in Systems Biology*, 15, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2019.03.006>
- (91) Łabno, A., Tomecki, R., & Dziembowski, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 3125–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>
- (92) Tuck, A. C., Rankova, A., Arpat, A. B., Liechti, L. A., Hess, D., Iesmantavicius, V., Castelo-Szekely, V., Gatfield, D., & Bühler, M. (2020). Mammalian RNA Decay Pathways Are Highly Specialized and Widely Linked to Translation. *Molecular Cell*, 77(6), 1222–1236.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.007>
- (93) Mazzoni, C., & Falcone, C. (2011). mRNA stability and control of cell proliferation. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1461–1465. <https://doi.org/10.1042/bst0391461>
- (94) Yoshimi, A., & Abdel-Wahab, O. (2018). Targeting mRNA Decapping in AML. *Cancer Cell*, 33(3), 339–341. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.015>

- (95) Mazzone, C., & Falcone, C. (2011). mRNA stability and control of cell proliferation. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1461–1465. <https://doi.org/10.1042/bst0391461>
- (96) Seufert, L., Benzing, T., Ignarski, M., & Müller, R.-U. (2021). RNA-binding proteins and their role in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 18(3), 153–170. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00497-1>
- (97) Hashimoto, S., & Kishimoto, T. (2022). Roles of RNA-binding proteins in immune diseases and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.017>
- (98) Nag, S., Goswami, B., Das Mandal, S., & Ray, P. S. (2022). Cooperation and competition by RNA-binding proteins in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.023>
- (99) Wang, Z.-L., Li, B., Luo, Y.-X., Lin, Q., Liu, S.-R., Zhang, X.-Q., Zhou, H., Yang, J.-H., & Qu, L.-H. (2018). Comprehensive Genomic Characterization of RNA-Binding Proteins across Human Cancers. *Cell Reports*, 22(1), 286–298. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.035>
- (100) Zhang, B., Babu, K. R., Lim, C. Y., Kwok, Z. H., Li, J., Zhou, S., Yang, H., & Tay, Y. (2019). A comprehensive expression landscape of RNA-binding proteins (RBPs) across 16 human cancer types. *RNA Biology*, 17(2), 211–226. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1673657>
- (101) Mohibi, S., Chen, X., & Zhang, J. (2019). Cancer The “RBP”eutics – RNA-Binding Proteins as Therapeutic Targets for Cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.07>.
- (102) Mehta, M., Raguraman, R., Ramesh, R., & Munshi, A. (2022). RNA Binding Proteins (RBPs) and their role in DNA Damage and radiation response in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114569. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114569>
- (103) Castello, A., Horos, R., Strein, C., Fischer, B., Eichelbaum, K., Steinmetz, L. M., Krijgsvelde, J., & Hentze, M. W. (2013). System-wide identification of RNA-binding proteins by interactome capture. *Nature Protocols*, 8(3), 491–500. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.020>
- (104) Perez-Perri, J. I., Rogell, B., Schwarzl, T., Stein, F., Zhou, Y., Rettel, M., Brosig, A., & Hentze, M. W. (2018). Discovery of RNA-binding proteins and characterization of their dynamic responses by enhanced RNA interactome capture. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06557-8>
- (105) Castello, A., Fischer, B., Frese, C. K., Horos, R., Alleaume, A.-M., Foehr, S., Curk, T., Krijgsvelde, J., & Hentze, M. W. (2016). Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Molecular Cell*, 63(4), 696–710. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.029>

- (106) Mullari, M., Lyon, D., Jensen, L. J., & Nielsen, M. L. (2017). Specifying RNA-Binding Regions in Proteins by Peptide Cross-Linking and Affinity Purification. *Journal of Proteome Research*, 16(8), 2762–2772. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00042>
- (107) Julio, A. R., & Backus, K. M. (2021). New approaches to target RNA binding proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 62, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.12.006>
- (108) Huang, R., Han, M., Meng, L., & Chen, X. (2018). Capture and Identification of RNA-binding Proteins by Using Click Chemistry-assisted RNA-interactome Capture (CARIC) Strategy. *Journal of Visualized Experiments*, (140). <https://doi.org/10.3791/58580>
- (109) Huang, R., Han, M., Meng, L., & Chen, X. (2018b). Transcriptome-wide discovery of coding and noncoding RNA-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), E3879—E3887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718406115>
- (110) Bao, X., Guo, X., Yin, M., Tariq, M., Lai, Y., Kanwal, S., Zhou, J., Li, N., Lv, Y., Pulido-Quetglas, C., Wang, X., Ji, L., Khan, M. J., Zhu, X., Luo, Z., Shao, C., Lim, D.-H., Liu, X., Li, N., ... Esteban, M. A. (2018). Capturing the interactome of newly transcribed RNA. *Nature Methods*, 15(3), 213–220. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4595>
- (111) Queiroz, R. M. L., Smith, T., Villanueva, E., Marti-Solano, M., Monti, M., Pizzinga, M., Mirea, D.-M., Ramakrishna, M., Harvey, R. F., Dezi, V., Thomas, G. H., Willis, A. E., & Lilley, K. S. (2019). Comprehensive identification of RNA–protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (OOPS). *Nature Biotechnology*, 37(2), 169–178. <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0001-2>
- (112) Urdaneta, E. C., Vieira-Vieira, C. H., Hick, T., Wessels, H.-H., Figini, D., Moschall, R., Medenbach, J., Ohler, U., Granneman, S., Selbach, M., & Beckmann, B. M. (2019). Purification of cross-linked RNA-protein complexes by phenol-toluol extraction. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08942-3>
- (113) Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M. W., & Krijgsveld, J. (2019). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell*, 176(1-2), 391–403.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.004>
- (114) Kramer, K., Sachsenberg, T., Beckmann, B. M., Qamar, S., Boon, K.-L., Hentze, M. W., Kohlbacher, O., & Urlaub, H. (2014). Photo-cross-linking and high-resolution mass spectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins. *Nature Methods*, 11(10), 1064–1070. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3092>
- (115) Shchepachev, V., Bresson, S., Spanos, C., Petfalski, E., Fischer, L., Rappsilber, J., & Tollervy, D. (2019). Defining the RNA interactome by total RNA -associated protein purification. *Molecular Systems Biology*, 15(4). <https://doi.org/10.15252/msb.20188689>
- (116) LSM5. <https://www.genecard.s.org>. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LSM5>

- (117) LSM5 protein expression summary - The Human Protein Atlas. (s.f.). The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106355-LSM5>
- (118) Lekontseva, N. V., Stolboushkina, E. A., & Nikulin, A. D. (2021). Diversity of LSM Family Proteins: Similarities and Differences. *Biochemistry (Moscow)*, 86(S1), S38—S49. <https://doi.org/10.1134/s0006297921140042>
- (119) Montemayor, E. J., Virta, J. M., Hayes, S. M., Nomura, Y., Brow, D. A., & Butcher, S. E. (2020). Molecular basis for the distinct cellular functions of the Lsm1–7 and Lsm2–8 complexes. *RNA*, 26(10), 1400–1413. <https://doi.org/10.1261/rna.075879.120>
- (120) Tharun, S. (2009). Lsm1-7-Pat1 complex: A link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biology*, 6(3), 228–232. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8282>
- (121) He, F., & Jacobson, A. (2022). Eukaryotic mRNA decapping factors: molecular mechanisms and activity. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.16626>
- (122) Perea-Resa, C., Hernández-Verdeja, T., López-Cobollo, R., Castellano, M. d. M., & Salinas, J. (2012). LSM Proteins Provide Accurate Splicing and Decay of Selected Transcripts to Ensure Normal Arabidopsis Development. *The Plant Cell*, 24(12), 4930–4947. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103697>
- (123) Kufel, J., Bousquet-Antonelli, C., Beggs, J. D. & Tollervey, D. (2004) Nuclear pre-mRNA decapping and 5' degradation in yeast require the Lsm2-8p complex. *Mol. Cell Biol.* 24, 9646–9657 <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9646-9657.2004>
- (124) Garneau, N. L., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 113–126. 26. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>
- (125) Wilusz, C. J., & Wilusz, J. (2005). Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(12), 1031–1036. <https://doi.org/10.1038/nsmb1037>
- (126) Jungfleisch, J., Chowdhury, A., Alves-Rodrigues, I., Tharun, S., & Diez, J. (2015). The Lsm1-7-Pat1 complex promotes viral RNA translation and replication by differential mechanisms. *RNA*, 21(8), 1469–1479. <https://doi.org/10.1261/rna.052209.115>
- (127) Chen, P. (2024). Transcriptomics data integration and analysis to uncover hallmark genes in hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Translational Research*, 16(2), 637–653. <https://doi.org/10.62347/axoy3338>
- (128) Huang, M., Atreya, M. R., Holder, A., & Kamaleswaran, R. (2023). A machine learning model derived from analysis of time-course gene-expression datasets reveal temporally stable gene markers predictive of sepsis mortality. *Shock*. <https://doi.org/10.1097/shk.0000000000002226>
- (129) Zhuang, H., Chen, B., Tang, C., Chen, X., Tan, W., Yang, L., Xie, Z., Ma, X., Wang, Q., Zhang, C., Shang, C., & Chen, Y. (2022). Identification of LSM Family Members as Novel

Unfavorable Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.871771>

(130) Ullah, M. A., Alam, S., Farzana, M., Tayab Moin, A., Binte Sayed Prapty, C. N., Zohora, U. S., & Rahman, M. S. (2022). Prognostic and therapeutic value of LSM5 gene in human brain cancer Glioma: An omics database exploration approach. *Informatics in Medicine Unlocked*, 101114. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2022.101114>

(131) Liu, Q., Lian, Q., Song, Y., Yang, S., Jia, C., & Fang, J. (2023). Identification of LSM family members as potential chemoresistance predictive and therapeutic biomarkers for gastric cancer. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1119945>

(132) Kryczka, J., & Boncela, J. (2022). Integrated Bioinformatics Analysis of the Hub Genes Involved in Irinotecan Resistance in Colorectal Cancer. *Biomedicines*, 10(7), 1720. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071720>

(133) MEX3A. <https://www.genecards.org>. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEX3A>

(134) MEX3A protein expression summary <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000254726-MEX3A>

(135) Pereira, B., Le Borgne, M., Chartier, N. T., Billaud, M., & Almeida, R. (2013). MEX-3 proteins: recent insights on novel post-transcriptional regulators. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(10), 477–479. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.004>

(136) Jasinski-Bergner, S., Steven, A., & Seliger, B. (2020). The Role of the RNA-Binding Protein Family MEX-3 in Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5209. <https://doi.org/10.3390/ijms21155209>

(137) Li, F., Zhao, C., Diao, Y., Wang, Z., Peng, J., Yang, N., Qiu, C., Kong, B. and Li, Y. (2022). MEX3A promotes the malignant progression of ovarian cancer by regulating intron retention in TIMELESS. *Cell Death & Disease*, 13(6), pp.1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05000-7>

(138) Domingo-Muelas, A., Duart-Abadia, P., Morante-Redolat, J. M., Jordán-Pla, A., Belenguier, G., Fabra-Beser, J., Paniagua-Herranz, L., Pérez-Villalba, A., Álvarez-Varela, A., Barriga, F. M., Gil-Sanz, C., Ortega, F., Batlle, E., & Fariñas, I. (2023). Post-transcriptional control of a stemness signature by RNA-binding protein MEX3A regulates murine adult neurogenesis. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36054-6>

(139) Jiang, Z., Sun, Z., Hu, J., Li, D., Xu, X., Li, M., Feng, Z., Zeng, S., Mao, H., & Hu, C. (2022). Grass Carp Mex3A Promotes Ubiquitination and Degradation of RIG-I to Inhibit Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.909315>

(140) Panzeri, V., Manni, I., Capone, A., Naro, C., Sacconi, A., Di Agostino, S., Latouliere, L., Montori, A., Pillozzi, E., Piaggio, G., Capurso, G., & Sette, C. (2020). The RNA-binding protein

MEX3A is a prognostic factor and regulator of resistance to gemcitabine in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Oncology*. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12847>

(141) Qiu, Y., Meng, M., Cao, C., Zhang, J., Cheng, X., Huang, Y., Cao, H., Li, Y., Tian, D., Huang, Y., Peng, L., Hu, K., Zhang, Y., Liao, J., He, J., Wang, X., Lu, D., Lin, L., Bi, X., & Yin, D. (2022). RNA-binding protein MEX3A controls G1/S transition via regulating the RB/E2F pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 27, 241–255. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.026>

(142) Chen, W., Hu, L., Lu, X., Wang, X., Zhao, C., Guo, C., Li, X., Ding, Y., Zhao, H., Tong, D., Wang, L., & Huang, C. (2023). The RNA binding protein MEX3A promotes tumor progression of breast cancer by post-transcriptional regulation of IGFBP4. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-023-07028-5>

(143) Feng, G., Wang, P., Zhang, H., Cheng, S., Xing, Y., & Wang, Y. (2023). MEX3A induces the development of thyroid cancer via targeting CREB1. *Cell Biology International*. <https://doi.org/10.1002/cbin.12076>.

(144) Fang, S., Zheng, L., Chen, X., Guo, X., Ding, Y., Ma, J., Ding, J., Chen, W., Yang, Y., Chen, M., Zhao, Z., Tu, J., & Ji, J. (2023). MEX3A determines in vivo hepatocellular carcinoma progression and induces resistance to sorafenib in a Hippo-dependent way. *Hepatology International*. <https://doi.org/10.1007/s12072-023-10565-2>

(145) Bufalieri, F., Caimano, M., Lospinoso Severini, L., Basili, I., Paglia, F., Sampirisi, L., Loricchio, E., Petroni, M., Canettieri, G., Santoro, A., D'Angelo, L., Infante, P., & Di Marcotullio, L. (2020). The RNA-Binding Ubiquitin Ligase MEX3A Affects Glioblastoma Tumorigenesis by Inducing Ubiquitylation and Degradation of RIG-I. *Cancers*, 12(2), 321. <https://doi.org/10.3390/cancers12020321>

(146) Jiang, S., Meng, L., Chen, X., Liu, H., Zhang, J., Chen, F., Zheng, J., Liu, H., Wang, F., Hu, J., & Li, Z. (2020). MEX3A promotes triple negative breast cancer proliferation and migration via the PI3K/AKT signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 395(2), 112191. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112191>

(147) Wang, C.-K., Chen, T.-J., Tan, G. Y. T., Chang, F.-P., Sridharan, S., Yu, C.-H. A., Chang, Y.-H., Chen, Y.-J., Cheng, L.-T., & Hwang-Verslues, W. W. (2022). MEX3A mediates p53 degradation to suppress ferroptosis and facilitate ovarian cancer tumorigenesis. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-22-1159>

(148) Pemov, A., Li, H., Presley, W., Wallace, M. R., & Miller, D. T. (2019). Genetics of human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro-Oncology Advances*, 2(Supplement_1), i50—i61. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdz049>

(149) Miller, S. J., Jessen, W. J., Mehta, T., Hardiman, A., Sites, E., Kaiser, S., Jegga, A. G., Li, H., Upadhyaya, M., Giovannini, M., Muir, D., Wallace, M. R., Lopez, E., Serra, E., Nielsen, G. P., Lazaro, C., Stemmer-Rachamimov, A., Page, G., Aronow, B. J., & Ratner, N. (2009). Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and

survival gene. *EMBO Molecular Medicine*, 1(4), 236–248.
<https://doi.org/10.1002/emmm.200900027>

(150) Kolberg M, Høland M, Lind GE, Ågesen TH, Skotheim RI, Hall KS, Mandahl N, Smeland S, Mertens F, Davidson B, Lothe RA. (2015) Protein expression of BIRC5, TK1, and TOP2A in malignant peripheral nerve sheath tumours--A prognostic test after surgical resection. *Mol Oncol*. 2015 jun;9(6):1129-39. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.02.005>

(151) Jessen, W. J., Miller, S. J., Jousma, E., Wu, J., Rizvi, T. A., Brundage, M. E., Eaves, D., Widemann, B., Kim, M.-O., Dombi, E., Sabo, J., Hardiman Dudley, A., Niwa-Kawakita, M., Page, G. P., Giovannini, M., Aronow, B. J., Cripe, T. P., & Ratner, N. (2012). MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 340–347. <https://doi.org/10.1172/jci60578>

(152) Kochat, V., Raman, A. T., Landers, S. M., Tang, M., Schulz, J., Terranova, C., Landry, J. P., Bhalla, A. D., Beird, H. C., Wu, C.-C., Jiang, Y., Mao, X., Lazcano, R., Gite, S., Ingram, D. R., Yi, M., Zhang, J., Keung, E. Z., Scally, C. P., ... Torres, K. E. (2021). Enhancer reprogramming in PRC2-deficient malignant peripheral nerve sheath tumors induces a targetable de-differentiated state. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02341-z>

(153) Wu, L. M. N., Zhang, F., Rao, R., Adam, M., Pollard, K., Szabo, S., Liu, X., Belcher, K. A., Luo, Z., Ogurek, S., Reilly, C., Zhou, X., Zhang, L., Rubin, J., Chang, L.-s., Xin, M., Yu, J., Suva, M., Pratilas, C. A., ... Lu, Q. R. (2022). Single-cell multiomics identifies clinically relevant mesenchymal stem-like cells and key regulators for MPNST malignancy. *Science Advances*, 8(44). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo5442>

(154) Ji, X., Humenik, J., Yang, D., & Liebhaber, S. A. (2017). PolyC-binding proteins enhance expression of the CDK2 cell cycle regulatory protein via alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 46(4), 2030–2044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1255>

(155) Beauchemin, N., & Arabzadeh, A. (2013). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3-4), 643–671. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9444-6>

(156) HsaEX0013676 @ hg38 - VastDB. (s.f.). VastDB.
<https://vastdb.crg.eu/event/HsaEX0013676@hg38>

(157) Qiu, L., Sun, Y., Ning, H., Chen, G., Zhao, W., & Gao, Y. (2024). The scaffold protein AXIN1: gene ontology, signal network, and physiological function. *Cell Communication and Signaling*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01482-4>

(158) Zhang, Q.-q., Miao, Y.-s., Hu, J.-y., Liu, R.-x., Hu, Y.-x., & Wang, F. (2024). The truncated AXIN1 isoform promotes hepatocellular carcinoma metastasis through SRSF9-mediated exon 9 skipping. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-024-05012-1>

- (159) Kufel, J., Allmang, C., Petfalski, E., Beggs, J., & Tollervey, D. (2002). Lsm Proteins Are Required for Normal Processing and Stability of Ribosomal RNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2147–2156. <https://doi.org/10.1074/jbc.m208856200>
- (160) Tamura, R. (2021). Current Understanding of Neurofibromatosis Type 1, 2, and Schwannomatosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5850. <https://doi.org/10.3390/ijms22115850>
- (161) Mestre-Farràs, N., Guerrero, S., Bley, N., Rivero, E., Coll, O., Borràs, E., Sabidó, E., Indacochea, A., Casillas-Serra, C., Järvelin, A. I., Oliva, B., Castello, A., Hüttelmaier, S., & Gebauer, F. (2022). Melanoma RBPome identification reveals PDIA6 as an unconventional RNA-binding protein involved in metastasis. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac605>
- (162) Azman, M. S., Alard, E. L., Dodel, M., Capraro, F., Faraway, R., Dermitt, M., Fan, W., Chakraborty, A., Ule, J., & Mardakheh, F. K. (2023). An ERK1/2-driven RNA-binding switch in nucleolin drives ribosome biogenesis and pancreatic tumorigenesis downstream of RAS oncogene. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/embj.2022110902>
- (163) Palomo-Irigoyen, M., Pérez-Andrés, E., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Barreira-Manrique, A., Tamayo-Caro, M., Vila-Vecilla, L., Moreno-Cugnon, L., Beitia, N., Medrano, D., Fernández-Ramos, D., Lozano, J. J., Okawa, S., Lavín, J. L., Martín-Martín, N., Sutherland, J. D., de Juan, V. G., Gonzalez-Lopez, M., Macías-Cámara, N., Mosén-Ansorena, D., ... Woodhoo, A. (2020). HuR/ELAVL1 drives malignant peripheral nerve sheath tumor growth and metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3848–3864. <https://doi.org/10.1172/jci130379RIBO>
- (164) Little, E. C., Camp, E. R., Wang, C., Watson, P. M., Watson, D. K., & Cole, D. J. (2016). The CaSm (LSm1) oncogene promotes transformation, chemoresistance and metastasis of pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 5(1), Artículo e182-e182. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.45>
- (165) Tzeng, Y.-D. T., Hsiao, J.-H., Chu, P.-Y., Tseng, L.-M., Hou, M.-F., Tsang, Y.-L., Shao, A.-N., Sheu, J. J.-C., & Li, C.-J. (2023). The role of LSM1 in breast cancer: Shaping metabolism and tumor-associated macrophage infiltration. *Pharmacological Research*, 198, 107008. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.107008>
- (166) Takahashi, S., Suzuki, S., Inaguma, S., Cho, Y.-M., Ikeda, Y., Hayashi, N., Inoue, T., Sugimura, Y., Nishiyama, N., Fujita, T., Ushijima, T., & Shirai, T. (2002). Down-regulation of Lsm1 is involved in human prostate cancer progression. *British Journal of Cancer*, 86(6), 940–946. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600163>
- (167) Lyng, H., Brøvig, R. S., Svendsrud, D. H., Holm, R., Kaalhus, O., Knutstad, K., Oksefjell, H., Sundfør, K., Kristensen, G. B., & Stokke, T. (2006). Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-268>
- (168) Tomei, S., Marchetti, I., Zavaglia, K., Lessi, F., Apollo, A., Aretini, P., Di Coscio, G., Bevilacqua, G., & Mazzanti, C. (2012). A molecular computational model improves the

preoperative diagnosis of thyroid nodules. *BMC Cancer*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-396>

(169) Chen, L., Lin, Y.-h., Liu, G.-q., Huang, J.-e., Wei, W., Yang, Z.-h., Hu, Y.-m., Xie, J.-h., & Yu, H.-z. (2022). Clinical Significance and Potential Role of LSM4 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma: An Integrated Analysis Based on Multiple Databases. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.804916>

(170) MAZZONI, C., MANCINI, P., MADEO, F., PALERMO, V., & FALCONE, C. (2003). A mutant in the essential gene shows phenotypic markers of apoptosis. *FEMS Yeast Research*, 4(1), 29–35. [https://doi.org/10.1016/s1567-1356\(03\)00151-x](https://doi.org/10.1016/s1567-1356(03)00151-x)

(171) Peng, Q., Zhou, Y., Oyang, L., Wu, N., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Wang, Y., Sheng, X., Ma, J., & Liao, Q. (2022). Impacts and mechanisms of alternative mRNA splicing in cancer metabolism, immune response, and therapeutics. *Molecular Therapy*, 30(3), 1018–1035. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.11.010>

(172) Carrasco-López, C., Hernández-Verdeja, T., Perea-Resca, C., Abia, D., Catalá, R., & Salinas, J. (2017). Environment-dependent regulation of spliceosome activity by the LSM2-8 complex in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 45(12), 7416–7431. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx375>

(173) Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Futahashi, Y., & Komano, J. (2012). Regulation of cyclin T1 expression and function by an alternative splice variant that skips exon 7 and contains a premature termination codon. *Gene*, 505(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.006>

(174) Loll-Krippléber, R., & Brown, G. W. (2017). P-body proteins regulate transcriptional rewiring to promote DNA replication stress resistance. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00632-2>

(175) Mohs, R. C., & Greig, N. H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(4), 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005>

(176) Solares, I., Vinal, D., & Morales-Conejo, M. (2022). Protocolo de diagnóstico y seguimiento de pacientes adultos con neurofibromatosis tipo 1 en una unidad de referencia española. *Revista Clínica Española*. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2022.02.001>

(177) Ahlawat, S., Ly, K. I., Fayad, L. M., Fisher, M. J., Lessing, A. J., Berg, D. J., Salamon, J. M., Mautner, V.-F., Babovic-Vuksanovic, D., Dombi, E., Harris, G., Plotkin, S. R., & Blakeley, J. (2021). Imaging Evaluation of Plexiform Neurofibromas in Neurofibromatosis Type 1. *Neurology*, 97(7 Supplement 1), S111—S119. <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000012437>

(178) Yang, D., Jiao, Y., Li, Y., & Fang, X. (2020). Clinical characteristics and prognostic value of MEX3A mRNA in liver cancer. *PeerJ*, 8, Artículo e8252. <https://doi.org/10.7717/peerj.8252>

9. ANEXO - PERMISOS EDITORIALES DE LAS FIGURAS

Todas las figuras representadas en la presente tesis doctoral son de elaboración propia, a excepción de las siguientes:

Figuras 8 y 9, referencias 116 y 123, respectivamente.

(116) LSM5. <https://www.genecards.org>. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LSM5>

(133) MEX3A. <https://www.genecards.org>. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEX3A>

Licencia de uso libre:

› **Is the service provided by GeneCards free?**

The service is provided free to academic non-profit institutions. All other users require a Commercial License from [LifeMap Sciences, Inc.](#)
Unauthorized usage of this service is in breach of the terms and conditions of this web site, and may cause the user to incur fees for usage.

([GeneCards Frequently Asked Questions](#))

AGRADECIMIENTOS

Cuando llegué, el laboratorio en Santiago solo tenía 8 meses, he podido ver desde casi el principio cómo ha crecido y evolucionado. Durante estos tres años he aprendido muchas cosas que me llevo para siempre.

Es difícil resumir todos los aprendizajes que me llevo en un solo párrafo, pero quiero destacar alguno de ellos. He aprendido a confiar en las personas que tengo alrededor, a no rendirme rápidamente, a luchar día a día con las frustraciones que la ciencia conlleva y a saber gestionarme mi tiempo y mi trabajo. A confiar más en mí y a expresar mis ideas sin miedo. He aprendido que las cosas importantes no están en esta tesis, pero sí han formado parte del tiempo que he estado haciéndola. Supongo que nadie llega a tener la tesis con la que sueña, pero puedo decir que yo he dado todo lo que he podido por tenerla. Gracias a todos los que habéis estado de una forma u otra ayudando a hacer/escribir esta tesis.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ashwin y Marta la oportunidad que me han dado para poder realizar la tesis en su laboratorio. Sé que no es fácil empezar un laboratorio completamente nuevo, así que gracias por confiar en mí para ser una de las primeras tesis que salen de este. También por ponerme siempre facilidades cuando las cosas fuera no me iban bien.

Agradecer a cada uno de los miembros del P1L8 (ahora también P1L9) por haber sido esenciales en mi paso por Santiago: Jorge, Sergio, Sofía, Adrián, Héctor, Eva, Yuquin, Marina, LLuis, María, Izaskun, Carlos. El buen ambiente y las risas nunca han faltado y han hecho que las jornadas largas se hicieran más llevaderas. Gracias a Adri, por trabajar codo a codo conmigo y ayudarme a poder presentar esta tesis, gracias por aguantar mis días malos y por ser siempre el mejor compi de equipo. A Cris, por ser mi postdoc particular cuando estaba perdida y darme un empujón cuando más lo necesitaba. A Albuchi, por ser mi primera compi de bancada y escuchar mis dramas siempre, entenderme y apoyarme. A Albertito, por ser esa persona que quiero matar a veces pero que no puedo estar un día sin él en el laboratorio. A Aroa, por ser capaz de entenderme cuando ni yo me entiendo y darme otra versión de la vida siempre. A sarru, porque sin tu energía constante no hubiera sido lo mismo. A Joan, por ser mi compi Xunta desde el primer día, gracias por estos 3 años sin reproches. A Ceci, por ser mi compañera de todo desde el principio, por aguantar mis días malos y compartir los buenos. A Paulita, amor de sobrinas a primera vista, gracias por no dejarme caer, por poner alegría al laboratorio y por darme mis momentos preferidos de estos 3 años, por siempre haberme dicho las cosas claras, aunque no fueran buenas y por no dejar que caiga nunca. Al resto, que no es del P1L8, pero como si lo fuera. A Valentina por el cariño que siempre trasmite. A Sara, por ser esa persona que siempre está. A Leo, por tener siempre una palabra buena para mí, y un rato para hablar de nuestras cosas. A Vera, Lucía, Adriana, por formar también parte de esto. De verdad, gracias a todos por ser mi familia durante estos tres años, cuidarme cuando me lesioné la rodilla y tirar de mí en mis peores momentos. Os llevo para siempre.

Agradecer también a todo el personal del CIMUS por su predisposición a ayudar siempre y darnos tantas facilidades. En especial a Pili, que alegra el día a cualquiera con su buen humor y a Lucía, por ayudarme en todo lo que ha podido y más.

Al laboratorio de Alfredo Castello en el CVR de Glasgow, por acogerme tan bien durante mi corta estancia. Gracias a Azman, Zaida y demás miembros del grupo por enseñarme tanto. En especial Juana Díez y su familia, que me acogieron como si fuera parte de ella e hicieron que la experiencia fuera inolvidable, no lo voy a olvidar nunca.

Me gustaría dar las gracias a mi familia, a mis hermanos Mario y Yaiza por siempre creer en mí. A mis padres por haber hecho todo esto posible. En especial a mi madre, que ha sido siempre mi referente de lucha constante. A mi abuela Mauricia, a la que siempre la llevo conmigo, y que siempre estuvo muy orgullosa de mí. A mis sobrinos Leire y Gohan, por darme cariño y fuerzas para seguir adelante siempre. Y al resto de mi familia por enseñarme tanto, a Marco, Rosi, Rafa, Isel, Izan, Claudia, Vero, Alba, Mari, Gabriel...

A José por ser el mayor regalo que me llevo de esta etapa, por aguantar mis malos ratos y alegrarse más que yo de cada pequeño paso que doy. Por cuidarme, no dejar que esté sola y levantarme en cada bajón. Por creer en mí más que nadie y recordármelo todos los días. Por confiar siempre y apoyarme en todas las decisiones que tomo. Media tesis es tuya.

A mi familia de A Coruña, en especial a José, Isabel y Ana. Por acogerme tan bien, apoyarme siempre y rescatarme de Santiago en mis peores ratos. También al resto de la familia Puga y Pajarrón, por hacerme sentir parte de la familia.

A mis tres mejores amigas, Sandra, Susana y Kiara, que estando lejos han conseguido que las sienta cerca y que confían y me apoyan siempre. A mis amigos de siempre: Alberto, Begoña, Carol, Celia, Jorge, Mario, Niki, Lorenzo, Mario, Siana y Víctor por hacer que cada vuelta a casa fuera como si no me hubiera ido nunca.

A las renfistas, que, aunque estén lejos siempre están. En especial a Marta, que es uno de mis pilares, que suerte tengo de haber compartido un poco de Galicia contigo.

Al Cisneros y a todas las personas que forman parte de él, por enseñarme a no rendirme jamás. Gracias Ana, Pili, Inás, Elenita, Pilar, Cris, Marga, Lila, Alba, Inma, Mai, Álvaro, Ichi, Inés...gracias por formar parte de mi vida y por recibirme siempre con los brazos abiertos.

Gracias a toda la gente que formáis parte de mi vida, soy lo que soy gracias a todos vosotros. No me canso de aprender de cada uno de vosotros.

Esta tesis propone que las RBPs actúan como amplificadores de mutaciones oncogénicas en MPNSTs coordinando complejas redes moleculares para impulsar el desarrollo tumoral y la metástasis, y que podrían ser excelentes dianas para el tratamiento o el diagnóstico. Descubrí que la RBP LSM5 estaba altamente expresada en los MPNST, lo que se relacionaba con un peor pronóstico. El silenciamiento de LSM5 condujo a una regulación de la proliferación y la supervivencia, y esto estaba relacionado con su capacidad para regular el splicing y la degradación del ARNm. Además, utilizando la captura del ARN-interactoma, pude identificar el repertorio de RBPs activas en líneas celulares de MPNST, entre las que seleccioné y estudié más a fondo el papel funcional de MEX3A. En conclusión, las RBPs desempeñan un papel crucial en el MPNST.