



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: PINTO DÍEZ, CELIA
D.N.I./PASAPORTE: ****4619E

PROGRAMA DE DOCTORADO: D425 SEÑALIZACIÓN CELULAR
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA DE SISTEMAS
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 15/03/19, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de M. ELENA MARTÍN PALMA // VICTOR M. GONZÁLEZ MUÑOZ.

Sobre el siguiente tema: EFECTO ANTITUMORAL DE UN APTÁMERO FRENTE A LA PROTEÍNA QUINASA MNK1 B EN CÁNCER DE MAMA

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 15 de MARZO de 2019

EL PRESIDENTE

Fdo.: INES DIAZ-LAVIADA MARTURET

EL SECRETARIO

Fdo.: CARLOS BRIONES LLORENTE

EL VOCAL

Fdo.: JULIE EARL

Con fecha 25 de marzo de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: PINTO DÍEZ, CELIA

La Secretaria de la Comisión Delegada

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

NINGUNA.



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 25 de marzo, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *PINTO DÍEZ, CELIA*, el día 15 de marzo de 2019, titulada *EFFECTO ANTITUMORAL DE UN APTÁMERO FRENTE A LA PROTEÍNA QUINASA MNK1 B EN CÁNCER DE MAMA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 25 de marzo de 2019
EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA

F. Javier de la Mata de la Mata



Copia por e-mail a:

Doctorando: PINTO DÍEZ, CELIA

Secretario del Tribunal: CARLOS BRIONES LLORENTE

Directores de Tesis: M. ELENA MARTÍN PALMA // VICTOR M. GONZÁLEZ MUÑOZ



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario



**Programa de Doctorado en
Señalización Celular**

Efecto antitumoral de un aptámero frente a la proteína quinasa MNK1b en cáncer de mama

**Tesis doctoral presentada por
Celia Pinto Díez**

Directores:

Dra. María Elena Martín Palma

Dr. Víctor Manuel González Muñoz

Alcalá de Henares, 2019

ALBERTO DOMINGO GALÁN,

COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Efecto antitumoral de un aptámero frente a la proteína quinasa MNK1b en cáncer de mama”**, presentada por D^a. Celia Pinto Díez, bajo la dirección de los Dres D^a. M^a. Elena Martín Palma y D. Víctor Manuel González Muñoz, ha sido realizada en el IRYCIS- Hospital Ramón y Cajal, reuniendo los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. La Comisión Académica ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Y para que así conste surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 30 de enero de 2019.



Fdo. Alberto Domingo Galán



Hospital Universitario
Ramón y Cajal

Comunidad de Madrid



Dña. María Elena Martín Palma y Don Víctor Manuel González Muñoz,
Investigadores de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario
Ramón y Cajal (FIBio-HRC) en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación
del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS)

INFORMAN:

Que el trabajo "**Efecto antitumoral de un aptámero frente a la proteína quinasa MNK1b en cáncer de mama**", ha sido realizado por Doña Celia Pinto Diez en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, bajo su dirección y cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Madrid a 25 de enero del 2019

Fdo.: Dra. María Elena Martín

Fdo: Dr. Víctor Manuel González

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Su desarrollo ha sido posible gracias a la financiación del proyecto "Papel de Mnk1b en la tumorigénesis de tumores de mama" (Fundación Mutua Madrileña) y a dos contratos asociados a los proyectos "Desarrollo y validación clínica de un Kit para diagnosticar la evolución de la masa absortiva intestinal, empleando tecnología innovadora basada en aptámeros selectivos de la proteína APO A-IV" y "Desarrollo y validación de una plataforma basada en aptámeros para la detección y genotipado del virus de la hepatitis C" (Ministerio de Economía y Competitividad).

El trabajo desarrollado durante estos años dado lugar a la publicación de dos artículos directamente relacionados con esta tesis:

Pinto-Diez, C., E. M. Garcia-Recio, M. I. Perez-Morgado, *et al.* (2018). "Increased expression of MNK1b, the spliced isoform of MNK1, predicts poor prognosis and is associated with triple-negative breast cancer." *Oncotarget* **9**(17): 13501-13516.

Garcia-Recio, E. M., C. Pinto-Diez, M. I. Perez-Morgado, *et al.* (2016). "Characterization of MNK1b DNA Aptamers That Inhibit Proliferation in MDA-MB231 Breast Cancer Cells." *Mol Ther Nucleic Acids* **5**: e275.

Parte de los resultados de esta tesis han sido patentados: EP18382888.8. APTÁMEROS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER, España. 03/12/2018. Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (FIBIOHRC).

A Nacho y a Nora

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para dar las gracias a todos los que habéis hecho posible la realización de esta tesis:

A mis directores de tesis, la Dra. María Elena Martín y el Dr. Víctor Manuel González, a los que agradezco no sólo haberme dado la oportunidad de entrar en su laboratorio, los conocimientos y la dedicación, sino también la confianza y el apoyo que me han dado hasta el último momento. Me llevo ciencia y amistad a partes iguales.

Al Dr. Carlos González del Instituto de Química-Física Rocasolano del CSIC, por todo el conocimiento y el trabajo realizado en el diseño del aptámero.

A la Dra. Rebeca Busto, por la inestimable ayuda que me ha prestado en todo lo que hiciera falta, tanto si necesitaba material como si estaba perdida con un protocolo.

A la Dra. Laura García Bermejo y a toda la gente de su laboratorio por echarme una mano con todo lo que haya necesitado.

A todos los compañeros de laboratorio, los que han estado y los que están, ya sea de los departamentos de Bioquímica, de Neurobiología o de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, como del CAB o de centros en los que he realizado rotaciones. Me gustaría agradecer especialmente a los que no considero compañeros sino buenos amigos: Esther, Patri, Ángel y Rebeca. Y por supuesto a mi segunda familia: Nacho, Gero, Marta, Miriam, Maribel, Rebeca, Valerio, Silvia, Ana G, Ana S, Raquel, Cristina y al grupo del Dr. Alberto Alcázar, Merche, Emma y Alejandro, por todo lo que me habéis ayudado y porque hacéis que el trabajo sea agradable, fácil y divertido.

A mis amigos y familia, porque, aunque muchos ni siquiera entienden muy bien lo que hago, siempre están para lo que haga falta.

Y por último a Nacho y a Nora, porque sin ellos yo no estaría aquí y no sería lo que soy.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
1. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA	15
2. MNKs: PROTEÍNAS QUINASAS QUE INTERACCIONAN CON MAPK	17
2.1 Familia de MNKs	17
2.2 Sustratos de las MNKs	21
a) Factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E)	21
b) Factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G)	22
c) Ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 humana (hnRNP A1)	22
d) Factor de <i>splicing</i> asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF)	23
e) Fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA ₂)	23
f) Sprouty 2 (Spry2)	23
2.3 MNKs y cáncer	24
2.4 Inhibidores de MNK como agentes antitumorales en cáncer	28
3. APTÁMEROS COMO HERRAMIENTAS TERAPÉUTICAS	30
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
MATERIALES	43
Reactivos químicos generales y material de laboratorio	43
MÉTODOS	47
1. CULTIVOS CELULARES	47
2. TRANSFECCIÓN Y PROCESAMIENTO CELULAR	48
2.1. TRANSFECCIÓN	48
2.1.1 Transfección con lipofectamina	49
2.1.2 Transfección con in vivo-jetPEI®	49
2.2 PROCESAMIENTO CELULAR	49
2.2.1 Obtención de proteína	49
2.2.2 Obtención de RNA	50
3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	50
3.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	50
3.2. ISOELECTROENFOQUE HORIZONTAL (IEF)	50
3.3. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN	51
4. ENSAYOS	52

4.1 Determinación de la estabilidad de los aptámeros.....	52
4.1.1 Ensayos de DNAsa I.....	52
4.1.2 Ensayos de estabilidad en plasma.....	53
4.2 Determinación de la viabilidad por exclusión de azul tripán.....	53
4.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR. DETERMINACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LAS SALES DE TETRAZOLIO (MTT).....	53
4.4 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR POR LDH.....	54
4.5 ENSAYOS DE ANEXINA.....	54
4.6 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS.....	55
4.7 ENSAYOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN.....	56
4.8 ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR POR HENDIDURA O HERIDA (<i>Wound healing assay</i>).....	57
4.9 ENSAYOS DE CICLO CELULAR.....	57
4.10 ZIMOGRAMA.....	57
4.11 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNAs.....	58
5. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS APTÁMEROS.....	59
5.1 Determinación de la estructura por RMN.....	59
5.2 Dicroísmo circular.....	59
6. ELONA.....	59
7. MODELOS ANIMALES.....	60
7.1. Ensayos en ratones con tumores de mama ortotópicos.....	60
7.2. Inmunohistoquímica en tumores de mama ortotópicos.....	60
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
RESULTADOS.....	63
1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE apMNK2FT.....	65
1.1 Caracterización estructural de apMNK2FT.....	65
1.2 Caracterización de la interacción de apMNK2FT con MNK1 mediante ELONA.....	67
1.3 Estudio de la estabilidad del aptámero apMNK2FT en presencia de DNAsa.....	69
1.4 Efecto de apMNK2FT sobre la proliferación, formación de colonias y migración.	69
2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE apMNKQ2.....	71
2.1 Obtención del aptámero optimizado apMNKQ2.....	71
2.2 Caracterización de la interacción de apMNKQ2 con MNK1a/b.....	75
2.3 Estudio de la estabilidad del aptámero apMNKQ2 en presencia de DNAsa y plasma.	77
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT/mTOR y ERK/MNK1 EN LAS LÍNEAS TUMORALES DE MAMA.....	78
3.1 Características moleculares de las líneas tumorales.....	78

3.2 Expresión de MNK1a, MNK1b y fosforilación de eIF4E	80
3.3 Estudio de las vías PI3K/AKT/mTOR y MAP quinasas	83
4. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LA TUMOROGÉNESIS EN LAS CÉLULAS DE MAMA	85
4.1. Estudio de la actividad de apMNKQ2 sin el uso de transfectante	85
4.2. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la proliferación y apoptosis celulares.....	86
4.3 Efecto de apMNKQ2 sobre la actividad clonogénica.	91
5. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LA ACTIVIDAD METASTÁSICA DE LAS CÉLULAS DE MAMA	92
5.1 Efecto de apMNKQ2 en la migración e invasión celulares.....	92
5.2 Efecto de apMNKQ2 en la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).....	94
5.3 Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de eIF4E y de MCL1	96
6. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE apMNKQ2 <i>IN VIVO</i> EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE-NEGATIVO.	97
DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	113
BIBLIOGRAFÍA.....	117

Índice de figuras y tablas

Figura 1	Esquema general de las MNKs humanas	19
Figura 2	Mecanismo de acción de MNK	27
Figura 3	Esquema de la tecnología SELEX	31
Figura 4	Estructuras secundarias y G-quadruplex	65
Figura 5	Análisis estructural de apMNK2FT	66
Figura 6	Estudio estructural mediante difracción circular	67
Figura 7	Caracterización de la interacción del aptámero apMNK2FT con MNK1 mediante ELONA	68
Figura 8	Estabilidad de apMNK2FT en presencia de endonucleasa	69
Figura 9	Efecto de apMNK2FT sobre la actividad MTT de las células MCF7 y MDA-MB-231	70
Figura 10	Estudio del efecto del aptámero sobre la capacidad clonogénica y la migración en las células MCF7 y MDA-MB-231	71
Figura 11	Optimización del aptámero apMNK2FT	72
Figura 12	Análisis estructural de los nuevos aptámeros	73
Figura 13	Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT de las células MCF7 y MDA-MB-231	74
Figura 14	Modelo estructural propuesto del aptámero apMNKQ2	75
Figura 15	Caracterización de la interacción del aptámero apMNKQ2 con MNK1 mediante ELONA	76
Figura 16	Caracterización de la interacción del aptámero apMNKQ2 con MNK1 mediante Apta-western	77
Figura 17	Estabilidad de apMNKQ2	78
Figura 18	Comparación entre la clasificación de las líneas celulares de mama y los tumores	80
Figura 19	Niveles de MNK1a y MNK1b en líneas celulares de mama	81
Figura 20	Expresión y fosforilación de eIF4E en líneas celulares de mama	82
Figura 21	Esquema de las cascadas de señalización celular y estudio de las mismas en líneas celulares de mama	84
Figura 22	Estudio de la entrada del aptámero apMNKQ2 en las células	85
Figura 23	Medida de la actividad MTT en las líneas de mama tras la adición directa de apMNKQ2	86
Figura 24	Efecto del aptámero apMNKQ2 sobre la actividad MTT y LDH de las líneas celulares de mama	87
Figura 25	Análisis de la viabilidad celular por exclusión de azul tripán	88

Figura 26	Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre el ciclo celular de las líneas de mama	88
Figura 27	Análisis de la fase subG1 en las líneas celulares de mama	89
Figura 28	Análisis del efecto del aptámero sobre la apoptosis con Anexina V en las líneas celulares de mama	90
Figura 29	Efecto de apMNKQ2 sobre la actividad de la caspasa 3 mediante los sustratos PARP y α -espectrina en las líneas celulares de mama	91
Figura 30	Efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad clonogénica de las células	92
Figura 31	Efecto del aptámero apMNKQ2 en la migración y la invasión de las líneas celulares de mama	93
Figura 32	Efecto del aptámero apMNKQ2 sobre la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9	94
Figura 33	Expresión de marcadores de TEM en las líneas celulares de mama	95
Figura 34	Efecto del aptámero sobre los niveles de expresión de marcadores de TEM en las líneas celulares de mama	95
Figura 35	Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de eIF4E y los niveles de MCL1	96
Figura 36	Medida de la actividad MTT en las líneas de mama tras la transfección con in vivo-jetPEI o lipofectamina 2000	97
Figura 37	Eficacia in vivo de apMNKQ2 en un modelo de ratón con xenoinjerto ortotópico de células MDA-MB-231	98
Figura 38	Análisis de la proliferación celular	98
Figura 39	Efecto de apMNKQ2 en la expresión proteica	99
Figura 40	Estructura <i>G-quadruplex</i>	104
Figura 41	Mecanismos en los que MNK1 está implicada	110
Tabla I	Clasificación molecular de los tumores de mama y sus características	17
Tabla II	Características y ventajas de los aptámeros respecto a los anticuerpos	33
Tabla III	Ensayos clínicos de aptámeros terapéuticos recientes y actuales	35
Tabla IV	Relación de oligonucleótidos utilizados en qPCR	44
Tabla V	Relación de anticuerpos primarios empleados en este trabajo	45
Tabla VI	Relación de anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo	46
Tabla VII	Relación de aptámeros empleados en este trabajo	46
Tabla VIII	Clasificación y características de las líneas celulares de mama utilizadas	79

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

4E-BPs	Proteínas de unión a eIF4E
Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'-azino-bis
AKT o PKB	Proteína quinasa B
ARE	Secuencia rica en AU
BSA	Albúmina de suero bovino
Cap	Ácido 7-metilguanílico en el extremo 5' del mRNA
cDNA	DNA copia
cPLA2	Fosfolipasa A2 citoplasmática
CRM1	Proteína de mantenimiento del cromosoma 1 o Exportina 1
DC	Dicroísmo circular
DDB1	Proteína específica de unión a DNA dañado 1
DEPTOR	Proteína de interacción con mTOR con dominio DEP
DMEM	Medio de cultivo <i>Dulbecco modified Eagles minimal essential medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
eIF	Factor de iniciación eucariota
ELONA	Ensayo enzimático en placa con aptámeros
ER	Receptor de estrógenos
ERK1/2	Quinasa regulada a través de señalización extracelular
FBS	Suero bovino fetal

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSP-1	Proteína específica de fibroblasto 1
GI50	Inhibición del crecimiento del 50%
GST	Glutación S-transferasa
HDM2	Proteína <i>Human Double minute 2</i>
HER	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
IEF	Isoelectroenfoque
IL	Interleuquina
IP	Ioduro de propidio
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCL1	Proteína de células de leucemia mieloide 1
MK	Proteína quinasa activada por MAPK
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
MMP	Metaloproteinasa
MNK1/2	Proteína quinasa de interacción con MAPK
MNK1bSR	Región específica de MNK1b
mRNA	RNA mensajero
MSK	Proteína quinasa activada por mitógenos y estrés
mTOR	Proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos
mTORC1	Complejo 1 de mTOR
MTT	Metiltiazol tetrazolio
NDRG1	Proteína <i>N-Myc Downstream Regulated 1</i>

NES	Señal de exportación nuclear
NGS	Secuenciación de nueva generación
NLS	Señal de localización nuclear
ODC	Ornitina descarboxilasa
PARP	Polimerasa de poli ADP-ribosa
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación nuclear
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKD1	Quinasa dependiente de 3'fosfoinositol 1
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	Receptor de progesterona
PSF	Proteína de unión al tramo de polipirimidina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RAPTOR	Proteína reguladora asociada a mTOR
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNAasa	Ribonucleasa
RSK	p90S6 quinasa
RTV	<i>Relative tumor volumen</i> (volumen relativo del tumor)
S6K	Proteína quinasa de la proteína ribosomal S6
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SELEX	Enriquecimiento exponencial por evolución sistemática de ligandos
Spry	Proteína sprouty

ssDNA	DNA de cadena sencilla
TELO2	Proteína de mantenimiento de la telomerasa 2
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TME	Transición mesénquimo-epitelial
TN	Triple-negativo
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
U.A.	Unidades arbitrarias
UTR	Región no codificante del mRNA
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
XIAP	Proteína inhibidora de apoptosis ligada a X
ZEB1	Proteína <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que afecta con mayor incidencia a las mujeres, siendo el quinto tipo de tumor con mayor mortalidad en la población mundial (Bray *et al.* 2018). La complejidad de esta patología hace que sea necesario un estudio pluridisciplinar donde se analicen, no sólo las características clínicas, sino también las morfológicas y moleculares. Durante muchos años la clasificación de esta enfermedad se hacía de acuerdo a criterios histopatológicos como el tamaño del tumor, el estado ganglionar y la presencia o no de metástasis, así como del estudio de biomarcadores como los receptores de estrógeno (ER), de progesterona (PR) y la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) mediante inmunohistoquímica (De Abreu *et al.* 2014). La investigación y los avances tecnológicos en biología molecular permiten conocer mejor la biología del cáncer de mama, identificando nuevos marcadores relacionados con distintas vías de señalización celular y poniendo de manifiesto la importancia del microambiente celular en la fisiopatología y respuesta al tratamiento. Este enfoque multidisciplinar aumenta las probabilidades de éxito en terapia puesto que el hecho de que se tengan en cuenta para el tratamiento, no sólo las características clínicas, sino también las características moleculares y las distintas mutaciones que darán lugar a la transformación tumoral de las células, permite una medicina más personalizada. Al mismo tiempo se puede reducir la toxicidad e inespecificidad de determinados tratamientos debido a que el conocimiento del perfil genético de los pacientes permite predecir la aparición de resistencias a determinados fármacos (De Abreu *et al.* 2014).

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama, en el año 2000 el grupo de investigación de Perou (Perou *et al.* 2000) analizó tejido procedente de pacientes junto con líneas celulares y elaboró perfiles de expresión génica que permitieron hacer la primera clasificación molecular de los distintos subtipos de cáncer de mama, que se englobaron en cuatro grandes grupos: Luminal, enriquecido en HER2, basal-like y normal-like. En 2001 la clasificación se hizo un poco más precisa y se dividió al subtipo Luminal en A y B (Sorlie *et al.* 2001) y en 2007 surgió un nuevo subtipo molecular: el bajo en claudina (Claudin-low) (Herschkowitz *et al.* 2007, Badowska-Kozakiewicz *et al.* 2016).

La clasificación obtenida a partir de estos perfiles de expresión génica, junto con la expresión diferencial de determinadas proteínas analizada por inmunohistoquímica, como por ejemplo el marcador de proliferación celular Ki67 (un antígeno nuclear expresado en las células en las fases proliferativas del ciclo celular), permiten predecir la supervivencia y la

respuesta a terapia de forma que se tienda a una medicina más personalizada que permita una mejor gestión del manejo de la enfermedad en los pacientes, evitando posibles resistencias a tratamientos y futuras recidivas y/o metástasis (De Abreu *et al.* 2014).

Entre las clasificaciones de tumores de mama, la más reciente los divide en 5 subtipos moleculares (**Tabla I**):

1. Subtipo Luminal A: Es el subtipo más frecuente y representa el 40% del total. Se caracteriza por expresar receptor de estrógenos (ER) y de progesterona (PR) y no sobreexpresar HER2. Además, tiene bajo índice de proliferación (medido por Ki67) y bajo grado histológico. El pronóstico de los pacientes con este subtipo es bueno.
2. Subtipo Luminal B: Este tipo supone el 20% de todos los tumores de mama. Expresan ER y/o PR, puede estar o no sobreexpresado HER2 (HER2+) y tienen mayor grado histológico e índice proliferativo Ki67 que el subtipo Luminal A, por lo que el pronóstico es peor.
3. Subtipo HER2+: Constituyen el 10-15% de todos los cánceres de mama y se caracterizan por ausencia de ER y PR, y ser HER2+. Presentan mal pronóstico, con alto grado histológico y alto Ki67.
4. Subtipo basal: Representa el 15-20% todos los tumores de mama y se caracterizan por no expresar receptores hormonales ni HER2 y sí genes relacionados con proliferación. Estos tumores son de crecimiento rápido y su pronóstico es desfavorable.
5. Subtipo baja claudina (Claudin-low). Es el subtipo más infrecuente. Se caracteriza por expresar genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima como las claudinas 3, 4 y 7 y E-cadherina, y también de células madre CD44+/CD24-. A pesar de englobarse dentro de los tumores Triple-negativo como el subtipo basal y tener mal pronóstico, estos tumores tienen un crecimiento más lento.

El subtipo basal y el subtipo de baja-claudina se engloban dentro del grupo Triple-negativo. Es un grupo muy heterogéneo en el que los tumores de mama se caracterizan por aparecer a edad temprana, con alto grado histológico y alta frecuencia de alteración de los ganglios linfáticos, así como por estar asociados significativamente con mutaciones germinales de BRCA1 (Pareja *et al.* 2016). Sin embargo, su característica fundamental es la ausencia de expresión de los receptores ER, PR y HER2, lo que hace de este subtipo de cáncer de mama el de peor pronóstico, puesto que está más limitado en el diagnóstico y en posibles tratamientos (Shao *et al.* 2017).

Esta clasificación no es estática, sino que se va adaptando y sufre modificaciones según se va profundizando más en el conocimiento de esta enfermedad.

Tabla I. Clasificación molecular de los tumores de mama y sus características

Clasificación	Receptores	Otras características
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2-	Ki67 bajo, respuesta endocrina, respuesta a quimioterapia frecuente
Luminal B	ER+, PR+/-, HER2+	Ki67 alto, respuesta endocrina normalmente y variable a la quimioterapia. Responde a trastuzumab (HER2+)
HER2+	ER-, PR-, HER2+	Ki67 alto, respuesta a trastuzumab, respuesta a quimioterapia
Basal	ER-, PR-, HER2-	EGFR+, y/o citoqueratinas 5/6+, Ki67 alto, sin respuesta endocrina, a veces a quimioterapia
Baja claudina	ER-, PR-, HER2-	Ki67, E-Cadherina, claudinas 3, 4 y 7 bajas. Respuesta intermedia a quimioterapia.
Normal		

Tabla tomada de Holliday et al., 2011 (Holliday et al. 2011).

Los tratamientos son variables en función de cada subtipo. Los pacientes con subtipo Luminal A suelen requerir sólo terapia endocrina que también puede formar parte del tratamiento de los Luminal B. La quimioterapia se recomienda para la mayoría de los Luminal B, HER2 y Triple-negativo, teniendo en cuenta que a los que expresan HER2 se les suele tratar también con Trastuzumab (Goldhirsch et al. 2011).

2. MNKS: PROTEÍNAS QUINASAS QUE INTERACCIONAN CON MAPK

2.1 Familia de MNKS

Las MNKS (MNK1 y MNK2) son proteínas quinasas que interaccionan con MAP quinasas y fueron descritas por primera vez en el año 1997 por dos grupos de investigación independientes. Waskiewicz y colaboradores (Waskiewicz et al. 1997) identificaron dos nuevas proteínas serina/treonina quinasas de ratón, Mnk1 y Mnk2, utilizando ensayos de doble híbrido en levaduras. Estas proteínas se fosforilaban y activaban por Erk1/2 y por p38 quinasa (proteína quinasa activada por mitógenos 8), tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no por Jnk/SAPK (Jun amino-terminal quinasas/proteínas quinasas activadas por estrés). Mediante ensayos de actividad quinasa, observaron que la fosforilación y activación de Mnk1 y Mnk2 *in vitro* estimulaban la actividad intrínseca de Mnk por su sustrato, el factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E), por lo que identificaron a Mnk como la quinasa responsable de la fosforilación de eIF4E *in vivo* (Waskiewicz et al. 1997).

Por otro lado, Fukunaga y colaboradores (Fukunaga *et al.* 1997) identificaron la MNK1 humana en un estudio que pretendía hallar sustratos de la quinasa ERK1 mediante ensayos de expresión de cDNAs en bacterias utilizando el fago λ GEX5. En este estudio se estableció que la MNK1 humana se fosforilaba por ERK y por p38 MAP, pero no por JNK/SAPK. También demostraron que MNK1 se activaba por estímulos que activaban a ERK (ésteres de forbol, suero) y a p38 (hiperosmolaridad, radiación UV-C, citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α) (Fukunaga *et al.* 1997).

Las proteínas MNKs están codificadas por dos genes, *MNK1* y *MNK2*. Cada uno de los genes da lugar a una proteína en ratón, *Mnk1* y *Mnk2*, mientras que en humanos da lugar a cuatro: dos isoformas largas (*MNK1a* y *MNK2a*) y dos cortas (*MNK1b* y *MNK2b*). Estas cuatro variantes se producen porque, de la expresión de cada uno de los dos genes, se obtienen dos mRNAs mediante *splicing* o procesamiento alternativo (Slentz-Kesler *et al.* 2000, O'Loghlen *et al.* 2004). El extremo N-terminal entre cada una de las dos isoformas de MNK1 o de MNK2 es idéntico, lo que no ocurre con la región C-terminal, que es completamente distinta (**Figura 1**). En el extremo N-terminal se encuentra una secuencia de localización nuclear (NLS) que media la unión con α -importina, proteína que se encarga del transporte de proteínas al núcleo celular. Asimismo, también contiene la zona de unión al factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G), una proteína que forma parte del factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) y que sirve de anclaje a las MNKs, las cuales se unen para fosforilar de forma eficiente al eIF4E (Shveygert *et al.* 2010).

En el extremo C-terminal de las isoformas “largas” (*MNK1a* y *MNK2a*) existe un dominio de unión a las MAPK de secuencia LARRR y LAQRR, respectivamente, que hace que *MNK1a* se una a las quinasas ERK1/2 y p38, y *MNK2a* sólo se asocie con ERK1/2. Sin embargo, las isoformas “cortas” carecen de este dominio. *MNK2b* se identificó en el año 2000 como una proteína de unión a ER β (receptor de estrógenos β) (Slentz-Kesler *et al.* 2000), mientras que *MNK1b* se identificó en 2004 a partir del RNA de células HL-60 (O'Loghlen *et al.* 2004). En *MNK1b* el procesamiento alternativo hace que se pierda el exón 12 y se produzca un cambio en el marco de lectura que genera un codón de parada. Así, *MNK1b* pierde 89 aminoácidos (336-424) que son reemplazados por 12 aminoácidos distintos (336-347), lo que se denomina región específica de *MNK1b* (*MNK1bSR*) (O'Loghlen *et al.* 2007). En el extremo C-terminal de *MNK1a* se encuentra una secuencia de exportación nuclear (NES), por lo que su localización es, principalmente, citoplasmática. *MNK1b* ha perdido esta secuencia y puede encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo. El caso de *MNK2* es distinto. *MNK2a*, a pesar de que carece de NES, se localiza en el citoplasma, mientras que *MNK2b* se encuentra principalmente en el núcleo. Esto podría deberse a una interferencia del extremo

C-terminal de MNK2a en la unión de la región NLS con la α -importina que impide su entrada al núcleo (Buxade *et al.* 2008b).

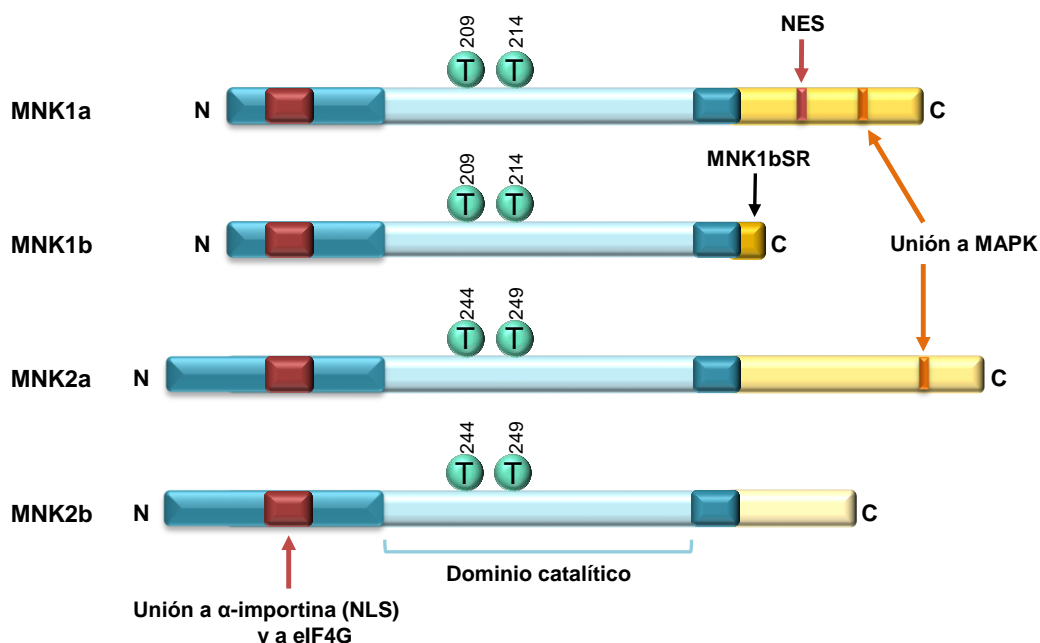


Figura 1. Esquema general de las MNKs humanas. Todas las MNKs presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) y las treoninas del dominio catalítico, mientras que sólo MNK1a tiene la secuencia de exportación nuclear (NES) y solamente MNK1a y MNK2a poseen el dominio de unión a MAPK.

La región central de MNK1 y MNK2 corresponde al dominio catalítico de la proteína con una similitud en la secuencia de aminoácidos del 78% entre ellas. Los sitios activos están altamente conservados, con dos residuos de treonina (209 y 214 en MNK1 y 244 y 249 en MNK2) que conforman el bucle de activación de la actividad quinasa. Estas treoninas del bucle de activación van seguidas de prolina que funcionan como residuos fosforilables, de manera que son susceptibles de ser fosforilados por las MAPK, característica que tienen en común las MNKs con proteínas quinasas activadas por MAPK (MK2, MK3 (o pK3) y MK5), con la proteína p90S6 quinasa (RSK) y con la proteína quinasa activada por mitógenos y estrés (MSK). Sin embargo, también presentan particularidades en los dominios catalíticos. Las MNKs presentan un motivo DFD (Asp-Phe-Asp) que marca el principio del bucle de activación en lugar de DFG (Asp-Phe-Gly) que presentan otras quinasas. Además, los dominios de MNK1 y MNK2 contienen dos insertos, uno situado entre el motivo DFD y el bucle de activación y otro junto al motivo APE (Ala-Pro-Glu) (Cargnello *et al.* 2011). Los estudios de las estructuras tridimensionales de MNK1 y MNK2 indican que el bucle de activación de MNK2 adquiere una inusual conformación abierta y el motivo DFD interfiere en la unión a ATP (Jauch *et al.* 2005). Por otro lado, el bucle de activación de MNK1 se auto-inhibe, ya que contiene

una Phe230 que desplaza a la Phe192 del DFD al sitio de unión del ATP, impidiendo la unión de este (Jauch *et al.* 2006).

Las variaciones observadas en las distintas isoformas determinan su actividad eIF4E quinasa y su regulación. MNK1a es una isoforma con baja actividad basal, aunque inducible tanto por ERK1/2 como por p38 MAPKs, al contrario que MNK2a que posee alta actividad basal débilmente alterable por inhibidores de las rutas de ERK o p38 MAPKs. Esta característica parece estar relacionada con la capacidad de MNK2a para permanecer unida de forma estable a ERK incluso después de que ERK haya sido activada por fosforilación (Buxade *et al.* 2008b). MNK2b tiene una actividad basal muy baja y aún se desconocen las condiciones en las cuales se podría incrementar dicha actividad (Scheper *et al.* 2003). MNK1b muestra una alta actividad basal que es independiente de la activación de ERK/p38 MAPK (O'Loghlen *et al.* 2004). Sin embargo, hay estudios que muestran que aunque MNK1b no es activada por ERK, sí puede responder a la activación de otras vías de señalización de las MAPK, como la de p38 y JNKs, aumentando ligeramente su actividad (Goto *et al.* 2009). La presencia de las dos treoninas del bucle de activación de MNK1b es necesaria para su actividad, pero dicha actividad no depende del estado de fosforilación de las mismas. El hecho de que MNK1b pierda 77 aminoácidos en su extremo C-terminal respecto a MNK1a no justifica su alta actividad eIF4E quinasa, lo que parece indicar que el dominio MNK1bSR podría ser importante para dicha actividad (O'Loghlen *et al.* 2007). No obstante, otros autores han obtenido resultados distintos, sugiriendo que es la falta de estos 77 aminoácidos la característica responsable de la mayor actividad basal de la isoforma MNK1b (Parra *et al.* 2005, Goto *et al.* 2009)

En ratón, Mnk1 y Mnk2 se expresan en todos los tejidos adultos, excepto Mnk2 en el cerebro en el que los niveles son muy reducidos. En comparación con el resto de tejidos, la expresión de ambas proteínas es bastante abundante en músculo esquelético (Waskiewicz *et al.* 1997). En humanos MNK1a se expresa más en hígado, páncreas, corazón y placenta. MNK1b se expresa de forma similar en todos los tejidos estudiados excepto en músculo esquelético, donde los niveles son bajos (O'Loghlen *et al.* 2004). En el caso de MNK2a y MNK2b, ambas isoformas presentan una amplia distribución en todos los tejidos estudiados excepto en cerebro y en corazón, donde los niveles de las dos isoformas son muy bajos, e igualmente muy reducidos para MNK2a en ovario y en el timo. Sin embargo, y coincidiendo con MNK1, los niveles de expresión de ambas isoformas, MNK2a y MNK2b, son mayores en páncreas (Slentz-Kesler *et al.* 2000).

2.2 Sustratos de las MNKs

a) Factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E)

El factor de iniciación eucariótico 4E fue el primer sustrato descrito de las MNKs mediante ensayos de actividad quinasa *in vitro* (Waskiewicz *et al.* 1997) y se corroboró más adelante *in vivo* en estudios con ratones doble *knock-out* para Mnk1 y Mnk2, en los que no se detectaba la fosforilación de la Ser209 bajo ningún tipo de activación (Ueda *et al.* 2004). El eIF4E forma parte del complejo eIF4F y se une específicamente a la 7 metilguanosa (m7GDP) de la estructura cap que se encuentra en el extremo 5' terminal de todos los mRNAs eucariotas, reclutando así al ribosoma y regulando la iniciación de la traducción dependiente de cap (Karaki *et al.* 2015, Siddiqui *et al.* 2015). El complejo eIF4F está formado por tres factores: eIF4E, eIF4A, que es una RNA helicasa dependiente de ATP, y eIF4G, una proteína de anclaje. Las MNKs fosforilan al eIF4E en la Ser209 cuando ambas proteínas se encuentran unidas a la proteína de anclaje eIF4G, la cual facilita su aproximación, y esta fosforilación responde al tratamiento de las células con factores de crecimiento, hormonas y mitógenos (Flynn *et al.* 1995, Joshi *et al.* 1995, Makkinje *et al.* 1995, Pyronnet *et al.* 1999).

La regulación del eIF4E es muy importante por ser un factor que está presente en la célula a una concentración limitante (0.01-0.2 moléculas por ribosoma), comparada con la de otros factores de iniciación eucariotas (eIFs) (0.3-0.5 moléculas por ribosoma) (Duncan *et al.* 1987). Inicialmente se pensó que la fosforilación de la Ser209 del eIF4E por las MNKs, lo que ocurre normalmente en respuesta a agentes que activan la síntesis de proteínas, aumentaba su afinidad por el cap de los mRNAs. Sin embargo, en 2002 se llevaron a cabo experimentos de resonancia de plasmón de superficie (SPR) en los que se sugiere que la fosforilación de eIF4E produce un cambio conformacional por el que este pierde afinidad por el cap del mRNA al que se encuentra unido para unirse a otro diferente en polisomas activos (Scheper *et al.* 2002). Esto podría ser importante especialmente para los mRNAs con largas regiones 5' UTRs (regiones no traducidas) entre el cap y el codón de inicio, de manera que el nivel de traducción no se vería limitado. Sin embargo, el significado fisiológico de la fosforilación del eIF4E sigue sin comprenderse. La disponibilidad del eIF4E para unirse al eIF4G está regulada por su asociación reversible con las proteínas de unión a 4E (4E-BPs, siendo la proteína 4E-BP1 la más estudiada). Las 4E-BPs y el eIF4G se unen al eIF4E en sitios solapantes, de tal forma que la unión de uno de los dos impide la unión del otro. Las 4E-BPs se hiperfosforilan en respuesta a un gran número de estímulos extracelulares y, en consecuencia, se disocian del eIF4E. De forma contraria, las 4E-BPs hipofosforiladas se asocian fuertemente con el eIF4E bloqueando el ensamblaje del eIF4F porque compiten con el eIF4G por el sitio de unión al eIF4E que comparten con ellas. La fosforilación de las 4E-BPs está catalizada por el complejo

1 de la proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1) y su señalización a través de mTORC1 está activada por la ruta de Ras/Raf/MEK/ERK y por PI3K/AKT (Pyronnet 2000, Proud 2015).

b) Factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G)

El factor de iniciación eucariótico 4G es una proteína de anclaje que forma parte del complejo de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) y sirve como nexo entre el mRNA y el ribosoma. Esta proteína es capaz de interactuar con PABP por su extremo N-terminal, con eIF4E, eIF4A y eIF3 por su zona central, y con MNK por su extremo C-terminal. Todas estas interacciones hacen que eIF4G esté implicado en varios procesos como la circularización del mRNA a través de la unión con PABP; facilitar la apertura de la estructura secundaria de las regiones 5' UTR gracias al eIF4A; reclutar la subunidad 40S del ribosoma al extremo 5' del mRNA mediante las interacciones con eIF4E y eIF3; y acercar el sustrato eIF4E a la quinasa MNK1 (Buxade *et al.* 2008b, Cargnello *et al.* 2011). Las MNKs no forman un complejo estable con eIF4E, por lo que la asociación de MNK con el eIF4G es esencial para la fosforilación del eIF4E en la Ser209 (Pyronnet *et al.* 1999, Shveygert *et al.* 2010, Dobrikov *et al.* 2011). El eIF4G y α -importina interactúan con MNK1 de forma excluyente porque el sitio de unión de ambas se encuentra en el extremo N-terminal de MNK1 (Pyronnet 2000). MNK1 puede fosforilar al eIF4G *in vitro* (Pyronnet *et al.* 1999), pero no se ha visto que sea relevante *in vivo* puesto que el tratamiento con inhibidores de la quinasa no parece afectar a la unión de proteínas que se asocian al eIF4G, incluyendo eIF3 y eIF4A (Raught *et al.* 2000, Proud 2015).

c) Ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 (hnRNP A1)

La hnRNP A1 es una proteína nuclear muy abundante que juega un papel importante en el metabolismo del mRNA. Aunque es una proteína nuclear, se transporta entre el núcleo y el citoplasma a través del motivo M9. Las MNKs fosforilan a hnRNP A1 en la Ser 192 y la Ser 310 en respuesta a la activación por células T. Se ha demostrado que la inhibición de la actividad de MNK con CGP57380 produce una disminución en la producción de TNF α por los macrófagos después de un tratamiento con múltiples agonistas de la familia *Toll like receptor* (TLR) (Rowlett *et al.* 2008). Otros estudios comprobaron que la inhibición de las MNKs con CGP57380 en cultivos de queratinocitos humanos disminuye la liberación de TNF α , IL-6 e IL-1 β en respuesta a la estimulación con anisomicina, que es agonista de la p38 MAPK (Kjellerup *et al.* 2008). MNK1 participa en la regulación de la síntesis de TNF α a través de la fosforilación de la proteína hnRNP A1, la cual pierde la capacidad de unirse a regiones AREs (regiones 3'UTR del mRNA ricas en residuos A y U), lo que conlleva la desrepresión de su traducción (Buxade *et al.* 2008b). Además, hnRNP A1 se fosforila en respuesta a estrés osmótico a través

de p38 MAPK, por lo que las MNKs también regularían así la traducción de mRNAs específicos en situaciones de estrés celular (Buxade *et al.* 2008b, Cargnello *et al.* 2011).

d) Factor de *splicing* asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF)

El factor de *splicing* asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF) es una proteína nuclear que está implicada en la transcripción y el procesamiento del RNA. Junto con p54^{nrb}, otra proteína de unión a DNA/RNA, forma un factor de transcripción/procesamiento implicado en procesos nucleares (transcripción, el procesamiento nuclear del RNA, la retención nuclear del RNA editado, la relajación del DNA, la unión de roturas de la doble hélice del DNA, la terminación de la transcripción y el procesamiento del mRNA) y en tumorigénesis. También regula positivamente la traducción de la familia de oncogenes Myc, entre otros procesos (Buxade *et al.* 2008b). Buxadé y colaboradores identificaron a PSF como un nuevo sustrato intracelular de MNK *in vitro*. Identificaron dos sitios de fosforilación en PSF, la Ser8 (de forma preferente por MNK2) y la Ser283. PSF interacciona con mRNAs que contienen AREs y la fosforilación por MNK aumenta su unión al mRNA del TNF α *in vivo*, aunque no afecta ni a la estabilidad ni a la localización nuclear/citoplasmática de PSF o del mRNA de TNF α (Buxade *et al.* 2008a). Un estudio más reciente ha revelado el papel de MNK en la producción de TNF α controlando la abundancia de su mRNA (Pashenkov *et al.* 2017), si bien no se ha determinado la implicación de PSF y/o hnRNP A1.

e) Fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA₂)

La cPLA₂ juega un papel clave en la producción de eicosanoides que participan en procesos de inmunidad e inflamación. MNK1 fosforila a cPLA₂ en la Ser 727 *in vitro* (Hefner *et al.* 2000), lo que se regula mediante la vía de señalización de p38 MAPK. Esta fosforilación produce la activación de cPLA₂, con lo que se libera ácido araquidónico de los glicerofosfolípidos para la producción de eicosanoides. Además, otras quinasas que se activan a través de p38 MAPK, MSK1 y MK5 también fosforilan a cPLA₂ (Buxade *et al.* 2008b, Cargnello *et al.* 2011).

f) Sprouty 2 (Spry2)

Las proteínas Sprouty (Spry) son un grupo de proteínas asociadas a membrana que suprimen la activación y/o señalización de ERK (Bundschu *et al.* 2006). MNK1 fosforila a Spry2 en los residuos Ser 112 y Ser 121, y el cambio de éstos a Ala produce la desestabilización de Spry2 (DaSilva *et al.* 2006). El inhibidor de MNK CGP57380 también lleva a la degradación

de Spry2 mediada por proteosoma, sugiriendo que la fosforilación de Spry2 por MNK1 podría alargar su vida media y, por tanto, su capacidad de inhibir la señalización de ERK.

2.3 MNKs y cáncer

La relación del eIF4E con el control del crecimiento celular y la transformación neoplásica se publicó por primera vez en 1990 (Lazaris-Karatzas *et al.* 1990). Estos autores demostraron que la sobreexpresión del eIF4E en la línea celular NIH3T3 da lugar al crecimiento de colonias en agar y produce tumores cuando se inoculan en ratones. Además, la inhibición del eIF4E reduce el crecimiento de tumores y la malignización en modelos experimentales (Graff *et al.* 1995, De Benedetti *et al.* 2004). Distintos trabajos han mostrado que el eIF4E se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tipos de cáncer como en tumores de mama, cuello y cabeza, colon, próstata, riñón, pulmón, etc. lo que se relaciona con la progresión de la enfermedad (De Benedetti *et al.* 2004, Thumma *et al.* 2007, Culjkovic *et al.* 2009, Pinto-Diez *et al.* 2018).

El eIF4E puede modular la expresión génica a dos niveles: participando en el transporte de algunos mRNAs del núcleo al citoplasma y aumentando la eficiencia de la traducción de algunos mRNAs que ya están en el citoplasma. El eIF4E viaja al núcleo gracias a la proteína transportadora 4E-T (Dostie *et al.* 2000) y, una vez allí, la capacidad para regular la exportación de los mRNAs dependerá de su estado de fosforilación y de los elementos sensibles al eIF4E (4E-SE: eIF4E sensitivity element) que están presentes en las regiones 3'UTR de los mRNAs (Culjkovic *et al.* 2005). En este proceso, el eIF4E se asocia con la proteína transportadora nuclear CRM1, con los mRNAs específicos y con los cofactores adecuados para facilitar la salida al citoplasma (Topisirovic *et al.* 2009).

El aumento de la expresión del eIF4E estimula de forma preferente la traducción de mRNAs que codifican para proteínas implicadas en proliferación, apoptosis, etc. (Gingras *et al.* 1999) puesto que tienen estructuras secundarias complejas en la región 5' no traducible (5'UTR) y son particularmente dependientes de la actividad del eIF4E. Algunas de estas proteínas son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que facilitan la angiogénesis; Bcl-2 que participa en la supervivencia celular; metaloproteinasas (MMPs) implicadas en la invasión; y c-Myc, ciclina D1, ornitina descarboxilasa (ODC) y HDM2 que regulan el crecimiento celular (Rousseau *et al.* 1996, Topisirovic *et al.* 2004, Bilanges *et al.* 2007, Culjkovic *et al.* 2007, Wendel *et al.* 2007, Phillips *et al.* 2008).

En los últimos años se han publicado resultados que establecen que la fosforilación del eIF4E en la Ser 209 por las MNKs es un requisito indispensable para la acción oncogénica de éste. Además, se ha visto que los niveles de eIF4E fosforilado se encuentran aumentados en tejido tumoral y correlacionan con peor pronóstico para el paciente. Así mismo, MNK1 está sobreexpresada en glioblastoma, linfoma, cáncer de mama, de próstata, de ovario y carcinoma hepatocelular y sus altos niveles de expresión se relacionan con peor pronóstico (Wendel *et al.* 2007, Fan *et al.* 2009, Wheeler *et al.* 2010, Bell *et al.* 2016, Hou *et al.* 2017, Santag *et al.* 2017, D'Abronzio *et al.* 2018, Pinto-Diez *et al.* 2018).

En 2004, Topisirovic y colaboradores (Topisirovic *et al.* 2004) demostraron que la fosforilación del eIF4E nuclear parece ser importante en el control del transporte del mRNA de la ciclina D1 y de las propiedades transformantes del eIF4E. Otros trabajos mostraron que la actividad de la quinasa MNK1 es necesaria para la síntesis de HDM2, un regulador de p53 capaz de inducir parada del ciclo celular y activar rutas pro-apoptóticas. El tratamiento de la línea de cáncer de mama T47D con CGP57380 redujo la fosforilación del eIF4E, así como los niveles proteicos de HDM2 y de la ciclina D1. Los niveles globales de expresión y los niveles citoplasmáticos del mRNA de HDM2 disminuyeron, indicando la inhibición de la exportación del mRNA de HDM2. Por lo tanto, la exportación del mRNA de HDM2 del núcleo al citoplasma dependiente del eIF4E requiere la activación de las MAP quinasas y MNK1 (Phillips *et al.* 2008).

Otros autores han demostrado en varias líneas tumorales de mama que la sobreexpresión de HER2 se correlaciona con la actividad de las MNKs y su inhibición con CGP57380 reduce la formación de colonias en agar (Chrestensen *et al.* 2007). Además, en un modelo experimental de ratones, la sobreexpresión de una MNK1 constitutivamente activa disminuye la apoptosis y acelera la aparición de tumores, mientras que un mutante inactivo atenúa la aparición de los mismos (Wendel *et al.* 2007). En fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) dobles *knock-out* para MNKs, se observó que la retirada del suero producía apoptosis con mayor facilidad que en las células MEF WT (*wild-type*) o a las células *knock-out* para cada MNK (MNK1 o MNK2) (Chrestensen *et al.* 2007). El tratamiento de MEF WT con CGP57380 sensibiliza a las células frente a la apoptosis más que la retirada de suero, lo que puede ser debido a la pérdida de función de MNK. La reintroducción de MNK1 o MNK2 en los MEFs doble *knock-out* aumenta la fosforilación del eIF4E en niveles similares, pero sólo en el caso de MNK1 disminuyó la sensibilidad a la apoptosis. Estos estudios sugieren que las MNKs, probablemente a través de un sustrato de MNK1, están implicadas en cascadas de señalización anti-apoptóticas. Así mismo, la tumorigénesis se suprime por la pérdida de Mnk1/2 en otro modelo de ratón con linfoma PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa) negativo (Ueda *et al.* 2010).

Las MNKs también intervienen en la vía de señalización de β -catenina. La ruta Wnt/ β -catenina que regula la traducción génica es importante en la función de las células madre en leucemia. Lim y colaboradores (Lim *et al.* 2013) mostraron que eIF4E está sobreexpresado en la fase blástica de la leucemia mieloide crónica (BC-CML) y sus niveles de fosforilación son altos. La sobreexpresión de eIF4E o la expresión del mutante eIF4E (S209D) constitutivamente activo, a diferencia de un mutante no fosforilable eIF4E (S209A), dio lugar a la activación de β -catenina y su translocación al núcleo. *In vivo*, CGP57380 previno la implantación de células madre de leucemia mieloide crónica en fase blástica, y redujo el número de células anómalas en ratones ya implantados. En resumen, las MNKs regulan la vía Wnt/ β -catenina tanto produciendo el aumento de la expresión de β -catenina como su activación (incluyendo el aumento de su fosforilación en la Ser552, un sitio catalizado por AKT), aunque el mecanismo aún se desconoce.

Las rutas de señalización de Ras/MAPK y PI3K/AKT/mTORC1 son muy importantes porque regulan la fosforilación de proteínas del complejo de traducción y porque muchos de sus componentes son oncogenes y genes supresores de tumores, los cuales se ven desregulados en cáncer. La vía de ERK se encuentra activada en muchos tumores debido a mutaciones activadoras en la proteína Ras y a mutaciones en proteínas supresoras de tumores como la neurofibromina 1 (NF1), que normalmente inhiben la actividad de Ras a través de la hidrólisis de Ras-GTP a su estado inactivo Ras-GDP (Hou *et al.* 2012). Así, Raf-1 activa a MEK (MAP quinasa de ERK), también conocida como MAPKK (MAP quinasa quinasa). Las distintas variantes de las MEK fosforilan a ERK1/2 y a p38 α/β , que fosforilan a MNK1 y MNK2 (**Figura 2**).

La vía de señalización PI3K/PTEN/AKT/mTOR es la más relacionada con la tumorigénesis y con la sensibilidad y resistencia a las terapias contra el cáncer. La desregulación de la señalización de esta vía suele deberse a alteraciones genéticas y/o mutaciones que ocurren en el 70% de todos los tumores (Wendel *et al.* 2007, Ueda *et al.* 2010, Hou *et al.* 2012, Joshi *et al.* 2014, Lineham *et al.* 2017). Los factores de crecimiento, los mitógenos y las citoquinas activan a la PI3K que inicia una cascada de eventos en las células. La quinasa dependiente de 3' fosfoinositol 1 (PDK1) activa a la proteína quinasa B (PKB o AKT), mediante la inactivación del complejo supresor de tumores 1 y 2 (TSC1/2), activa a mTORC1. La activación de PDK1 y AKT por PI3K está regulada negativamente por PTEN (Chappell *et al.* 2011). PTEN es un gen supresor de tumores que se encuentra habitualmente mutado o silenciado en cánceres humanos (McCubrey *et al.* 2011). Su pérdida produce una activación de AKT y de la señalización de mTORC1 (**Figura 2**). mTORC1 regula el ensamblaje del complejo eIF4F ya que fosforila a las 4E-BPs, lo que implica la disociación del eIF4E, la unión de éste al eIF4G y, en consecuencia, la formación del complejo eIF4F. Además,

mTORC1 también promueve la activación de la quinasa S6K que fosforila a la proteína ribosomal S6 y a otros sustratos, incluyendo al factor eIF4B (Shahbazian *et al.* 2006). Debido a la importancia en el cáncer de esta vía de señalización, las quinasas de esta ruta se han utilizado como dianas terapéuticas y se han identificado inhibidores farmacológicos de las mismas (Brachmann *et al.* 2009, Meric-Bernstam *et al.* 2009). Sin embargo, se ha demostrado que un tratamiento prolongado de líneas celulares tumorales o pacientes con inhibidores de mTOR produce alta actividad de PI3K, lo que conlleva la supervivencia de las células cancerosas (Costa *et al.* 2007).

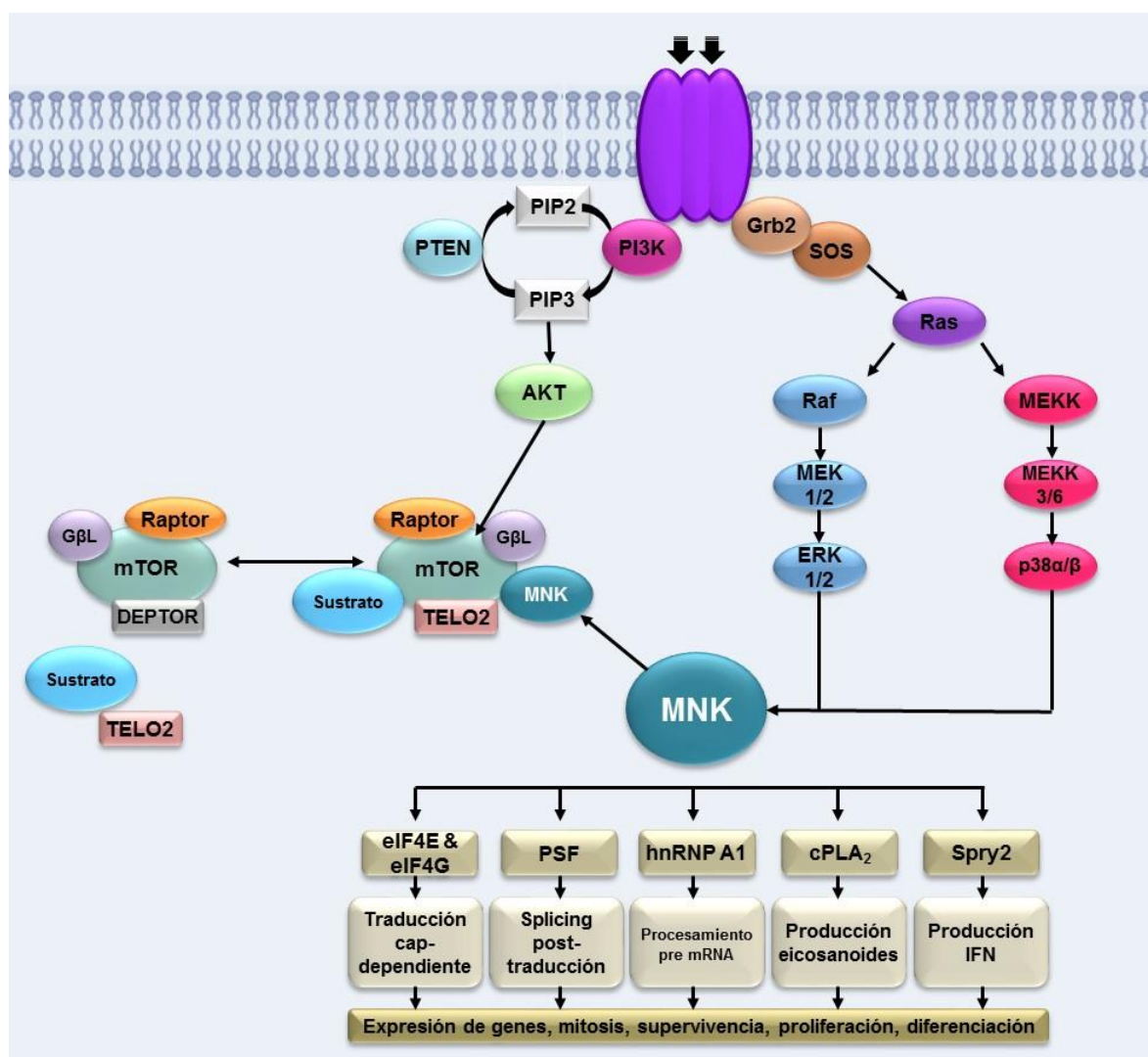


Figura 2. Mecanismo de acción de MNK. La activación de las MNKS ocurre por la activación previa de la vía de señalización celular Ras/Raf/ERK y por la vía de las p38 MAP quinasas. Asimismo, la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR en respuesta a factores de crecimiento entre otros estimulan la unión de MNK a mTORC1, regulando la formación del complejo mTORC1/TELO2/DDB1.

Ambas rutas de señalización están interconectadas y MNK1 parece jugar un papel importante en esta convergencia. Existen estudios que han identificado a MNK como un regulador de mTORC1. Un estudio de Shi y colaboradores demuestra que la sensibilidad de

las células tumorales a los inhibidores de mTOR depende en parte de la actividad de AKT en modelos de glioblastoma, cáncer de próstata y mieloma múltiple (MM). Estos inhibidores hacen que el crecimiento de células tumorales dependa de la traducción cap-independiente mediada por IRES. Para comprobar si la actividad IRES de c-Myc de las células de MM con mTOR inhibido estaba relacionada con las MNKs, comprobaron que La rapamicina activa a MNK y es MNK activada la que estimula la traducción dependiente de IRES de c-Myc (Shi *et al.* 2013). Otros estudios también han descrito que las MNKs estimulan la señalización por mTORC1 en el control de la traducción viral mediada por IRES (Brown *et al.* 2014, Kumar *et al.* 2018).

La rapamicina y sus derivados son tratamientos inmunosupresores estándar tras el trasplante de órganos, ejerciendo su efecto a través de la inhibición de mTORC1 en células T y evitando su proliferación. El tratamiento combinado de rapamicina con CGP57380 mejora el efecto de la rapamicina sola en la fosforilación de 4E-BP1, la síntesis proteica y el crecimiento tumoral en un modelo de glioma ortotópico en ratón (Grzmil *et al.* 2011). Así, este doble tratamiento disminuyó la fosforilación de ULK1 y 4E-BP1, sustratos de mTORC1 insensibles a rapamicina, en MEFs WT pero no en MEFs dobles *knock-out* para MNKs, indicando que la inhibición de mTORC1 se produce por efecto de la inhibición de MNK. Hay trabajos que sugieren que el efecto de MNK se produce por su interacción con mTOR, desplazando a DEPTOR de mTORC1, lo que induciría la unión de TELO2 al complejo. Todos estos datos demuestran el papel de las MNKs en la unión de mTORC1 a su sustrato (**Figura 2**). De hecho, MNK cumple esta regulación de forma independiente de su papel fosforilando a eIF4E. Además, MNK se une a mTORC1/TELO2/DDB1 a través de un mecanismo diferente del eIF4G, ya que el hecho de eliminar el sitio de unión a eIF4G no inhibe la formación del complejo (Brown *et al.* 2017a, Brown *et al.* 2017b).

2.4 Inhibidores de MNK como agentes antitumorales en cáncer

El cáncer es una enfermedad heterogénea y, por tanto, difícil de tratar. Cada tipo tumoral tiene una composición genética diferente debido al distinto patrón de oncogenes activos y supresores de tumores inactivos que presenta, lo que hace que las células utilicen rutas alternativas para sobrevivir. La complejidad de la señalización celular significa, en muchos casos, que los tratamientos convencionales o con un solo inhibidor sean poco efectivos, como es el caso del tratamiento con Trastuzumab. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal frente al dominio extracelular del receptor de la herceptina 2 (HER2), ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de mama. Recientemente, se ha demostrado que los niveles de MNK estaban aumentados en células resistentes a Trastuzumab y que la expresión

de MNK1 confería resistencia en células sensibles, mientras que el silenciamiento de la expresión de MNK1 tuvo el efecto contrario. Estos datos sugieren que MNK1 media la resistencia a fármacos en células de cáncer de mama, las cuales muestran aumento de la fosforilación del regulador transcripcional YB1, que a su vez se encuentra por encima de MNK1 (Astanehe *et al.* 2012).

El hecho de que las MNKs actúen como punto de convergencia entre las rutas de señalización de PI3K/AKT/mTOR y de MAP quinasas, que normalmente están alteradas en cáncer, hacen de ellas dianas muy interesantes para terapia. Además, como ya se ha indicado previamente, MNK1 se sobreexpresa en una amplia variedad de tumores, relacionándose con un peor pronóstico y supervivencia, y es la responsable de la fosforilación del eIF4E, pero no es indispensable para la viabilidad. Incluso se ha demostrado que la inhibición de MNK con el inhibidor CGP57380 en combinación con inhibidores de mTORC1, rapamicina y análogos, evita la resistencia a la terapia impidiendo que MNK pudiera restaurar el eIF4E fosforilado y, por tanto, su actividad con mTORC1 inhibido (Ueda *et al.* 2004, Wendel *et al.* 2007, Bianchini *et al.* 2008, Silva *et al.* 2008). Por todo ello, parece interesante y necesario desarrollar inhibidores de MNK, ya que se postula como una diana terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer, como confirman asimismo numerosos estudios (Dreas *et al.* 2017, Kwegyir-Afful *et al.* 2017, Li *et al.* 2017, Lineham *et al.* 2017, Santag *et al.* 2017, Zhan *et al.* 2017, Sansook *et al.* 2018).

Es importante resaltar que hasta la fecha no hay fármacos aprobados por la FDA que actúen específicamente sobre las quinasas MNKs y se han hecho pocos progresos desde el descubrimiento del CGP57380, que produce inhibición de MNK con valores en el rango micromolar (Teo *et al.* 2015b). La Cercosporamida, un antifúngico natural, se encontró como un potente inhibidor de MNK1/2 con valores en el rango nanomolar. Sin embargo, sus efectos de amplio espectro limitan su uso como un tratamiento efectivo ya que también inhibe a otras quinasas incluyendo JAK3, GSK3 β , ALK4 y PIM1 (Knauf *et al.* 2001, Konicek *et al.* 2011, Hou *et al.* 2012, Liu *et al.* 2016, Lineham *et al.* 2017).

Adicionalmente, el silenciamiento de las MNKs con el inhibidor MNKI-19 atenúa la fosforilación de eIF4E y reduce la traducción de mRNAs implicados en metástasis. El eIF4E es el punto de convergencia de las rutas de mTORC1 y de MNK/eIF4E, lo que brinda la oportunidad del tratamiento dual. El grupo de Njar estudió la utilización de agentes bloqueantes del metabolismo del ácido retinoico que inducen la degradación de MNK1 de forma que no pueda fosforilar al eIF4E en la Ser209, pero no afectan a los niveles totales del eIF4E (Ramalingam *et al.* 2014). Estos autores observaron que estos derivados del ácido retinoico son más potentes inhibiendo la actividad de MNK1 que otros retinoides y que otros

inhibidores inespecíficos de MNK, como el CGP57380 y la Cercosporamida. Esta degradación de MNK impide la fosforilación del eIF4E bloqueando la traducción dependiente de cap, inhibiendo el crecimiento celular, la migración y la invasión en células de cáncer de mama Triple-negativo y HER2 positivas.

Recientemente, el grupo de investigación de Santag (Santag *et al.* 2017) ha descrito un inhibidor de MNK1, BAY 1143269 de Bayer, con efecto anti-tumoral *in vivo* que disminuye la resistencia al tratamiento con el agente quimioterápico Docetaxel en carcinoma de pulmón no microcítico y se encuentra en fase I en ensayos clínicos. Asimismo, se ha publicado un trabajo en el que identifican un nuevo inhibidor frente a MNK1 y MNK2, el eFT508 de eFFECTOR, un inhibidor oral diseñado específicamente para unirse al sitio activo de la quinasa (Dreas *et al.* 2017). Es capaz de inhibir la fosforilación del eIF4E y desestabilizar selectivamente el mRNA de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-8 y el TNF- α . Se ha demostrado *in vivo* como un potente inhibidor de la acción tumoral en modelos de linfoma difuso de células B grandes. Actualmente se encuentra en fase II en ensayos clínicos para el tratamiento tanto de tumores sólidos como hematológicos (Dreas *et al.* 2017, Reich *et al.* 2018).

3. APTÁMEROS COMO HERRAMIENTAS TERAPÉUTICAS

Los aptámeros son moléculas de RNA o de DNA de cadena sencilla (ssDNA) capaces de reconocer a una molécula diana de forma estable, específica y con alta afinidad gracias a la estructura terciaria que son capaces de adoptar bajo determinadas condiciones de temperatura, pH y salinidad. Fueron descubiertos hace 28 años por tres grupos de investigación independientes (Ellington *et al.* 1990, Robertson *et al.* 1990, Tuerk *et al.* 1990) gracias a la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el año 1987 (Saiki *et al.* 1985, Mullis *et al.* 1992). Este hito en la biología molecular permitió que los tres grupos anteriormente mencionados describieran un método de selección molecular *in vitro* que permitiría el aislamiento de pequeños ácidos nucleicos capaces de interactuar de forma específica con sus moléculas diana: los aptámeros.

El proceso por el que se seleccionan los aptámeros se denomina método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) (Tuerk *et al.* 1990). Es un sistema reiterativo en el que se identifican los aptámeros de mayor afinidad y especificidad por su molécula diana a partir de un conjunto de oligonucleótidos de secuencias aleatorias obtenidos por síntesis química. Esta población inicial está formada por oligonucleótidos de RNA o ssDNA diseñados con una región central de 20 a 80 nucleótidos dispuestos de forma aleatoria y dos regiones anexas de secuencia conocida, de 18-20 nucleótidos de longitud, a

las que se unirán los cebadores en la amplificación por PCR. Los aptámeros que conforman esa población inicial adoptarán diferentes estructuras terciarias en función de su secuencia, lo que les permitirá interactuar con la molécula diana (**Figura 3**).

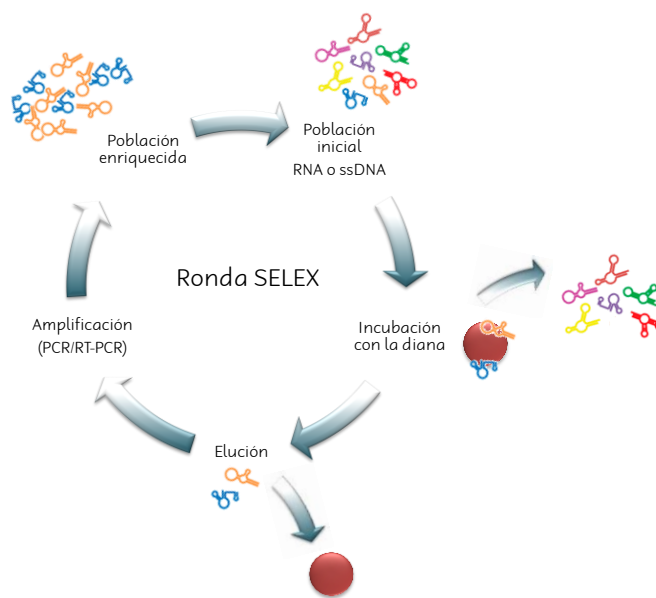


Figura 3. Esquema de la tecnología SELEX. Proceso de selección de aptámeros *in vitro* a partir de una población inicial de oligonucleótidos de ssDNA o RNA con secuencias aleatorias. El método SELEX se caracteriza por la repetición de las etapas sucesivas de selección, amplificación y pasos intermedios que conforman la ronda. El conjunto de aptámeros seleccionados en una ronda servirá de población en la siguiente, con una media general de 6-20 rondas de selección. La última ronda SELEX finalizará tras la amplificación. Por último, la población enriquecida de aptámeros específicos se clona o secuencia para caracterizar a los aptámeros individuales.

En la primera ronda se incuba la biblioteca de oligonucleótidos con la molécula diana, aunque sólo unos pocos se unirán específicamente a la misma. Esos aptámeros serán aislados del resto mediante técnicas físicas de separación y serán amplificados por PCR para obtener una población enriquecida que será utilizada en la siguiente ronda o ciclo de selección. Tras la PCR, puesto que el DNA que se obtiene es de doble cadena, se utilizará alguna de las técnicas establecidas para separarlas y obtener ssDNA. Existen distintos métodos para separar la secuencia de un aptámero de su cadena complementaria, como son: desnaturalización térmica a 90°C para que se separe la doble hebra y posterior renaturalización a 4°C para que cada aptámero se estructure; electroforesis y posterior elución de la banda correspondiente; PCR asimétrica para favorecer la obtención de cadena sencilla; digestión enzimática de la cadena complementaria con exonucleasa y el marcaje de una de las cadenas con biotina para separarlas utilizando una resina conjugada con estreptavidina (Cruz-Aguado *et al.* 2008, Svobodova *et al.* 2012).

Con el fin de aumentar la eficacia del enriquecimiento de la población de aptámeros que interaccionan con alta afinidad, se hacen variaciones más restrictivas en las condiciones de la selección en cada ronda. El número de rondas de selección-amplificación depende de gran variedad de parámetros como las características y concentración de la diana, el diseño de la población inicial, las condiciones de selección, la proporción de moléculas diana respecto a oligonucleótidos o la eficiencia del método de separación de las secuencias no unidas (Stoltenburg *et al.* 2007). Para comprobar si se produce el enriquecimiento de la población se realizan pruebas a lo largo del proceso de selección como ensayos enzimáticos en placa con aptámeros (ELONA), Slot-blot u otras. Una vez que se comprueba que es así, el proceso SELEX se da por terminado y es entonces cuando se identifican aptámeros individuales mediante clonaje y secuenciación o NGS (*Next-gen Sequencing*) para caracterizarlos.

Los aptámeros son moléculas capaces de formar estructuras secundarias complejas al estructurarse como tallos, horquillas, pseudoknots, *G-quadruplex*, etc. y esa estructura es la que determina su unión a la diana. Estas estructuras se producen como resultado de fuerzas de complementariedad de bases, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno (Hermann *et al.* 2000). Existen programas informáticos capaces de predecir las posibles estructuras secundarias en función de sus secuencias (Davis *et al.* 1996) e incluso detectar la posibilidad de que presenten *G-quadruplex* como los programas mFold y QGRS Mapper.

La población de aptámeros enriquecida podría compararse con anticuerpos policlonales y los aptámeros individuales obtenidos a partir de la población se asemejarían a anticuerpos monoclonales (Liss *et al.* 2002, Darfeuille *et al.* 2006, Chen *et al.* 2007, Kalra *et al.* 2018). Las características de los aptámeros hacen que presenten una serie de ventajas con respecto a los anticuerpos como se resumen en la **Tabla II**.

Los aptámeros presentan características de gran utilidad en la clínica entre las que destacan que son muy estables a variaciones de temperatura, pH y a las condiciones iónicas de su entorno (Mayer 2009, Ruiz Ciancio *et al.* 2018). Además, los aptámeros producen baja inmunogenicidad y toxicidad y se sintetizan y modifican fácilmente en grandes cantidades sin casi variaciones de lote a lote (Pereira *et al.* 2018). Por otra parte, se pueden seleccionar frente a multitud de dianas como iones, moléculas orgánicas e inorgánicas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, toxinas, partículas virales, células, órganos completos y animales vivos (Hofmann *et al.* 1997, Jayasena 1999, Berens *et al.* 2001, Grate *et al.* 2001, Masud *et al.* 2004, Sazani *et al.* 2004, Stoltenburg *et al.* 2005, Shangguan *et al.* 2006, Chen *et al.* 2007, Mallikaratchy *et al.* 2007, Mayer 2009, Balogh *et al.* 2010) y se pueden utilizar incluso como herramientas para transportar y liberar moléculas para el diagnóstico y/o terapia en dianas

externas o intracelulares. Asimismo, su pequeño tamaño les permite una mejor entrada en las células (Pereira *et al.* 2018). De esta manera, los aptámeros se pueden unir a fármacos, RNAs no codificantes, proteínas, nanopartículas, etc., lo que los convierte en futuras herramientas para el diagnóstico y el tratamiento en cáncer (Mayer 2009, Lao *et al.* 2015, Nimjee *et al.* 2017, Ismail *et al.* 2018, Kaur *et al.* 2018, Pereira *et al.* 2018, Ruiz Ciancio *et al.* 2018).

Tabla II. Características y ventajas de los aptámeros respecto a los anticuerpos.

Aptámeros	Anticuerpos
Se seleccionan <i>in vitro</i> sin emplear animales, incluyendo proteínas no inmunogénicas y toxinas	Requieren el uso de animales, y sólo pueden ser frente a proteínas inmunogénicas
Se producen por síntesis química con muy baja o nula variación de lote a lote	Suelen sufrir variaciones entre lotes
Condiciones de selección modificables según necesidad	Obtención sólo bajo condiciones fisiológicas
Pueden renaturalizarse en minutos, almacenarse mucho tiempo y transportarse a temperatura ambiente	Vida media limitada, sensibles a temperatura sin posibilidad de renaturalización
No suelen ser inmunogénicos	Suelen ser inmunogénicos
Pueden modificarse para aumentar su estabilidad, conjugarse con moléculas marcadoras, etc	Sólo pueden marcarse, pudiendo causar pérdida de afinidad
Pequeño tamaño que permite una entrada más eficiente en la célula	Mayor tamaño que limita el acceso a los compartimentos celulares

Los aptámeros tienen algunas limitaciones ya que su estructura terciaria es muy dependiente de las condiciones en las que se encuentren. Además, al ser de naturaleza polianiónica, pueden interactuar con proteínas del suero humano cuando se administran *in vivo*. Estas interacciones no específicas pueden hacer que se acumulen en diferentes tejidos causando algunos efectos secundarios no deseados. Los aptámeros se pueden modificar para evitar estas limitaciones, aunque algunas modificaciones pueden producir hepatotoxicidad por aumento de la acumulación en el hígado como en el caso de los

aptámeros LNA (*Locked Nucleic Acids*), aptámeros con una modificación en el azúcar, un puente que conecta el oxígeno 2' con el carbono 4' y que le confiere mayor estabilidad térmica y resistencia frente a la acción de las nucleasas del suero (Koshkin 1998, Ismail *et al.* 2018). Al igual que los anticuerpos, los aptámeros modificados pueden ser utilizados en diversas técnicas como ELISA/ELONA (Drolet *et al.* 1996, Ferreira *et al.* 2008), *western blot* (Murphy *et al.* 2003), electroforesis capilar (Wang *et al.* 2008), citometría de flujo (Huang *et al.* 2008), imágenes *in vivo* (Charlton *et al.* 1997), HPLC (Michaud *et al.* 2003, Muller *et al.* 2008) y microarrays (Brody *et al.* 1999, Bock *et al.* 2004). Los aptámeros también pueden emplearse en otras aplicaciones analíticas como cromatografía, espectrometría de masas, unidos a nanopartículas, SPR, sensores y biosensores, etc. ya que son herramientas moleculares importantes para la identificación de dianas y para estudios diagnósticos y terapéuticos (Tombelli *et al.* 2005, Lao *et al.* 2015, Ruiz Ciancio *et al.* 2018).

El aptámero frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Pegaptanib, también denominado Macugen[®]) fue aprobado en 2004 para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (AMD), siendo el único aprobado por la FDA hasta la fecha. Este fármaco inhibe a la isoforma del VEGF implicada en AMD, reduciendo el crecimiento patológico de ciertos vasos sanguíneos (Chakravarthy 2006). Actualmente el uso de este aptámero de RNA ha sido relegado debido a la aparición de anticuerpos más efectivos. Sin embargo, existen muchos otros aptámeros en distintas fases de estudio clínico (**Tabla III**). Como se muestra, sólo dos aptámeros han entrado en ensayos clínicos para terapia en cáncer: AS1411 y NOX-A12. El primero fue AS1411, un aptámero de DNA que se une a la nucleolina, una proteína que se encuentra sobreexpresada en la membrana de las células cancerosas y promueve la expresión de VEGF, y por tanto, la angiogénesis. AS1411 también se internaliza y desestabiliza el mRNA de Bcl-2 reduciendo su síntesis e induciendo apoptosis. (Nimjee *et al.* 2017, Poolsup *et al.* 2017, Kaur *et al.* 2018). Se ha evaluado clínicamente en fases I y II en el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda y con carcinoma renal. NOX-A12 es un aptámero L-RNA o Spielgamer frente al ligando 12 de la quimioquina CXC (CXCL12), una proteína que juega un papel importante en la proliferación tumoral y promueve la angiogénesis y la metástasis. NOX-A12 ha estado implicado en dos ensayos diferentes: fue evaluado en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL) y en un estudio en fase II con pacientes con mieloma múltiple. Recientemente ha comenzado un estudio abierto en fase I/II para evaluar su eficacia en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal y con cáncer pancreático (Poolsup *et al.* 2017, Kaur *et al.* 2018, Ruiz Ciancio *et al.* 2018).

Tabla III. Ensayos clínicos de aptámeros terapéuticos recientes y actuales.

Aptámero	Aplicación	Fase Clínica
Pegaptanib	Degeneración macular relacionada con la edad tipo húmedo	Aprobado (17/12/2004)
Pegaptanib	Edema macular diabético isquémico	Fase IV completada (23/12/2014)
Pegnivacogen	Enfermedades de arterias coronarias	Fase III terminada (22/10/2014)
E10030	Degeneración macular relacionada con la edad tipo húmedo	Fase III (Última actualización 19/05/2016)
Zimura	Degeneración macular relacionada con la edad tipo seco	Fase II/III (Última actualización 11/10/2016)
AS1411	Carcinoma de células renales	Fase II (Última actualización 24/09/2009)
NOX-E36	Albuminuria y diabetes mellitus tipo 2	Fase II completada (21/02/2014)
NOX-A12	Leucemia linfocítica crónica	Fase II (Última actualización 22/01/2016)
EYE001	Degeneración macular relacionada con la edad tipo húmedo	Fase I completada (03/03/2008)
ARC19499	Hemofilia	Fase I terminada (26/06/2015)
NOX-H94	Anemia crónica por inflamación	Fase I completada (22/01/2016)

Tabla tomada de Poolsup et al., 2017 (Poolsup et al. 2017).

En 2015, nuestro laboratorio caracterizó el aptámero apMNK2F frente a MNK1b capaz de inhibir la proliferación, la migración y la formación de colonias en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Garcia-Recio *et al.* 2016). En un trabajo de Abnous y colaboradores (Abnous *et al.* 2017), utilizaron el aptámero apMNK2F acompañado con otros dos aptámeros que actúan frente a dianas de células cancerosas: el aptámero AS1411, descrito previamente, y el aptámero IDA frente a la Integrina $\alpha 6\beta 4$. Los aptámeros AS1411 e IDA se utilizaron como vehículos para internalizar apMNK2F vía sus receptores, los cuales están sobreexpresados en la membrana de las células cancerígenas empleadas en su estudio, PC-3 y 4T1. Este complejo de tres aptámeros fue capaz de reducir entre un 70-80% la viabilidad celular en células 4T1 y PC-3, e inducir la apoptosis. El análisis de la eficacia antitumoral indicó que el

volumen del tumor aumentó hasta casi 40 veces en los ratones sin tratar, mientras que en los tratados con el complejo apMNK2F-AS1411-IDA el aumento fue de 6 veces (Abnous *et al.* 2017)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El cáncer de mama es una enfermedad que afecta con mayor incidencia a las mujeres, siendo el quinto tipo de tumor con mayor mortalidad en la población mundial (Bray *et al.* 2018). Aunque cada vez existen más opciones terapéuticas, hay dos aspectos que aún siguen sin resolverse. Por un lado, el hecho de que aparezca resistencia a muchos tratamientos y, por el otro, que aún no se hayan identificado dianas terapéuticas para los tumores de tipo Triple-negativo.

En nuestro laboratorio se seleccionaron y caracterizaron aptámeros contra MNK1b (Garcia-Recio *et al.* 2016), una proteína quinasa que está sobeexpresada en diferentes tipos de tumores, y en concreto en los tumores de mama Triple-negativo (Pinto-Diez *et al.* 2018). De los aptámeros originalmente seleccionados frente a MNK1b, el aptámero apMNK2F fue capaz de inhibir la proliferación, la migración y la formación de colonias en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Garcia-Recio *et al.* 2016). En este trabajo nos hemos propuesto generar y caracterizar estructural y funcionalmente un aptámero optimizado que pueda llegar a ser utilizado como un fármaco antitumoral en el futuro.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Obtención y caracterización *in vitro* de aptámeros modificados derivados de apMNK2F.
2. Comprobación de la actividad antitumoral de los aptámeros optimizados en cultivos celulares de líneas tumorales de mama.
3. Estudio del efecto del aptámero modificado seleccionado sobre la formación de tumores inducida en animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos químicos generales y material de laboratorio

Análisis de imagen: Image Quant^{TL} (GE Healthcare, Reino Unido)

Analizador de geles: Minibis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel)

Anticuerpos: los anticuerpos empleados y su titulación se detallan en las **Tablas V y VI**.

Aptámeros: los aptámeros utilizados en este estudio y sus secuencias aparecen detallados en la **Tabla VII**.

Centrífugas: B4i/BR4i Jouan de DJB (Labcare, Reino Unido), microfuga Mini-Spin[®] (Eppendorf, Alemania), Beckman J2-HS (Beckman Coulter, Alemania)

Citómetro de flujo: FACSCaliburTM (BDBiosciences, EEUU)

Equipo para el revelado fotográfico: Fuji Photo Film CO.LTD. (Fujifilm, Japón)

Escáner: Perfection 2450 (Epson, Japón)

Espectrofotómetros: Infinite F200 (TECAN, Suiza), NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific, EEUU).

Inhibidores: los inhibidores de fosfatasa y proteasas fueron suministrados por Sigma-Aldrich (EEUU) y Merck (Alemania).

Membranas de transferencia: PVDF Hybond-P y nitrocelulosa (GE Healthcare, Reino Unido)

Método de revelado: ECLTM y ECL-AdvanceTM (GE Healthcare, Reino Unido); ClarityTM Western ECL Substrate (BioRad, EEUU); Sustrato BCIP y NBT (BioRad, EEUU)

Microscopio: Olympus IX70 (Olympus, Japón)

Oligonucleótidos: los oligonucleótidos y sus secuencias aparecen en la **Tabla IV**.

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

Películas fotográficas: de sensibilidad normal, Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm, Japón); hipersensibles Amersham Hyper-filmTM ECL (GE Healthcare, Reino Unido).

Sistemas de electroforesis, isoelectroenfoque y transferencia: equipo Mini-Protean II y III para electroforesis y sistema de transferencia húmeda (BioRad, EEUU); equipo Multiphor II para IEF (GE Healthcare, Reino Unido) y equipo de Nova Blot para sistema de transferencia

semi-seca (GE Healthcare, Reino Unido). El marcador de peso molecular es de ThermoFisher Scientific (EEUU), y la acrilamida, bisacrilamida, y el resto de reactivos fueron suministrados por GE Healthcare (Reino Unido).

Termociclador: iQ5 Multicolor Real-Time PCR detection System (BioRad, EEUU).

Otros productos: desoxinucleótidos, sales, ácidos y bases inorgánicas, solventes orgánicos, detergentes, agarosa, reactivos etc. fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Panreac (España), Sigma (EEUU), Merck (Alemania) y BioRad (EEUU). El suero de ternera fetal, la glutamina, el piruvato sódico, y el antibiótico/antimicótico fueron suministrados por Gibco (ThermoFisher Scientific, EEUU). La lipofectamina 2000 fue suministrada por Invitrogen (Carlsbad, California. EEUU).

Tabla IV: Relación de oligonucleótidos utilizados en qPCR.

Aptámero	Secuencia
5' qabMNK	AGAAACAAGCAGGGCACAGT
3' qabMNK	TGCTTTTGCTTCTGGATGTG
5' qaMNK	AGCATCCAGGAAGGCAAGTA
3' qaMNK	GTCCCTTTTCTGGAGCTTGC
5' Fibroblast specific protein-1 (FSP1)	GCTCAACAAGTCAGAACTAAAGG
3' Fibroblast specific protein-1 (FSP1)	CTGTCCAAGTTGCTCATCAG
5' ocludina	AAGCAAGTGAAGGGATCTGC
3' ocludina	GGGGTTATGGTCCAAAGTCA

Tabla V. Relación de anticuerpos primarios empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Casa comercial	PM (kDa)	Tipo	Título
MNK1 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	52	Policlonal cabra	1/500
MNK1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	52/38	Policlonal cabra	1/500
eIF4E (Ser ²⁰⁹ P)	abcam, EEUU	25	Monoclonal conejo	1/2000
eIF4E	BD Biosciences, EEUU	25	Monoclonal ratón	1/2000
β-actina	Sigma Aldrich, EEUU	45	Monoclonal ratón	1/5000
AKT (Ser ⁴⁷³ P)	Cell Signaling, EEUU	60	Monoclonal conejo	1/2000
AKT	Cell Signaling, EEUU	60	Policlonal conejo	1/1000
p38 ^{di} (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸² P)	Sigma Aldrich, EEUU	40	Monoclonal ratón	1/2000
p38	Sigma Aldrich, EEUU	40	Policlonal conejo	1/5000
ERK1/2 ^{di} (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵ P)	Sigma Aldrich, EEUU	42/44	Monoclonal ratón	1/5000
ERK1/2	Sigma Aldrich, EEUU	42/44	Policlonal conejo	1/5000
4E-BP1	Cell Signaling, EEUU	18	Policlonal conejo	1/1000
MCL1	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	37	Policlonal conejo	1/200
espectrina	Millipore, EEUU	250/150/120	Monoclonal ratón	1/1000
Cleaved PARP (Asp ²¹⁴)	Cell Signaling, EEUU	89	Policlonal conejo	1/1000
PCNA (PC10)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	36	Monoclonal ratón	1/100

Tabla VI. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

Anticuerpo/especificidad	Casa comercial	Título
Frente a IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000
Proteína A conjugada con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000
Frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa	GE Healthcare, Reino Unido	1/5000
Frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa	GE Healthcare, Reino Unido	1/5000
Frente a IgG de cabra conjugado con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	1/10000

Tabla VII. Relación de aptámeros empleados en este trabajo

Aptámero	Secuencia
APMNK2FT	TTTTTGGGGTGGGCGGGCGGGGGTGGGGGTGGTATGGCGCGTTGGCCC
APMNKQ1	TGGGGTGGGCGGGCGGGG
APMNKQ2	TGGGGTGGGCGGGCGGGGGTGGGGGTGGT
APMNKQ3	GGGTGGGGGTGGT
APMNKQ4	GGGTGGTATGGCGCGTTGGCCC
20AT	GCGGATGAAGACTGGTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTT TTTTTTGCCCTAAATACGAGCAAC

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

MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

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

MCF 7 (ATCC® HTB-22™): Línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de mama humano. Estas células se caracterizan por expresar el receptor de estrógenos (ER+), de progesterona (PR+) y no sobreexpresar el receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-). Comprobadas en junio de 2016 utilizando el Sistema GenePrint® 10 System.

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™): Línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de mama humano. Se caracterizan por ser células Triple-negativo: ER-, PR- y HER2-. Comprobadas en junio de 2016 utilizando el Sistema GenePrint® 10 System.

MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™): Línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de mama humano. Se caracterizan por ser células Triple-negativo: ER-, PR- y HER2-. Comprobadas en noviembre de 2017 utilizando el Sistema GenePrint® 10 System.

Las células MCF7 y las MDA-MB-231 se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm² con medio completo DMEM:Ham's F12 (Biowest SAS, Francia) en proporción 1:0.8 suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina, en un incubador a 37°C en ambiente saturado de humedad y con 5% CO₂/95% O₂.

Las células MDA-MB-468 se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm² con medio RPMI (Lonza, Suiza) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de piruvato, 1% de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina, en un incubador a 37°C con ambiente saturado de humedad y con 5% CO₂/95% O₂.

Las células se sembraron a distintas densidades en función del ensayo a realizar y de la placa. Así, se sembraron 1x10⁴ células/pocillo o 6x10³ células/pocillo para placas de 96 pocillos (p96), 3x10⁴ células/pocillo para placas de 24 pocillos (p24), 5x10⁵ células/pocillo o 2.5x10⁵ células/pocillo para placas de 6 pocillos (p6) y 1.5x10⁶ células/pocillo para placas p100. Para los experimentos de invasión y migración, en los que se emplearon transwell, la densidad fue de 4x10⁴ células/transwell. En los ensayos de formación de colonias, la densidad

fue de 1×10^3 células/pocillo para MDA-MB-231 y MCF 7 y de 5×10^3 células/pocillo para MDA-MB-468 en una placa de 6 pocillos.

Las células se levantaron químicamente utilizando tripsina 1x (Gibco, Reino Unido) previo lavado con PBS (tampón fosfato salino: fosfato sódico 10 mM pH 7.4, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2.7 mM) (BioMerieux, Francia) para eliminar los restos de suero del medio que interfieren con la actividad de la tripsina. Las células se recogieron de los frascos o de las placas de cultivo resuspendidas en su medio correspondiente, y se mezcló una alícuota de 90 μ L de las células junto con 10 μ L de azul tripán (Sigma-Aldrich, EEUU). Las células se contaron utilizando el contador TC20 (BioRad, EEUU), y se consideraron vivas aquellas que excluyeron el colorante. Los resultados se expresaron como número de células vivas/mL.

Para la conservación de las células, se almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido en suero bovino fetal con un 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EEUU) a densidad entre $3-5 \times 10^6$ células/mL. Los viales se descongelaron a 37°C y se centrifugaron a 400 g durante 5 min. Las células se resuspendieron en 8 mL del medio de cultivo que correspondiera según la línea celular y se sembraron en frascos de 25 cm^2 .

2. TRANSFECCIÓN Y PROCESAMIENTO CELULAR

2.1. TRANSFECCIÓN

Para tratar a las células con los distintos aptámeros analizados en este trabajo, así como para el tratamiento de los ratones en ensayos *in vivo*, se han utilizado distintos sistemas de transfección. Para la transfección de los aptámeros se utilizó el sistema de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, EEUU). La transfección de las células se llevó a cabo 16-24 horas después de haber sido sembradas y habiendo alcanzado el 70-80% de confluencia. Para la transfección en el modelo *in vivo* se utilizó el sistema de transfección *in vivo*- jetPEI® (Polyplus, Francia).

Antes de ser utilizados los aptámeros tienen que ser estructurados. Para ello, se disuelven en tampón de aptámeros (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl_2 1 mM y KCl 5 mM), se desnaturalizan a 90°C durante 10 min y posteriormente se renaturalizan en hielo durante 10 minutos.

2.1.1 Transfección con lipofectamina

Se utilizó Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, EEUU) según las indicaciones del fabricante, ajustando los reactivos a cada densidad celular, el tipo de placa y el ensayo realizado. Para preparar el complejo DNA-lipofectamina, primero se diluyó por un lado la lipofectamina y por otro el DNA en opti-MEM (Gibco, EEUU), y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se mezclaron para formar los complejos lipofectamina-DNA y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió la mezcla sobre las células que habían sido lavadas dos veces con medio sin antibiótico para evitar la interferencia de éste con la lipofectamina. Las células se incubaron a 37°C durante 5 horas, tras las cuales se retiró el reactivo y se añadió medio completo.

2.1.2 Transfección con *in vivo*-jetPEI®

Los complejos aptámero-jetPEI® se realizaron utilizando el sistema de transfección *in vivo*-jetPEI® (Polyplus, Francia). Se utilizó en cultivos de los distintos tipos celulares a las 16-24 horas después de haber sido sembrados, y también se inyectó a los ratones en los ensayos *in vivo* según se detalla en el apartado 8.1. Los complejos se prepararon según indicaciones del fabricante. Tanto el aptámero™ como el jetPEI® se prepararon en glucosa por separado, para luego añadir el complejo jetPEI® sobre el del aptámero de forma que la concentración final de la glucosa sea del 5%. Los complejos jetPEI®-aptámero se añadieron a los cultivos o se inyectaron a los animales, según el ensayo.

2.2 PROCESAMIENTO CELULAR

2.2.1 Obtención de lisados celulares

Las células se recogieron químicamente como se ha descrito en el apartado 1 y se lavaron una vez con tampón A en frío (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, ditiotretitol (DTT) 1 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM, molibdato sódico 10 mM, β-glicerofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, cloruro potásico 120 mM, 10 µg/mL de antipaína y 1 µg/mL de pepstatina A y leupeptina) centrifugándolas a 400 g durante 5 min, con la finalidad de retirar las células muertas. A continuación, las células se lisaron con el mismo tampón A en presencia de 1% tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EEUU) en proporción 1:2 en volumen (el volumen de las células es el que ocupa el sedimento tras la centrifugación) y se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. Después se recogió el sobrenadante (lisado celular), se determinó la concentración de

proteínas de la muestra mediante el kit BCA (Pierce™ ThermoFisher Scientific, EEUU), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.2.2 Obtención de RNA

Para la extracción de RNA total, se prepararon 5×10^6 células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 en medio, y se centrifugaron 5 minutos a 400 g. El sedimento de células se resuspendió en 1 mL de reactivo NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, Alemania) y se continuó el protocolo según las instrucciones del fabricante.

La pureza y la integridad de los RNAs obtenidos se analizaron utilizando el chip Experion™ RNA HighSens Analysis Kit (BioRad, EEUU).

3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Se empleó el sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas Miniprotean II y III Cell (BioRad, EEUU) y geles de poliacrilamida del porcentaje adecuado para cada experimento en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). Como agentes polimerizantes se utilizaron N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED) al 0.86% y persulfato amónico a una concentración final de 0.45 mg/mL. La electroforesis se realizó en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0.1%, y con tampón de electroforesis (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, Glicina 192 mM y SDS al 0.1%). Las muestras se prepararon en tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 180 mM pH 6.8, 9% de SDS, 6% de β -mercaptoetanol, 15% de glicerol, 0.025% de azul de bromofenol) y se resolvieron a 200 V durante 1 h, junto con el marcador de peso molecular (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, ThermoFisher Scientific, EEUU). A continuación, el gel fue transferido a una membrana donde se detectaron las proteínas por inmunodetección (western blot).

3.2. ISOELECTROENFOQUE HORIZONTAL (IEF)

Esta técnica se realizó mediante el equipo Multiphor II (GE Healthcare, EEUU). Se polimerizaron geles de 0.75 mm de espesor con la siguiente composición: acrilamida-bisacrilamida premezclada al 5% (30%T, 2.6%C), urea 8.6 M y anfolitos 2% con un rango de

pH 4-6. Se utilizaron TEMED 0.86% y persulfato amónico a concentración final de 2.14 mg/mL, como agentes polimerizantes. También se utilizaron una solución catódica (NaOH 20 mM) y una solución anódica (H₃PO₄ 10 mM). Los electrodos se colocaron en el gel a una distancia de 10 cm. El gel se pre-enfocó durante 30 minutos a 500 V y a 12°C. Las muestras (35-50 µg), que se aplicaron a 2 cm del ánodo mediante un aplicador, se enfocaron en las mismas condiciones durante 30 minutos y, posteriormente, a 2000 V durante 2 horas (alcanzando dicho voltaje de manera progresiva).

3.3. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN

Las proteínas resueltas mediante electroforesis fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) o a membranas de nitrocelulosa (según anticuerpo).

Para la electroforesis SDS-PAGE, el sistema de transferencia utilizado fue un sistema continuo y húmedo en Tris-Glicina/Metanol (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, Glicina 192 mM y Metanol 20%). Antes de utilizarlas, las membranas de PVDF fueron activadas durante 1 minuto en metanol seguido de 1 lavado de 3 minutos en agua y se equilibraron 5 minutos en la solución de transferencia. Las membranas de nitrocelulosa se activaron 1 minuto en agua y se equilibraron 5 minutos en la solución de transferencia. Asimismo, los papeles de transferencia y las esponjas también se mojaron en la solución de transferencia. Sobre el soporte del cátodo se colocó una esponja, 4 papeles humedecidos, el gel, la membrana previamente activada, 4 papeles, otra esponja y el soporte del ánodo hacia donde se desplazarán las proteínas. La transferencia de proteínas se realizó a 100 V durante 1 hora.

En el caso del IEF se utilizó un sistema de transferencia discontinuo con distintos tipos de tampones: una solución anódica 1 (Tris 0.3 M pH 10.4), una solución anódica 2 (Tris 0.1 M pH 10.4) y una solución catódica (arginina 0.1 M, SDS 0.01%). La membrana de PVDF se equilibró 20 minutos en solución anódica 2. Sobre la placa del cátodo de transferencia se colocaron 8 papeles de transferencia mojados previamente en la solución catódica, el gel, la membrana de PVDF y 3 papeles de transferencia humedecidos en la solución anódica 2. Finalmente se pusieron encima 6 papeles mojados en la solución anódica 1. Se realizó la transferencia del sistema durante 2 horas a 0.8 mA/cm². Los marcadores de punto isoeléctrico de referencia se tiñeron con el colorante Fast-Green (fast-green 0.1%, metanol 25%, ácido acético 10%) como control positivo de referencia.

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

- Con fosfatasa alcalina: se añade azul de nitrotetrazolio/x-fosfato (NBT) 30 mg/mL y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 15 mg/mL, diluidos 1/100 en tampón AP (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM).
- Quimioluminiscencia: con este sistema se utilizan anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, de forma que al añadir el sustrato de la enzima la emisión de luz es captada en una placa de rayos-X (Clarity™ Western ECL, BioRad, EEUU).

Las diluciones y los tipos de anticuerpos primarios y secundarios se detallan en la **Tabla V** y en la **Tabla VI**. La cuantificación de las bandas se realizó en un analizador de imágenes con el programa Image Quant^{TL}. Los datos fueron obtenidos en unidades de densidad óptica/mm².

La membrana fue reutilizada cuando se necesitó detectar la misma proteína con dos anticuerpos diferentes y también cuando se valoraron los niveles fosforilados y totales de una proteína. Para su reutilización se eliminaron el anticuerpo primario y secundario antes de proceder a la segunda inmunodetección. Esta eliminación se llevó a cabo incubando la membrana 30 minutos a temperatura ambiente en solución *Re-Blot Plus Strong Solution* (Millipore, EEUU) según las indicaciones del fabricante.

4. ENSAYOS

4.1 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS APTÁMEROS

Para analizar la estabilidad de los aptámeros frente a la actividad de nucleasas se llevaron a cabo dos tipos de experimentos.

4.1.1 Ensayos de DNasa I

Estos ensayos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 10 µL. Para ello, 300 ng del aptámero apMNK2FT o 1 µg del aptámero apMNKQ2 (previamente estructurados) fueron incubados en presencia de 0.25, 0.5 ó 1 unidad del enzima DNasa I (ThermoFisher Scientific, EEUU) durante 5 minutos a 37°C y, posteriormente, la reacción se detuvo añadiendo 1 µL de EDTA 50 mM (ThermoFisher Scientific, EEUU) y calentando a 65°C durante 10 minutos.

En el caso de apMNK2FT, se añadió solución de carga 6x a las muestras y se cargaron en un gel de agarosa para su resolución mediante electroforesis. Para apMNKQ2, las muestras se analizaron utilizando un chip Experion™ DNA 1K Analysis Kit (BioRad, EEUU).

4.1.2 Ensayos de estabilidad en plasma

La realización de estos ensayos permitirá saber si el aptámero va a resistir la acción de los enzimas presentes en el plasma y, por tanto, si necesitará posteriores modificaciones para mejorar su resistencia, teniendo en cuenta su posible futuro terapéutico. El experimento consistió en incubar 2.4 µg de aptámero apMNKQ2 junto con 16 µL de plasma humano a 37°C. Se sacaron alícuotas de 5 µL de la solución de aptámero-plasma, a tiempos 0, 6, 24, 48 y 72 horas. Las alícuotas se calentaron a 65°C durante 10 minutos para inhibir la actividad de las nucleasas presentes en el plasma, y después se dejaron en hielo 10 minutos. Se conservaron a -20°C hasta obtener todas las alícuotas y por último se cargaron en un chip Experion™ DNA 1K Analysis Kit (BioRad, EEUU).

4.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD POR EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPÁN

Las células (viables y no viables) se recogieron de los frascos o las placas de cultivo resuspendidas en su medio correspondiente. Una alícuota de 40 µL de las células se mezcló con 10 µL de azul tripán (Sigma-Aldrich, EEUU). Las células se contaron utilizando el contador TC20 (BioRad, EEUU) y se consideraron vivas aquellas que excluyeron el colorante. Los resultados se expresaron como número de células vivas/mL.

4.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR. DETERMINACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LAS SALES DE TETRAZOLIO (MTT)

Como medida de la viabilidad celular se determinó la actividad de enzimas oxidoreductasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H en las células, analizando su capacidad para reducir las sales de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, EEUU) a un producto de azul formazán (Denizot et al. 1986) bajo distintas condiciones experimentales. Las células fueron sembradas en placas p96 y 48 horas después de haber sido transfectadas, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µL/pocillo de MTT a 1 mg/mL en medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 3 horas en incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂ y se adicionaron 100 µL/pocillo de una solución de lisis (10% SDS y 10 mM HCl) para la disolución de los cristales. Tras 16-24 horas, la reducción de MTT fue determinada por espectrofotometría en un equipo Infinite F200 (TECAN, Suiza) a 540

nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad con respecto al control o en unidades de absorbancia.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR POR LDH

Con la finalidad de medir la muerte celular por necrosis de las células, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad midiendo la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Esta enzima, presente en el citoplasma de las células, cataliza la reacción de NAD⁺ a NADH en presencia de L-lactato y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas que se han visto afectadas por un agente tóxico. Así, el aumento de la actividad de la enzima en el sobrenadante es proporcional al número de células lisadas. En este ensayo se produce la reducción de la sal de tetrazolio hasta formar formazán.

Las células fueron sembradas en p96 y transfectadas a las 16-24 horas tras la siembra. Transcurridas 48 horas tras la transfección, se recogieron los sobrenadantes celulares y se añadió el reactivo LDH del kit Citotoxicity Detection kit (LDH) (Roche, EEUU) según las especificaciones del fabricante. Después de incubar 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, la reacción se detuvo con HCl 1M. Por último, el formazán solubilizado se midió en el espectrofotómetro Infinite F200 (TECAN, Suiza) a 490 nm. Además de medir la actividad de la LDH liberada al medio (LDH_m) después del tratamiento, se calcula la actividad LDH máxima que se podía liberar (LDH_{high}) mediante la lisis de las células con 0,2% de Tritón X-100 y la LDH liberada al medio por la actividad celular (LDH_{low}). Finalmente, los resultados fueron expresados como el % Citotoxicidad = $((LDH_m - LDH_{low}) / (LDH_{high} - LDH_{low}) \times 100)$, de cada punto experimental con respecto al del control.

4.5 ENSAYOS DE ANEXINA

La apoptosis es un proceso de muerte celular controlado bioquímicamente que ocurre de forma fisiológica en las células y que se puede ver desregulado en distintos procesos como en el cáncer. En células normales, la fosfatidil serina está localizada en la cara interna de la membrana celular en contacto con el citoplasma. Sin embargo, en células apoptóticas, se pierde la integridad de la membrana, provocando que la fosfatidil serina se trasloque hacia el exterior celular. La Anexina V, el anticoagulante vascular humano, es una proteína de unión a fosfolípidos que presenta una gran afinidad por la fosfatidil serina. La Anexina V marcada con un fluoróforo se une a la fosfatidil serina expuesta en la membrana de la célula apoptótica y permite identificar las células apoptóticas. Sin embargo, la Anexina V también puede

atravesar las membranas comprometidas de células muertas y unirse a la fosfatidil serina de la cara interna de la membrana celular, por lo que es necesario utilizar a la vez yoduro de propidio, un marcaje que se introduce en las células muertas y que ayudará a discriminar entre células apoptóticas y células necróticas.

Los ensayos se realizaron utilizando el kit Annexin V/FITC (AbCys, Francia). Se sembraron 5×10^5 células/pocillo en placas p6 transfectando las células 24 horas después. Transcurridas 24 horas de la transfección, las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS. Después se resuspendieron en Buffer de binding y se dejaron a una concentración de 1×10^6 células/mL. De la solución anterior, se separaron alícuotas de 10^5 células, tantas como tratamientos hubiera, y se añadieron los colorantes Anexina V y yoduro de propidio para tener: un control doble negativo (sin marcaje, células vivas), uno doble positivo para ambos marcajes (marcará células apoptóticas tardías y células necróticas) y células marcadas por separado con Anexina V y con yoduro de propidio. Se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se llevaron a un volumen final de 500 μ L con Buffer de binding. Por último, se pasaron las células por el citómetro de flujo (BD FACSCalibur™, BDBiosciences, EEUU) en un tiempo no superior a 1 hora tras el marcaje. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Flowing software 2.5.1.

4.6 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS

Los ensayos de formación de colonias se basan en la capacidad de una sola célula para formar una colonia, que ha de constar como mínimo de 50 células (Franken *et al.* 2006). Esta técnica se utiliza para determinar los efectos de agentes citotóxicos y de terapias antitumorales (Rafehi *et al.* 2011) permitiendo estudiar su efecto sobre la capacidad tumorigénica de las células, las cuales han perdido la inhibición por contacto.

Para la realización de estos ensayos se sembraron 3×10^4 células/pocillo en placas p24 considerándose cada 2 pocillos un punto experimental. A las 16-24 horas, las células se transfectaron con los aptámeros y 16-24 horas post-transfección las células de cada dos pocillos se recogieron juntas, se contaron y tras realizar las diluciones adecuadas, se resembraron 1×10^3 o 5×10^3 células/pocillo por duplicado en placas p6. Estas placas se dejaron en el incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂ durante 8-9 días. Transcurrido este tiempo, las colonias se fijaron con metanol (Merck, Alemania) durante 10 minutos, se tiñeron con giemsa al 0.02% (Sigma-Aldrich, EEUU) durante 30 minutos, se lavaron con agua para eliminar restos del colorante y se dejaron secar a temperatura

ambiente. Para contar las colonias se utilizó un bolígrafo contador de colonias (Heathrow Scientific® LLC, Reino Unido) y una lupa (1.75X) (Bel-Art Scienceware, EEUU). Los resultados se expresaron en número de colonias y se normalizaron en porcentaje respecto al control.

4.7 ENSAYOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN

Los ensayos de migración e invasión celular se realizaron utilizando transwells (Corning, USA), unos dispositivos de soporte permeables diseñados para producir un entorno para el cultivo celular que se parezca lo más posible al estado *in vivo* y que se usan para el estudio de líneas celulares tanto dependientes como independientes de la adhesión. Para los ensayos de migración, las células previamente transfectadas e incubadas durante 16 horas se privaron de suero durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron y se contaron. Posteriormente se sembraron 4×10^4 células en 300 μL de medio completo sin suero en el interior del transwell. Los transwell se introdujeron en pocillos de una placa p24 con un volumen final de 500 μL de medio completo con 10% SBF como quimio-atrayente en la parte inferior. Tras 24 horas de ensayo, se eliminó el medio tanto del interior del transwell como de la parte inferior del pocillo de la placa. La membrana del transwell, que contendrá las células que hayan migrado, se fijó sumergiendo éste en paraformaldehído al 4% durante 2 minutos seguido de 20 minutos en metanol al 100%. Después las células se tiñeron sumergiendo el transwell en una solución de Hoechst 30 μM durante 15 minutos y protegido de la luz. Por último, se hicieron dos lavados en PBS y se tomaron 5 fotografías de cada membrana del transwell utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus IX70). El número de células se analizó utilizando el programa ImageJ.

Para los ensayos de invasión las células se dejaron 18 horas en medio sin suero tras la transfección. Después, tras recogerlas y contarlas, se sembraron 4×10^4 células en medio sin suero en el transwell en el que previamente se había polimerizado una capa de 100 μL de matrigel (Corning, USA) y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Las células que no habían invadido junto con el matrigel se eliminaron pasando un hisopo estéril humedecido en agua. Las células que sí lo hicieron se fijaron, tiñeron y analizaron como se ha descrito en el párrafo anterior para la migración.

4.8 ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR POR HENDIDURA O HERIDA (*Wound healing assay*)

Estos experimentos se llevaron a cabo sembrando 5×10^5 células por pocillo en p6. A las 24 horas de la transfección, con una confluencia entre 90-100%, las células se trataron con mitomicina $1 \mu\text{M}$ durante 2 horas para detener su replicación. Tras el tratamiento, se retiró el medio de los pocillos y se practicó una hendidura o herida en cruz en el centro del pocillo con una punta de pipeta estéril. Se realizaron dos lavados con PBS para asegurar la completa eliminación de todas las células levantadas y/o muertas. Antes de reemplazar el PBS por medio de cultivo y dejarlo a 37°C , se capturó la imagen a tiempo 0 en el microscopio (Olympus IX70). Este proceso se repitió a 24 y a 48 horas. El análisis de las imágenes permitió medir la distancia entre los bordes de la herida y, por tanto, el cierre hasta completarse.

4.9 ENSAYOS DE CICLO CELULAR

Para la realización de estos ensayos, se sembraron 2.5×10^5 células por pocillo en P6 que se recogieron a las 24 horas de haber sido transfectadas con los aptámeros. Se realizaron dos lavados con PBS centrifugando a 400 g durante 5 minutos a 4°C entre ellos. Después del segundo lavado, 1×10^6 células se fijaron y permeabilizaron con 1 mL de etanol frío al 70% durante 30 minutos a -20°C . Tras el etanol se realizaron dos lavados con PBS a 4°C y tras el último las células se resuspendieron en 1 mL de una solución con Ioduro de propidio $50 \mu\text{g/mL}$ y RNAsa $100 \mu\text{g/mL}$. Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C en oscuridad y se pasaron por el citómetro de flujo (BD FACSCalibur™, BDBiosciences, EEUU). Por último, los datos fueron analizados mediante el programa Flowing software 2.5.1.

4.10 ZIMOGRAMA

El zimograma es una técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras como la descrita en el apartado 3.1. En este caso, el gel separador copolimeriza en presencia de gelatina al 10%. Esta técnica permite poner de manifiesto la actividad de proteinasas presentes en la muestra, puesto que serán capaces de degradar la gelatina del gel.

En este caso, para detectar la actividad de las metaloproteiniasas, se utilizaron los sobrenadantes de células transfectadas con apMKNQ2 o con el aptámero control durante 24 horas. Las muestras se prepararon en tampón de carga de electroforesis sin β -mercaptoetanol (Tris-HCl 180 mM pH 6.8, 9% de SDS, 15% de glicerol, 0.025% de azul de bromofenol) y se

resolvieron a 200 V durante 1 hora. A continuación, el gel se incubó con Tritón X-100 al 2.5% en agua durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se retiró el Tritón X-100 y se incubó con tampón de revelado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween 0.02%). Transcurridos 30 minutos, se retiró el tampón y se volvió a añadir tampón de revelado 16 horas a 37°C. Por último, el gel se tiñó con Coomassie y se capturó una imagen para cuantificar las bandas mediante el programa ImageQuant TL. La ausencia de tinción con azul de coomassie indica la degradación de la gelatina por la proteinasa.

4.11 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNAs

El análisis cuantitativo de los niveles de los mRNAs se realizó utilizando los RNAs obtenidos como se describe en el apartado 2.2.2. En primer lugar, se obtuvieron los cDNA con el kit SensiFAST™ cDNA synthesis kit (Bioline, Reino Unido) y se llevó a cabo una PCR a tiempo real en un termociclador IQ5 (BioRad, USA) con el kit FastGene IC Green 2x qPCR Universal Mix (NIPPON Genetics, Alemania). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla IV**. La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL que contiene: Mix 1x FastGene® IC Green, la pareja de oligonucleótidos a una concentración final de 0.3 µM y 0.75 µL de cDNA.

El protocolo de PCR utilizado fue el siguiente:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Tiempo (min)	T (°C)	T final (°C)
1	1	1	2.00	95	
2	45	1	0.05	95	
		2	0.30	60	
3	71	1	0.30	60	95

Para cuantificar los niveles de los mensajeros implicados en la transición Epitelio-Mesénquima (TEM), se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siguiendo la siguiente fórmula, utilizando como gen de referencia β -actina:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{en células transfectadas con apMNKQ2}} - \Delta Ct_{\text{en células transfectadas con aptámero control (AT)}}$$

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

Para cuantificar los niveles de MNK1a, se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{en línea celular}} - \Delta Ct_{\text{en MCF7}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{MNK1a}} - Ct_{\text{gen referencia}}$$

Para cuantificar los niveles de MNK1b, se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{MNK1ab}} - Ct_{\text{MNK1a}}) \text{ línea celular} - (Ct_{\text{MNK1ab}} - Ct_{\text{MNK1a}}) \text{ MCF7}$$

5. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS APTÁMEROS

5.1 Determinación de la estructura por RMN

Para realizar los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), los aptámeros se disolvieron en un tampón 10 mM fosfato potásico (pH 7.0) a una concentración de 10 μM . Los espectros de RMN se adquirieron en los espectrómetros Bruker Avance (Bruker, EEUU) de 600 MHz u 800 MHz y se procesaron con el software Topspin. El experimento NOESY se adquirió en agua a 35°C a un tiempo de mezcla de 150 ms y la supresión del agua se llevó a cabo con el módulo WATERGATE.

5.2 Dicroísmo circular

Los espectros de Dicroísmo Circular (DC) se realizaron en un espectrómetro Jasco J-720 (Jasco, EEUU) provisto de un accesorio de cubetas termoestable conectado a un baño refrigerante Neslab RP-100. Se utilizaron cubetas de 0.1 cm de paso óptico y 200 μL de capacidad. Para obtener los espectros de DC se realizó un barrido entre 220 y 320 nm.

6. ELONA

La técnica ELONA (Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay) es un ensayo cuantitativo basado en la interacción entre la molécula diana y el aptámero conjugado a una enzima, cuya actividad es capaz de generar productos detectables por colorimetría o fluorescencia. Para llevarla a cabo, se añadieron 200 ng de proteína/pocillo diluida en solución *coating* (KPL, EEUU) en un volumen final de 100 μL /pocillo a una placa de ELISA de 96 pocillos *Maxisorp Nunc* (ThermoFisher Scientific, EEUU). La placa se incubó toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se retiró el contenido de los pocillos para eliminar el exceso de proteína no unida a la placa, se hicieron 3 lavados con 200 μL /pocillo de tampón de aptámeros con BSA al 0.2% y tras el último lavado se añadieron 200 μL /pocillo de PBS-BSA 5% para bloquear

sitios de unión inespecífica. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y con agitación. A continuación, se volvieron a hacer 3 lavados con tampón de aptámeros con BSA al 0.2%. Después se añadieron los aptámeros a la concentración que correspondiera según el ensayo, en un volumen final de 100 μ L/pocillo de tampón de aptámeros sin BSA durante 1 hora a 37°C con agitación. Todos los aptámeros utilizados estaban marcados con biotina y habían sido previamente estructurados como se indica en el apartado 2.1. Transcurrido el periodo de incubación, el exceso de DNA no unido se eliminó con 3 lavados con el tampón de aptámeros de nuevo. Para la detección de la unión del aptámero a la proteína, se añadieron 100 μ L/pocillo de estreptavidina-peroxidasa (GE Healthcare, Reino Unido) diluida 1/1000 en tampón de aptámeros a 37°C durante 1 hora en agitación. Para la eliminación del exceso de estreptavidina peroxidasa se realizaron otros 3 lavados. Para el revelado de la placa se añadieron 100 μ L/pocillo de la solución ABTS (Roche, Suiza) y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente, adquiriendo medidas cada 10 minutos a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro Infinite F200 (TECAN, Suiza).

7. MODELOS ANIMALES

7.1. Ensayos en ratones con tumores de mama ortotópicos.

Los ensayos *in vivo* se realizaron con ratones atímicos a los que se inocularon las células MDA-MB-231 y se generaron tumores ortotópicos. Cuando estos tumores alcanzaron un volumen de 100 mm³, los ratones se repartieron aleatoriamente en dos grupos de 9 animales. Al grupo tratado (1 mg/Kg) se le inyectó vía intravenosa 100 μ l de glucosa al 5% que contenía 46 μ g de apMKNQ2 y 5.6 μ l de transfectante jetPEI (ratio N/P 6) tres veces por semana. Al grupo control se le inyectó la solución de glucosa al 5% que contenía el mismo volumen de reactivo in vivo-jetPEI y de buffer de aptámeros. Como parámetros de seguimiento se midieron el volumen tumoral, asumiendo que son elipsoides, y el peso de los animales.

7.2. Inmunohistoquímica en tumores de mama ortotópicos

La determinación inmunohistoquímica del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en los tumores de mama de ratón se realizó mediante el desparafinado y la rehidratación de las secciones, que posteriormente se sometieron a altas temperaturas y a presión para conseguir el desmascaramiento de los antígenos de interés. Este desmascaramiento se realizó con la incubación de las secciones en tampón citrato 10 mM en olla exprés a presión máxima durante 2 minutos. Después de realizar dos lavados rápidos con agua destilada y dos lavados de 5 minutos cada uno con TBS, se incubaron las secciones en solución de bloqueo (suero de ternera fetal 3% en TBS con 0.05% de tritón X-100) durante

30 minutos a temperatura ambiente. Después las muestras se incubaron con el anticuerpo primario PCNA (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) a una dilución 1:100 a temperatura ambiente durante toda la noche. Al finalizar la incubación se realizaron dos lavados de 5 minutos con TBS, y se amplificó y detectó la señal del anticuerpo primario mediante el kit Master Polymer Plus Detection System Peroxidase (Master Diagnóstica, España) según las especificaciones del fabricante. Por último, las muestras se tiñeron con hematoxilina y se montaron en portas con medio de montaje DEPEX. La cuantificación de los núcleos positivos se realizó con el módulo IHC del programa informático ImageJ.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para determinar si las diferencias entre la media de los distintos grupos experimentales fueron o no significativas con respecto a las muestras control, se utilizó el análisis estadístico de la “t” de Student para datos emparejados, y el análisis de la varianza (ANOVA) para grupos no emparejados. Cuando este análisis resultó significativo, se realizó a continuación el Test de Tukey’s. La significación estadística se expresó como: * o c, $p < 0.05$ (significativo); ** o b, $p < 0.01$ (muy significativo); *** o a, $p < 0.001$ (altamente significativo). El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático GraphPad Prism® versión 6.0.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE apMNK2FT

1.1 Caracterización estructural de apMNK2FT

La estructura del aptámero apMNK2F, descrito previamente en nuestro laboratorio (García-Recio *et al.* 2016), fue analizada *in silico* mediante los programas informáticos mFold y QGRS Mapper. De este análisis surgió la posibilidad de trincar este aptámero para eliminar regiones que, a priori, no supondrían un impedimento para su unión a la diana y que a su vez harían de él un aptámero más pequeño, más barato de sintetizar, más fácil de administrar, etc. Como se muestra en la **Figura 4**, se eliminaron los primeros 19 nucleótidos del extremo 5' que se sustituyeron por 5 timinas para añadir un extensor y los últimos 14 nucleótidos del extremo 3'. En total se eliminaron 33 nucleótidos del aptámero precursor apMNK2F de 75 nucleótidos para sintetizar el aptámero truncado apMNK2FT de 48 nucleótidos.

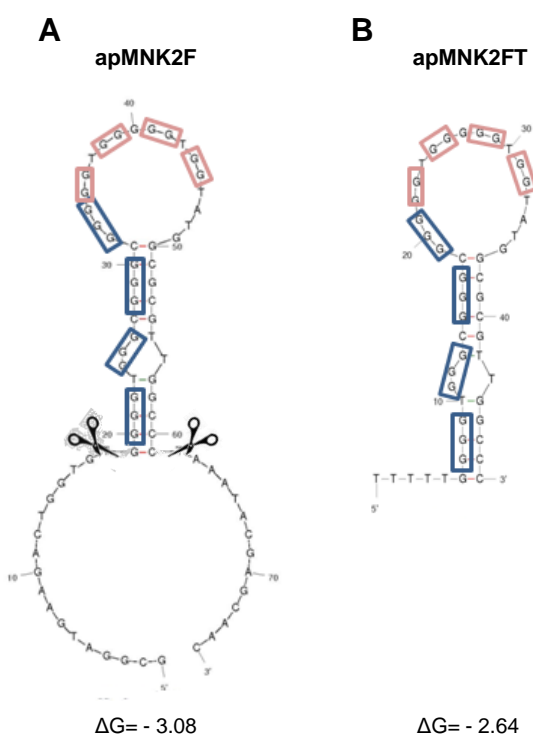


Figura 4. Estructuras secundarias y G-quadruplex. Representación gráfica de la predicción de estructuras secundarias y G-quadruplex del aptámero precursor apMNK2F y del aptámero truncado apMNK2FT mediante el análisis bioinformático de las secuencias con los programas mFold y QGRS Mapper. **(A)** apMNK2F y **(B)** apMNK2FT.

Tras el análisis de la secuencia mediante el programa mFold, se observó que el aptámero truncado apMNK2FT mantenía la estructura y un valor de energía libre de Gibbs muy similar al del aptámero parental apMNK2F (ΔG -2.64 y ΔG -3.08, respectivamente). Por

otra parte, la composición nucleotídica de los aptámeros es relevante para su estabilidad. Así, la mayoría de los aptámeros identificados hasta el momento suelen tener una elevada cantidad de guanina y citosina. apMNK2F posee un porcentaje del 66.7% en GC y este porcentaje aumenta hasta un 73% en la forma truncada apMNK2FT, lo que le conferiría una mayor estabilidad. Por último, el análisis con el programa QGRS Mapper indica que la estructura *G-quadruplex* presente en apMNK2F se conserva en apMNK2FT. Todos estos resultados indicarían que la nueva molécula podría mantener su actividad.

Puesto que el análisis *in silico* indicaba que apMNK2FT presenta estructuras *G-quadruplex*, se realizaron estudios estructurales mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Dicroísmo circular (DC). En la **Figura 5A** se representa la región imino del espectro monodimensional (1D) de protón de apMNK2FT en 10 mM fosfato potásico (pH 7) a diferentes temperaturas. A baja temperatura se observan señales anchas que indican la formación de agregados y también aparece una señal muy ancha en una posición típica de pares de bases tipo Watson-Crick GC (13 ppm). A medida que aumenta la temperatura, estas señales imino se van estrechando y a 45°C aparecen señales más definidas que indican la presencia de una única conformación. Estas señales imino comprendidas entre 11 y 12 ppm son indicativas de formación de *quadruplex* con tétradas de guaninas. La **Figura 5B** muestra las intensidades de señales NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) entre los protones H1' y H8 de guaninas que no son fuertes, lo que confirma una conformación tipo anti para el ángulo glucosídico de las guaninas. Este dato es consistente con la formación de un *quadruplex* paralelo.

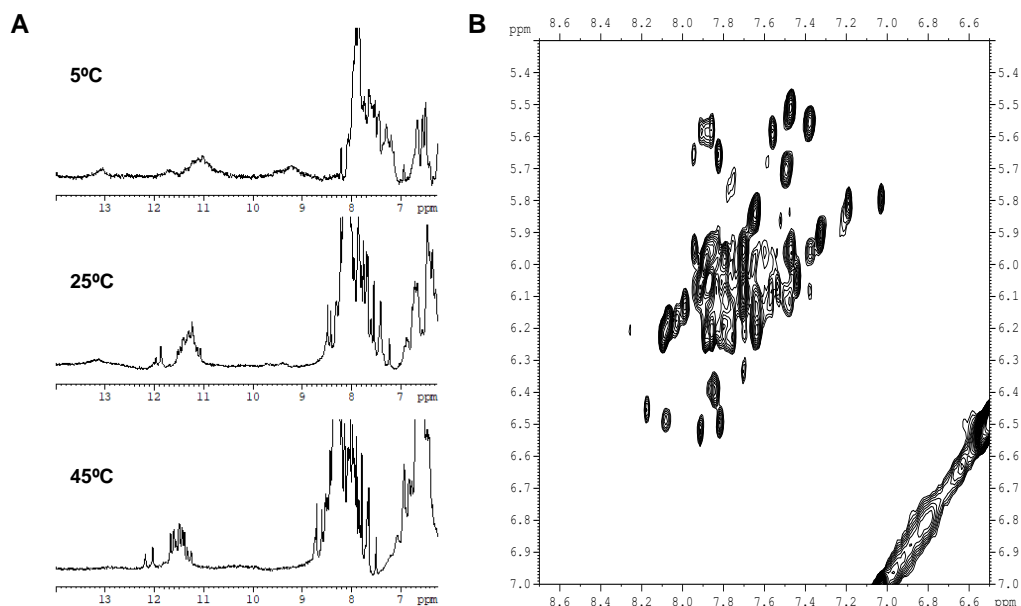


Figura 5. Análisis estructural de apMNK2FT. (A) Región imino del espectro 1D de protón de apMNK2FT en tampón fosfato 10 mM, pH 7 a diferentes temperaturas. **(B)** Región H1'-aromático del espectro NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) de apMNK2FT en tampón fosfato 10 mM a pH 7 ($\tau_m = 150$ ms).

Por otro lado, en la **Figura 6** se muestra el espectro de dicroísmo circular de apMNK2FT con las mismas condiciones salinas que los experimentos de RMN. El máximo a 250 nm indica que se trata de un *quadruplex* paralelo bastante estable porque mantiene el mismo perfil a 5 y a 35°C.

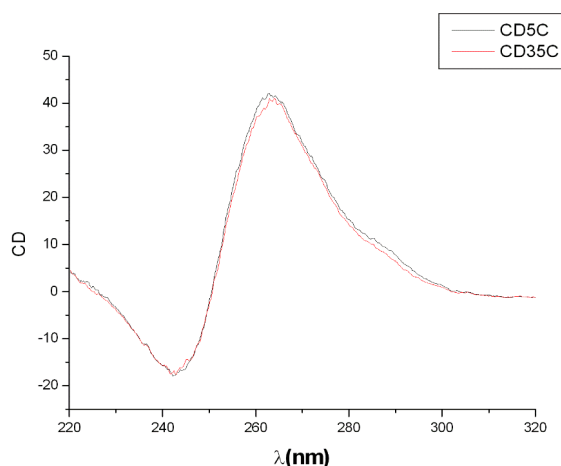


Figura 6. Estudio estructural mediante dicroísmo circular. Espectro de dicroísmo circular (DC) de apMNK2FT a 5°C (negro) y 35°C (rojo), que indica *G-quadruplex* paralelo estable.

Todos estos resultados demuestran que apMNK2FT posee estructuras *G-quadruplex* tal como predecían los estudios *in silico* para apMNK2FT y el aptámero original apMNK2F.

1.2 Caracterización de la interacción de apMNK2FT con MNK1

Se realizaron ensayos ELONA para analizar la afinidad del aptámero truncado apMNK2FT por la proteína MNK1b. Para ello, se incubó la proteína GST-MNK1b con concentraciones crecientes del aptámero marcado con biotina. Los datos obtenidos se analizaron mediante una regresión no lineal, mostrando que responden a una curva hipérbola cuya ecuación es $y = (x B_{max}) / (x + K_D)$, donde B_{max} es la unión máxima y K_D (constante de disociación) es la concentración de aptámero requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima. Así, el aptámero apMNK2FT es capaz de detectar la proteína MNK1b de forma dependiente de la concentración con una K_D de 8.47 ± 1.1 nM (**Figura 7A**).

Por otra parte, se estudió la afinidad de apMNK2FT por las dos isoformas de MNK1, MNK1a y MNK1b, mediante ensayos ELONA. Además, con idea de identificar la posible región de MNK1 reconocida por el aptámero, se utilizaron como dianas las construcciones

MNK1a Δ 77 que tiene la secuencia de MNK1a, pero el tamaño de MNK1b, y MNK1 Δ Ct que tiene la secuencia de MNK1a, pero ha perdido los 89 aminoácidos del extremo C-terminal (**Figura 7B**). Los resultados indicaron que el aptámero apMNK2FT reconocía de manera similar a ambas isoformas de MNK1, así como la forma truncada de MNK1a (MNK1a Δ 77), mientras que no reconocía a MNK1 Δ Ct de forma estadísticamente significativa (**Figura 7C**).

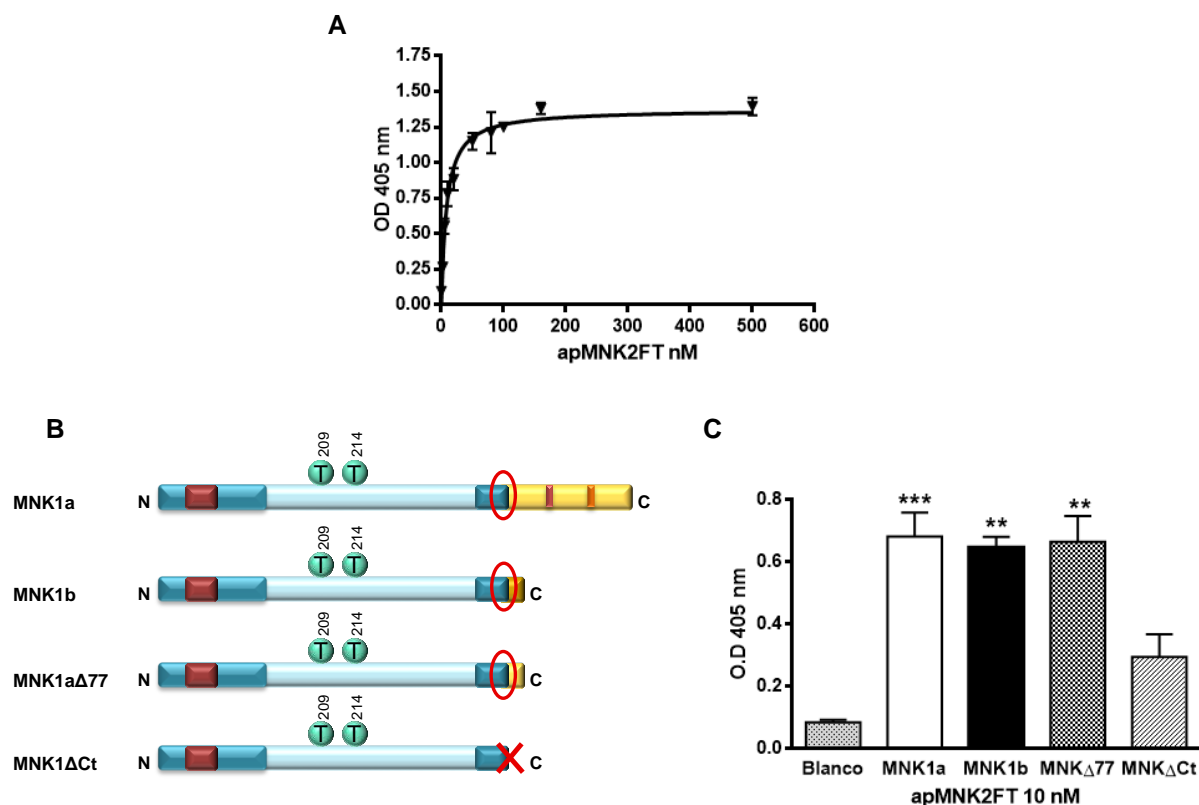


Figura 7. Caracterización de la interacción del aptámero apMNK2FT con MNK1 mediante ELONA. **(A)** ELONAs de apMNK2FT marcado con biotina (apMNK2FT-Bio) a concentraciones de 0 a 500 nM frente a GST-MNK1b previamente adsorbida en p96 a 0.2 μ g/pocillo (3 pmol/pocillo). La gráfica representa la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes. **(B)** ELONAs en los que apMNK2FT-Bio a 10 nM se incubó con las proteínas previamente adsorbidas en la placa a 0.2 μ g/pocillo. Las barras representan la media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al blanco). **(C)** Representación de las MNKs.

Estos resultados sugieren que apMNK2FT ha perdido en parte la afinidad y especificidad por MNK1b dado que apMNK2FT es capaz de detectar la proteína con una K_D algo inferior (1.79 ± 0.48 nM) y se une con mayor afinidad a MNK1b que a MNK1a y MNK1a Δ 77 (García-Recio *et al.* 2016). Teniendo en cuenta la secuencia inicial, los nucleótidos eliminados podrían estar favoreciendo la unión del aptámero a la proteína al plegarse, haciéndola más estable y afín.

1.3 Estudio de la estabilidad del aptámero apMNK2FT en presencia de DNAsa.

La resistencia del aptámero a la acción degradativa de las endonucleasas se midió incubando 300 ng de apMNK2FT estructurado en presencia de tres concentraciones de DNAsa I, tal y como se describe en el apartado 4.1.1 de Materiales y métodos. En la **Figura 8** se puede apreciar que la DNAsa I produce la degradación del aptámero tras 5 minutos de incubación en comparación con el control, especialmente en el punto de mayor concentración de enzima en la que la degradación es casi un 90% (88% con 1 unidad, 60% con 0.5 unidades y 35% con 0.25 unidades).

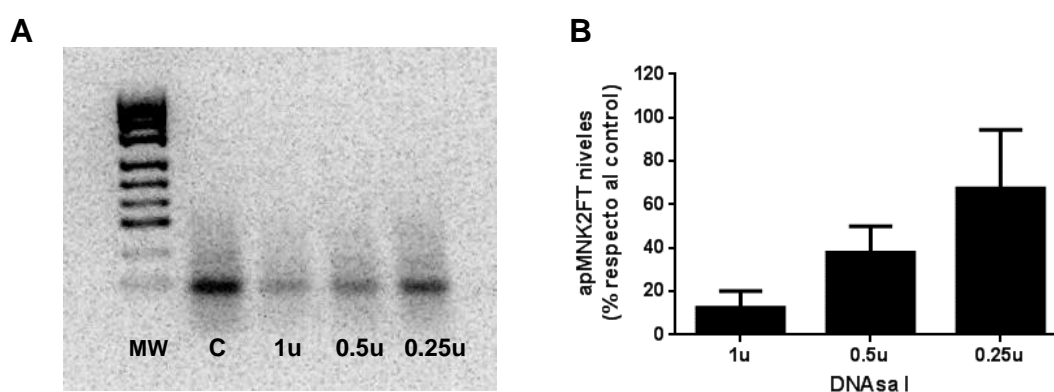


Figura 8. Estabilidad de apMNK2FT en presencia de endonucleasa. (A) El aptámero se incubó con concentraciones decrecientes de enzima desde 1 unidad hasta 0.25 unidades durante 5 minutos. En C (control) se muestra el aptámero sin incubarse con DNAsa I. (B) Cuantificación de los niveles de apMNK2FT tras el ensayo con DNAsa I. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

1.4 Efecto de apMNK2FT sobre la proliferación, formación de colonias y migración.

La capacidad del aptámero apMNK2FT para inhibir la proliferación celular se analizó en la línea tumoral Triple-negativo MDA-MB-231, en la que previamente habíamos demostrado que su precursor apMNK2F inhibía la proliferación (García-Recio *et al.* 2016), y en la línea tumoral MCF7 representativa del subtipo molecular Luminal. Las células se transfectaron con concentraciones crecientes de apMNK2FT (0, 25, 50, 250 y 500 nM) y se midió la actividad MTT a las 48 horas. Como se muestra en la **Figura 9**, el aptámero apMNK2FT disminuyó la viabilidad tanto de las células MCF7 como de las MDA-MB-231 de forma dependiente de la concentración, obteniéndose valores de GI50 (máxima concentración a la que se produce el 50% de la inhibición del crecimiento celular) de 75 y 560 nM, respectivamente.

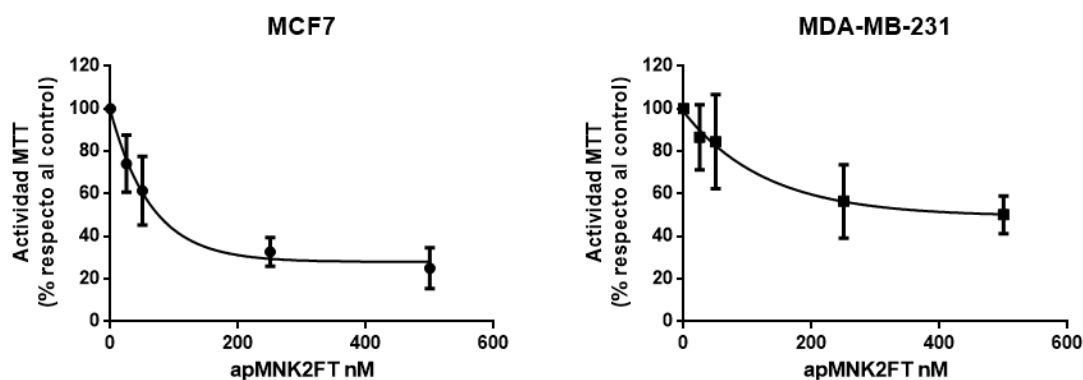


Figura 9. Efecto de apMNK2FT sobre la actividad MTT de las células MCF7 y MDA-MB-231. Las células MCF7 y MDA-MB-231 se sembraron en placas p96 a una densidad de 10^4 células/pocillo. Tras 16-24 horas se transfectaron con apMNK2FT a 0, 25, 50, 250 y 500 nM durante 48 horas, tras las cuales se realizaron ensayos de actividad MTT. Las gráficas representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, y se ajustan a una curva non-fit del programa GraphPad Prism 6.0.

Para analizar el efecto de apMNK2FT sobre la capacidad clonogénica de las células MCF7 y MDA-MB-231, se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias tal como se describe en el apartado 4.6 de Materiales y métodos. Las células se transfectaron con 250 nM de aptámero apMNK2FT y tras 16-24 h se resembraron en placas p6 a una densidad de 10^3 células/pocillo. Tras 8-9 días, las colonias se fijaron con metanol, se tiñeron con Giemsa y se contaron. A partir de la cuantificación de las colonias se calculó el porcentaje de colonias formadas respecto al número de células sembradas (PE, Plating efficiency), obteniéndose valores similares de 26.9 ± 3.5 % y 23.4 ± 4.1 % para MCF7 y MDA-MB-231, respectivamente. Los resultados muestran que el aptámero apMNK2FT disminuye de manera significativa la formación de colonias en ambas líneas celulares (55 y 75%) (**Figura 10A**).

Para analizar la capacidad del aptámero de inhibir la migración de las células se utilizó el ensayo de cierre de herida o *Wound healing* descrito en apartado 4.8 Materiales y métodos. Primero se transfectaron las células con apMNK2FT a la concentración final de 250 nM con lipofectamina 24 horas después de la siembra. Transcurridas 16-24 horas post-transfección, las células se trataron con mitomicina $1 \mu\text{M}$ y se incubaron 2 horas a 37°C tras las cuales se retiró el medio a los pocillos. A continuación, se practicó una hendidura o herida con la punta de una pipeta, se añadió medio nuevo y las células se incubaron durante otras 24 horas, registrándose la evolución de los cultivos a 0 y 24 horas mediante micrografías. Como se muestra en la **Figura 10B**, el cierre de la herida fue menor en las células MDA-MB-231 transfectadas con el aptámero respecto al control (53% versus 60% respectivamente), aunque

no fue significativo. Sin embargo, no se pudo observar ningún efecto del aptámero sobre la migración celular en las células MCF7.

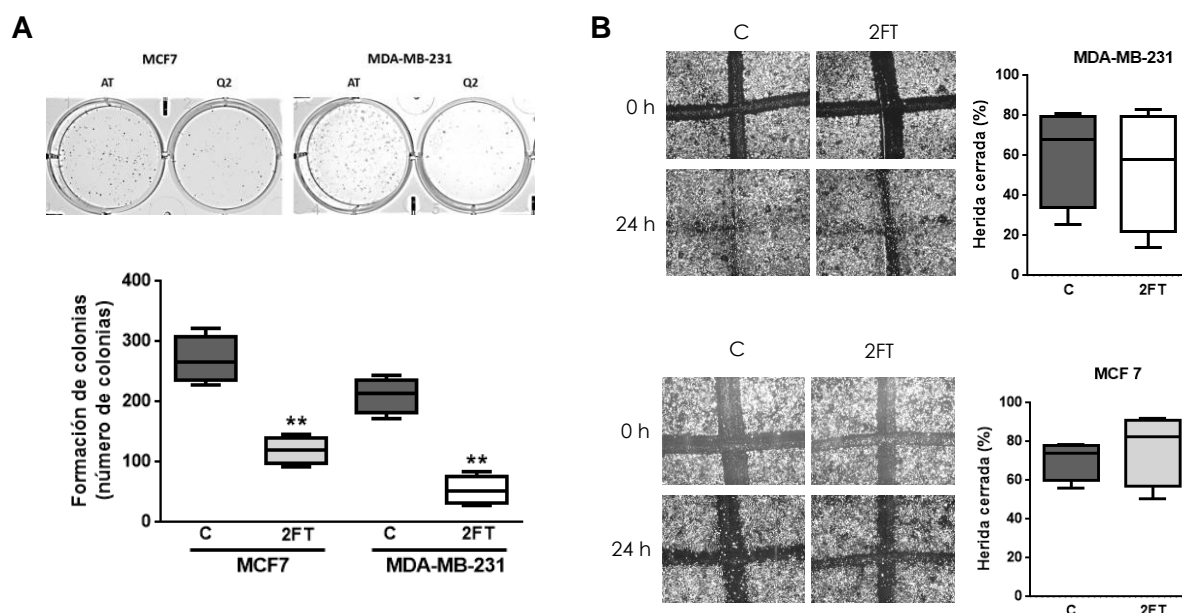


Figura 10. Estudio del efecto de apMNK2FT sobre la capacidad clonogénica y la migración de las células MCF7 y MDA-MB-231. (A) Las células MCF7 y MDA-M-231 se sembraron en placas p6 a densidad de 2.5×10^5 células/pocillo y se transfetaron con el aptámero a las 16-24 horas siguientes a la concentración de 250 nM. Al cabo de 24 horas, las células se recogieron y se resembraron en p6 a una densidad de 10^3 células/pocillo. Tras 8-9 días, las células se fijan y tiñen para el conteo. La gráfica representa la media \pm SEM de 4 experimentos independientes (** $p < 0.01$ respecto al control de células transfetadas sólo con el vehículo). (B) Las células MCF7 y MDA-MB-231 se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/pocillo. A las 24 horas se transfetaron con apMNK2FT 250 nM y transcurridas 16-24 horas se trataron con mitomicina $1 \mu\text{M}$. A continuación, se practicó una "herida" en forma de cruz y se tomaron micrografías a tiempos 0 y 24 horas para analizar y medir el cierre. Las gráficas representan la media \pm SEM del cierre de la herida de 4 experimentos independientes.

En resumen, aunque el aptámero apMNK2FT conserva las características estructurales del aptámero parental y mantiene la capacidad de interaccionar con MNK1 y la actividad antitumoral en las células de mama, parece ser menos específico (reconoce de forma similar a MNK1a y MNK1b) y menos activo que apMNK2F (menor K_D y menor inhibición de la migración). Por esta razón, nos planteamos nuevas estrategias para optimizar este aptámero.

2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE apMNKQ2

2.1 Obtención del aptámero optimizado apMNKQ2

Los aptámeros de menor tamaño son, por regla general, más eficientes entrando en las células, menos tóxicos, tienen un menor coste de producción, etc. Es por esto que se

realizó un estudio estructural del aptámero en colaboración con el grupo del Dr. Carlos González del Instituto de Química-Física Rocasolano perteneciente al CSIC, para estudiar la posibilidad de optimizar el aptámero eliminando parte de su secuencia sin afectar a la estructura y, en consecuencia, a su actividad.

Un análisis más detallado proporcionado por el programa QGRS Mapper permitió diseñar cuatro secuencias distintas a partir de apMNK2FT en base a la formación de *G-quadruplex* (**Figura 11**). Estas secuencias se denominaron apMNKQ1, apMNKQ2, apMNKQ3 y apMNKQ4 con 18, 29, 13 y 22 nucleótidos, respectivamente.

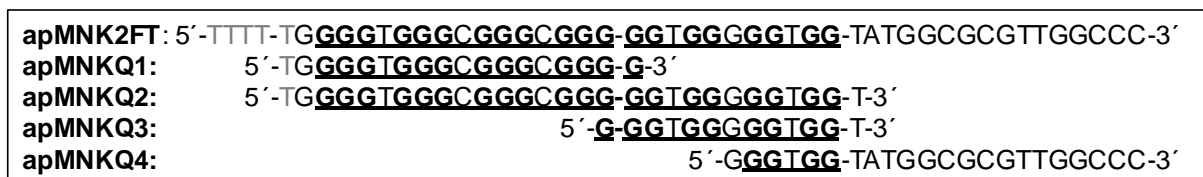


Figura 11. Optimización del aptámero apMNK2FT. Diseño y síntesis de cuatro secuencias a partir del aptámero apMNK2FT en función de las posibles estructuras *G-quadruplex*: los aptámeros apMNKQ1 (18 nt), apMNKQ2 (29 nt), apMNKQ3 (13 nt) y apMKNQ4 (22 nt).

Se llevaron a cabo experimentos de RMN para analizar las estructuras y la estabilidad de los aptámeros resultantes. En la **Figura 12** se muestran las regiones imino de los espectros monodimensionales en 10 mM de fosfato potásico (pH 7) de apMNKQ1, apMNKQ2, apMNKQ3 y apMKNQ4 a diferentes temperaturas. Como se puede observar, la región imino de apMNKQ1 presenta una única conformación tipo *quadruplex* que es estable hasta los 35°C y luego desaparece. En apMNKQ2 y apMKNQ3 se ven señales anchas probablemente debido a la existencia de múltiples conformaciones que son muy estables en el caso de apMKNQ3, ya que las señales imino se continúan viendo a 45°C. Con el aptámero apMKNQ3 se observa también que la proporción entre las distintas conformaciones parece similar a 5°C y que a medida que aumenta la temperatura una de las conformaciones se estabiliza más porque la intensidad de las señales entre 11.5 y 12.5 ppm aumenta y las señales comprendidas entre 10 y 11.5 ppm prácticamente desaparecen. La región imino de apMKNQ4 varía con la temperatura lo que indica baja estabilidad y, además, los espectros muestran señales muy anchas indicando la existencia de varias conformaciones en disolución.

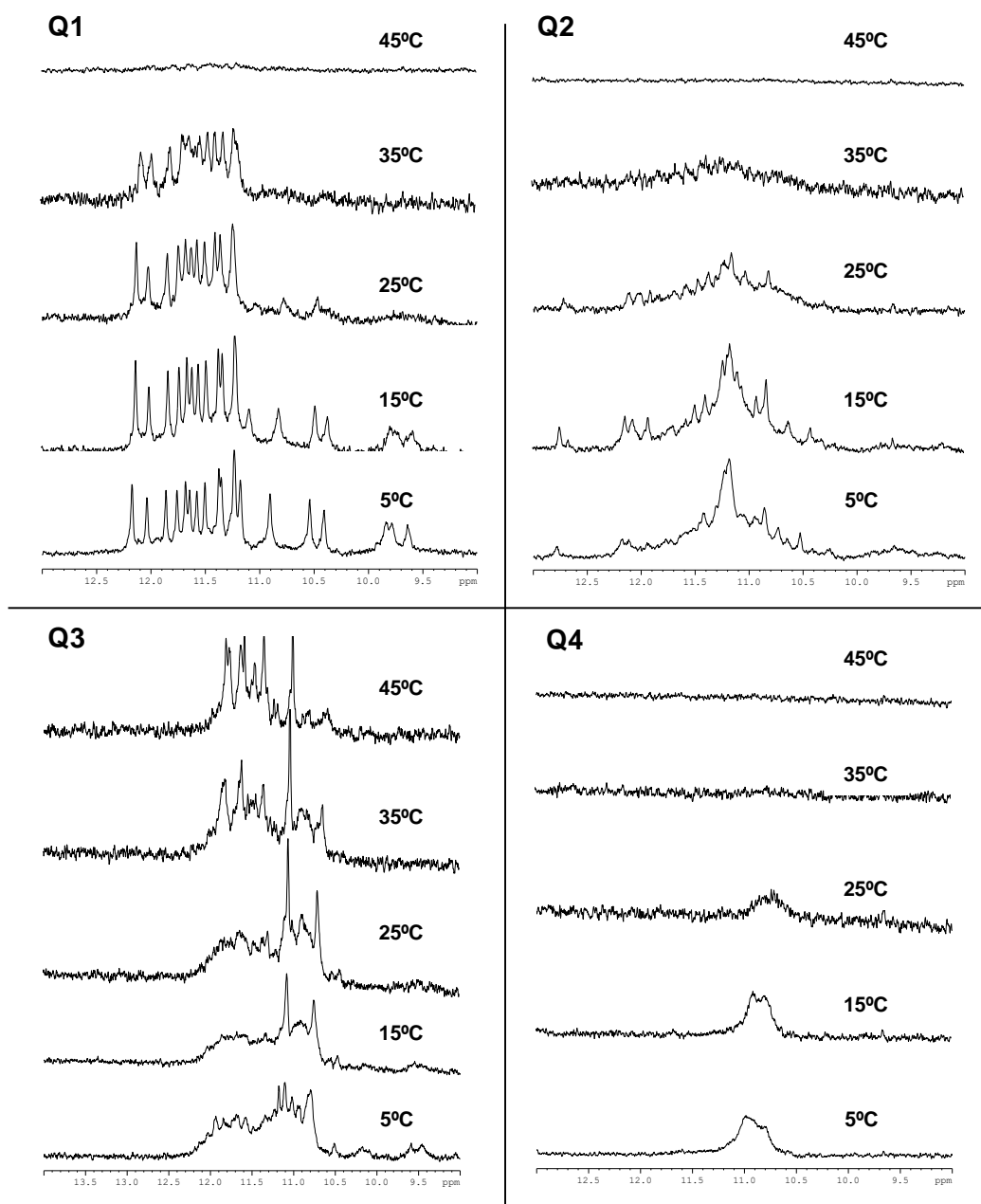


Figura 12. Análisis estructural de los nuevos aptámeros. Estudio de las regiones imino de los espectros monodimensionales de RMN de apMKNKQ1, apMKNKQ2, apMKNKQ3 y apMKNKQ4 en 10 mM de fosfato potásico (pH 7) a diferentes temperaturas.

Por otra parte, se analizó la actividad antiproliferativa de los cuatro aptámeros en las líneas MCF7 y MDA-MB-231 como se describe en el apartado 1.4. En paralelo se utilizó un aptámero inespecífico consistente en una región central constituida por 10 adeninas y 10 timinas consecutivas flanqueada por las secuencias correspondientes a los primers F3 y R3 denominado aptámero AT (**Tabla VII**). Como se muestra en la **Figura 13**, el aptámero apMKNKQ2 (de 29 nucleótidos) es el que mayor efecto tiene sobre la actividad MTT en ambas líneas reduciendo la proliferación celular un 51% para MCF7 y un 36% para MDA-MB-231. En

la línea MCF7, los aptámeros apMKNKQ1, apMKNKQ3 y apMKNKQ4 tienen un efecto parcial similar al obtenido con el control inespecífico AT. En la línea MDA-MB-231, apMKNKQ1 inhibe un 30% la actividad MTT mientras que apMKNKQ3 y apMKNKQ4 tienen un ligero efecto sobre dicha actividad (aproximadamente un 15%).

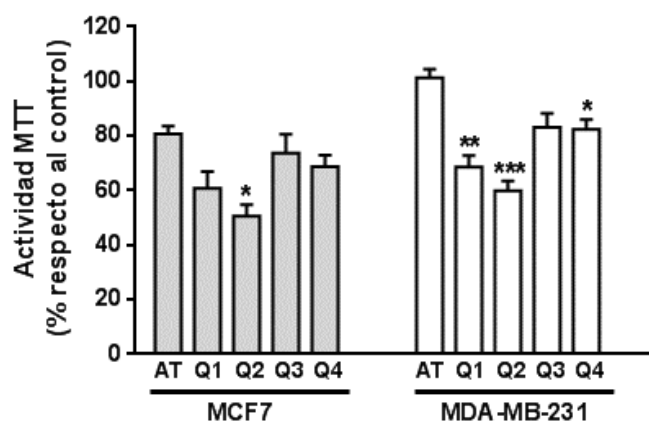


Figura 13. Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT de las células MCF7 y MDA-MB-231. Las células se sembraron en p96 a densidad 10^4 células/pocillo. Tras 16-24 horas se transfectaron con los aptámeros apMKNKQ1, apMKNKQ2, apMKNKQ3 y apMKNKQ4 a 250 nM durante 48 horas tras las cuales se realizaron ensayos de actividad MTT. Las barras representan la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al aptámero control AT).

Como se ha comentado previamente, el análisis por RMN de apMKNKQ2 (**Figura 12**) mostraba unas señales muy anchas, por lo que se decidió sustituir la guanina de la posición 23 por una timina para mejorar los espectros de RMN y poder encontrar una estructura, ya que en apMKNKQ2 se solapan las bandas. El análisis de este aptámero sugiere una construcción con dos segmentos de *G-quadruplex* paralelos (uno de tres pisos y otro de dos) interaccionando por la tetrada 3' terminal de uno con la 5' terminal del otro y formando todo ello un quádruplex de cinco pisos, todo en paralelo (**Figura 14**).

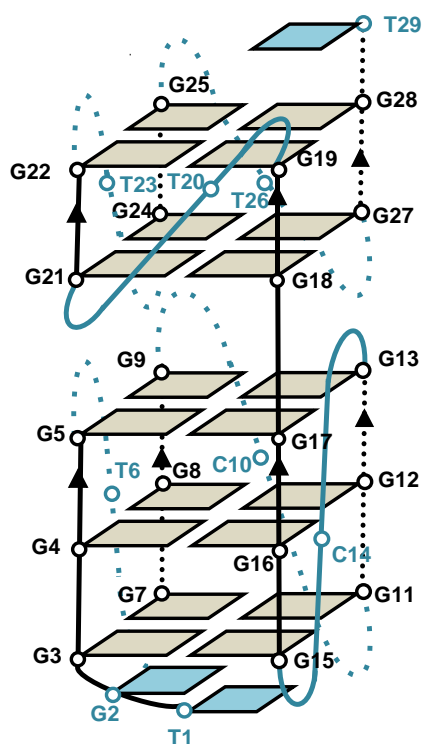


Figura 14. Modelo estructural propuesto del aptámero apMNKQ2. El análisis sugiere dos *G-quadruplex* paralelos de 3 y 2 pisos interactuando por la tétada 3' terminal de uno con la 5' terminal del otro para formar un *G-quadruplex* paralelo de 5 pisos.

A la vista de estos resultados, elegimos el aptámero apMNKQ2 para su posterior caracterización funcional.

2.2 Caracterización de la interacción de apMNKQ2 con MNK1a/b

El aptámero apMNK2F era capaz de reconocer las dos isoformas de MNK1, pero con mayor afinidad a MNK1b, mientras que apMNK2FT reconocía a ambas isoformas de manera similar. Para analizar la afinidad del nuevo aptámero apMNKQ2 se llevaron a cabo ensayos ELONA con las cuatro construcciones de MNK1 como se realizó en el apartado 1.2 (**Figura 7B**).

Como se observa en la **Figura 15A**, apMNKQ2 se une de manera significativa a ambas isoformas siendo la afinidad por MNK1b significativamente mayor que por MNK1a. Por el contrario, la unión a los mutantes MNK1a Δ 77 y MNK1 Δ Ct no fue significativa, por lo que se puede deducir que los nucleótidos eliminados en su secuencia le permiten plegarse de tal manera que puede reconocer a su diana de forma específica con mayor afinidad. Al tener menor tamaño, el aptámero podría acceder mejor a su zona de interacción con la proteína.

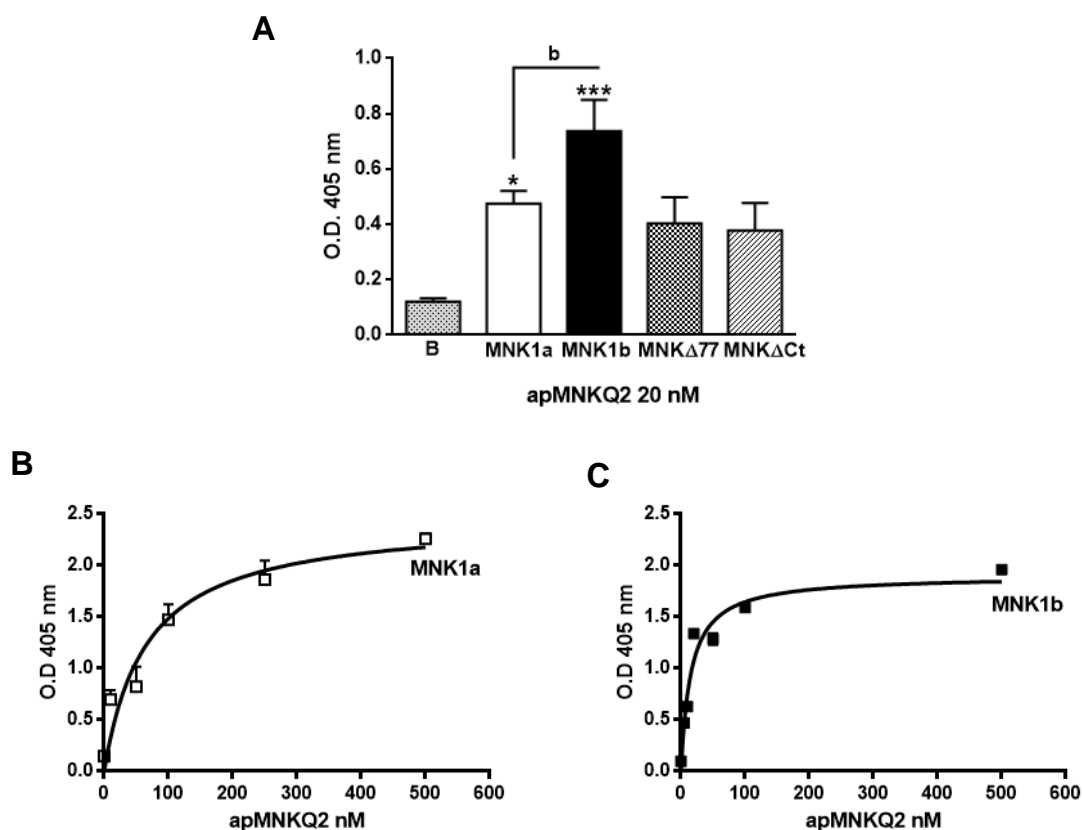


Figura 15. Caracterización de la interacción del aptámero apMNKQ2 con MNK1 mediante ELONA. (A) ELONAs en los que se incubaron las GST-MNKs previamente adsorbidas en p96 a 0.2 μ g/pocillo con apMNKQ2-Bio a 20 nM. Las barras representan la media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ respecto al blanco y b $p < 0.01$ MNK1b respecto a MNK1a). **(B)** y **(C)** ELONAs en los que se incubaron concentraciones de 0 a 500 nM de apMNKQ2.

La constante de afinidad de apMNKQ2 se obtuvo incubando concentraciones crecientes de apMNKQ2 marcado con biotina con la proteína GST-MNK1a (**Figura 15B**) o GST-MNK1b (**Figura 15C**) y los datos obtenidos se analizaron igual que en el apartado 1.2. El aptámero apMNKQ2 es capaz de detectar ambas proteínas de forma dependiente de la concentración con K_D de 66.13 ± 20.18 y 15.47 ± 2.36 nM, para MNK1a y MNK1b respectivamente, corroborando que apMNKQ2 tiene una afinidad por MNK1b cuatro veces mayor que por MNK1a.

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de Apta-western para confirmar la afinidad del aptámero apMNKQ2 por las proteínas MNK1a y MNK1b. Para ello, las cuatro construcciones utilizadas en la **Figura 15A** se analizaron por electroforesis, transferencia y aptadetección. En condiciones desnaturizantes (**Figura 16A**), apMNKQ2 es capaz de reconocer y unirse a las cuatro isoformas de la proteína de forma similar. Esto podría deberse al hecho de que la zona que reconoce el aptámero puede no estar accesible en todas las proteínas cuando están estructuradas y quedar expuestas al desnaturizarse. Por esta razón,

se realizaron otros ensayos en los que la electroforesis se realizó en condiciones nativas (sin SDS ni β -mercaptoetanol). El resultado se muestra en la **Figura 16B** y su cuantificación en la **Figura 16C**. En condiciones nativas, el aptámero apMKNQ2 es capaz de discriminar de forma significativa entre MNK1b y las demás isoformas, confirmando el resultado previo que se obtuvo mediante los ensayos ELONA.

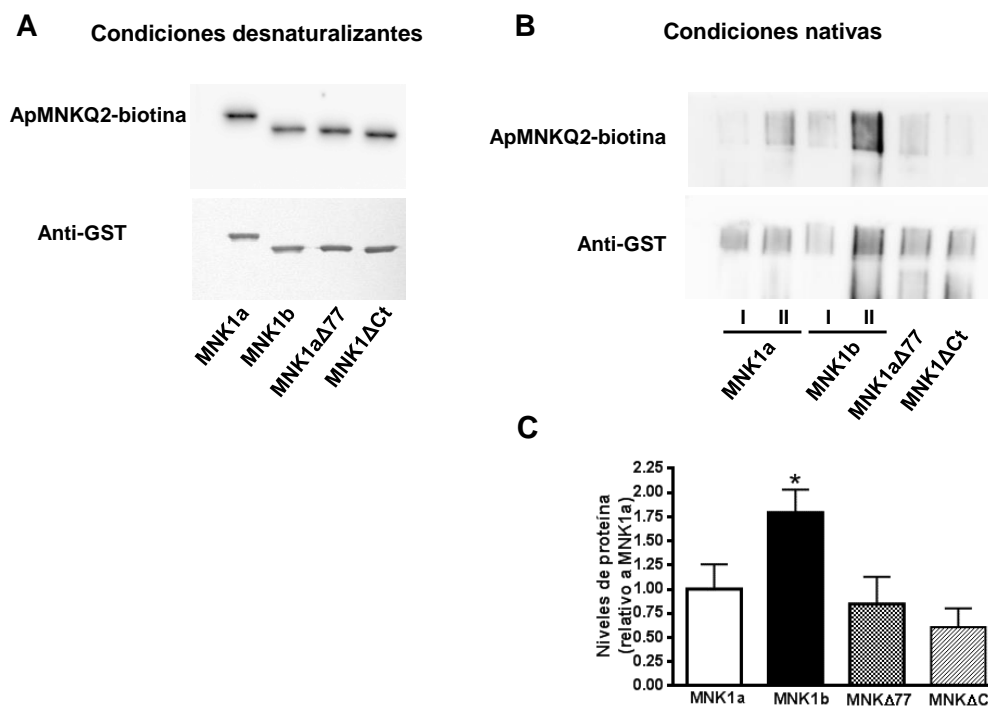


Figura 16. Caracterización de la interacción del aptámero apMKNQ2 con MNK1 mediante Apta-western. Detección de MNK1a y MNK1b, así como de las dos variantes MNK1a Δ 77 y MNK1 Δ Ct unidas a GST, con el aptámero apMKNQ2 marcado con biotina en electroforesis (12%) en **(A)** condiciones desnaturalizantes y en **(B)** condiciones nativas (sin SDS ni β -mercaptoetanol). **(C)** Cuantificación de los niveles de proteínas en relación a MNK1a. Las barras representan la media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes * p <0.05.

Los resultados obtenidos por ELONA y por Apta-western permiten delimitar la región de interacción del aptámero con la proteína que debe encontrarse en el extremo C-terminal, puesto que es ahí donde se encuentran las diferencias entre las isoformas MNK1a y MNK1b, así como con los mutantes MNK1a Δ 77 y MNK1 Δ Ct (**Figura 7C**).

2.3 Estudio de la estabilidad del aptámero apMKNQ2 en presencia de DNAsa y plasma.

La resistencia del aptámero a ser degradado por DNAsas se analizó incubando 300 ng de apMKNQ2 estructurado en presencia de tres concentraciones de DNAsa I (Thermo

Scientific, EEUU) tal y como se describe en el apartado 4.1.1 de Materiales y métodos. En la **Figura 17A** se puede apreciar la estabilidad y resistencia a la degradación de apMKNKQ2 a las tres concentraciones de DNAsa I ensayada.

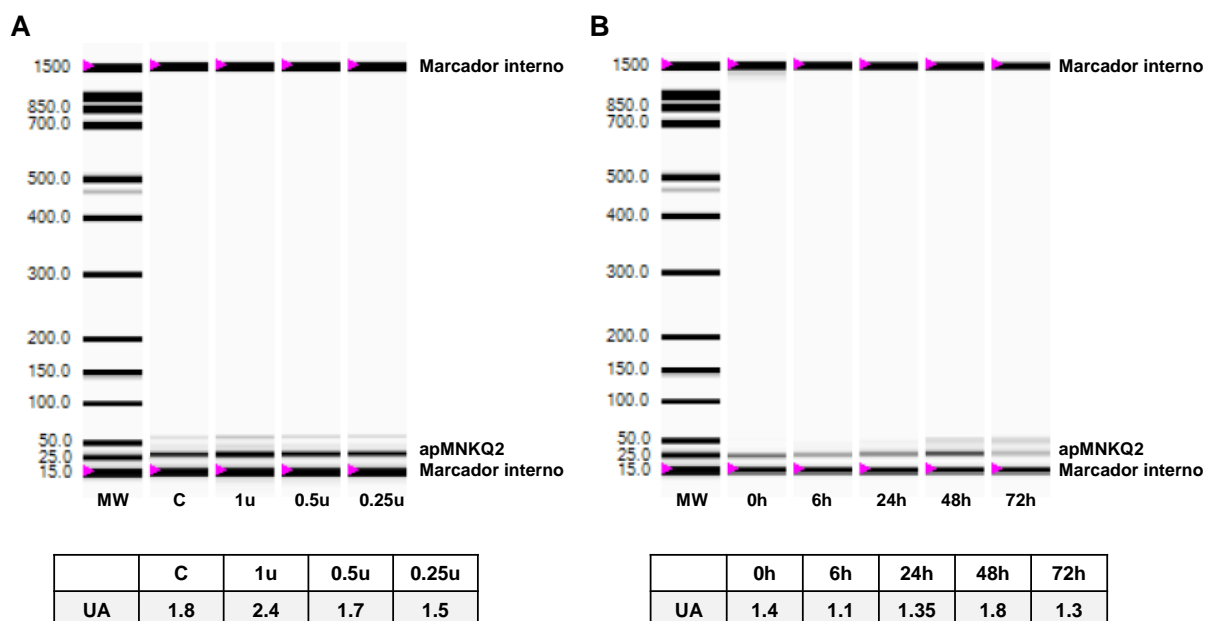


Figura 17. Estabilidad de apMKNKQ2. Geles virtuales obtenidos utilizando el Chip Experion™ DNA 1K (BioRad, EEUU). **(A)** Análisis de la estabilidad de apMKNKQ2 incubado durante 5 min con 1 unidad, 0.5 unidades y 0.25 unidades de DNAsa I. **(B)** Análisis de la estabilidad de apMKNKQ2 incubado en plasma humano a 0, 6, 24, 48 y 72 horas. La cuantificación de las bandas se muestra en la parte inferior de la figura y se expresa en unidades arbitrarias (UA).

También se analizó la resistencia del aptámero apMKNKQ2 a ser degradado por las proteínas plasmáticas (apartado 4.1.2 de Materiales y métodos), incubando apMKNKQ2 en presencia de plasma humano durante 72 horas y sacando alícuotas a los tiempos que se indican en la **Figura 17B**. Como se puede observar, no hubo degradación del aptámero en presencia de las proteínas del plasma durante las 72 horas que duró el experimento. Este dato es importante por la posible aplicación terapéutica del aptámero apMKNKQ2.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT/mTOR y ERK/MNK1 EN LAS LÍNEAS TUMORALES DE MAMA

3.1 Características moleculares de las líneas tumorales

Como se indicaba en el apartado 1 de Materiales y métodos, los experimentos para determinar el efecto del aptámero apMKNKQ2 se han llevado a cabo en las líneas celulares

MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. En la **Tabla VIII** se resumen las características moleculares de las tres líneas:

Tabla VIII. Clasificación y características de las líneas celulares de mama utilizadas

Línea celular	Tipo	Subtipo	ER	PR	HER2	Mutaciones
MCF7	LA		+	+	-	
MDA-MB-231	TNA	Mesenquimal-like	-	-	-	BRAF, CDKN2A, KRAS, NF2, TP53
MDA-MB-468	TNB	Basal-like	-	-	-	PTEN, RB1, SMAD4, TP53

Tabla modificada de Perou et al., 2000 (Perou et al. 2000).

Las células utilizadas en este estudio pertenecen a dos de los tres grandes grupos en los que se clasifican las líneas celulares de cáncer de mama: Luminal (MCF7), HER2 positivo y Triple-negativo (MDA-MB-231 y MDA-MB-468). Hemos escogido las células MCF7 como ejemplo del tipo celular más diferenciado y menos invasivo, ya que no han perdido las uniones célula-célula, y óptimo representante del tipo de cáncer de mama Luminal, menos agresivo y con mejor respuesta a tratamiento hormonal gracias a la presencia de receptores de estrógeno y progesterona.

Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 pertenecen al tipo celular menos diferenciado y más invasivo caracterizado por la muy baja o nula expresión de los receptores ER/PR/HER2. Dentro de los Triples-negativos, las células MDA-MB-468 pertenecen al subtipo A, denominadas basal-like. Este subtipo expresa marcadores de células Luminales-basales como citoqueratinas e integrinas, lo que hace que se asemejen más al tipo tumoral basal. La línea tumoral MDA-MB-231 pertenece al subtipo Triple-negativo B, que sobreexpresa genes de células basales-mesenquimales asociados con mayor agresividad, capacidad de invasión y supervivencia tumoral, así como colagenasas y proteasas que son proteínas importantes para la migración celular. Estas células representan a los tumores de mama con baja claudina de tipo basal (Dai et al. 2017) (**Figura 18**).

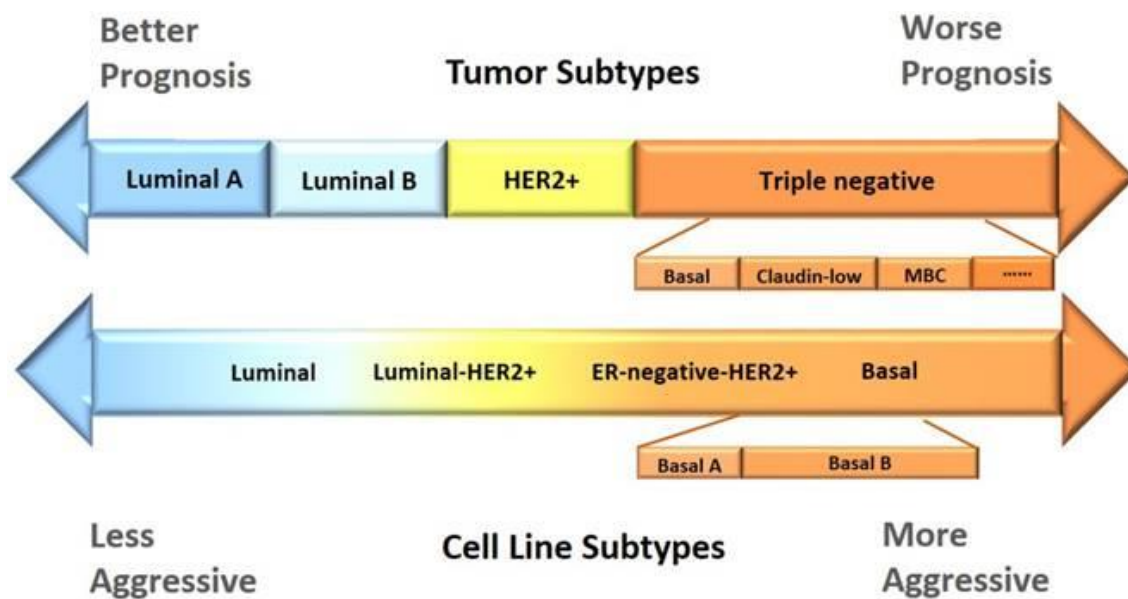


Figura 18. Comparación entre la clasificación de las líneas celulares de mama y los tumores. Figura tomada de Dai et al., 2017 (Dai *et al.* 2017).

Estas líneas celulares nos permitirán caracterizar y validar el efecto del aptámero apMNKQ2 en tumores de mama, desde el tipo Luminal con mejor pronóstico hasta el Triple-negativo con mayor agresividad.

3.2 Expresión de MNK1a, MNK1b y fosforilación de eIF4E

En primer lugar, se determinaron los niveles de ambas isoformas de MNK1, MNK1a y MNK1b, así como el estado de fosforilación de su sustrato eIF4E mediante western blot en las tres líneas celulares de cáncer de mama elegidas en este estudio.

Para llevar a cabo los ensayos, se obtuvieron lisados tal y como se describe en el apartado 2.2.1 de Materiales y métodos en los que se analizaron los niveles de las distintas proteínas mediante inmunodetección con los anticuerpos específicos.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de las bandas muestran que las células MDA-MB-468 presentan niveles de MNK1a significativamente más altos que las células MDA-MB-231 y MCF7 (**Figura 19A**), mientras que las células MDA-MB-231 son las que presentan menores niveles de MNK1b de forma estadísticamente significativa (**Figura 19B**).

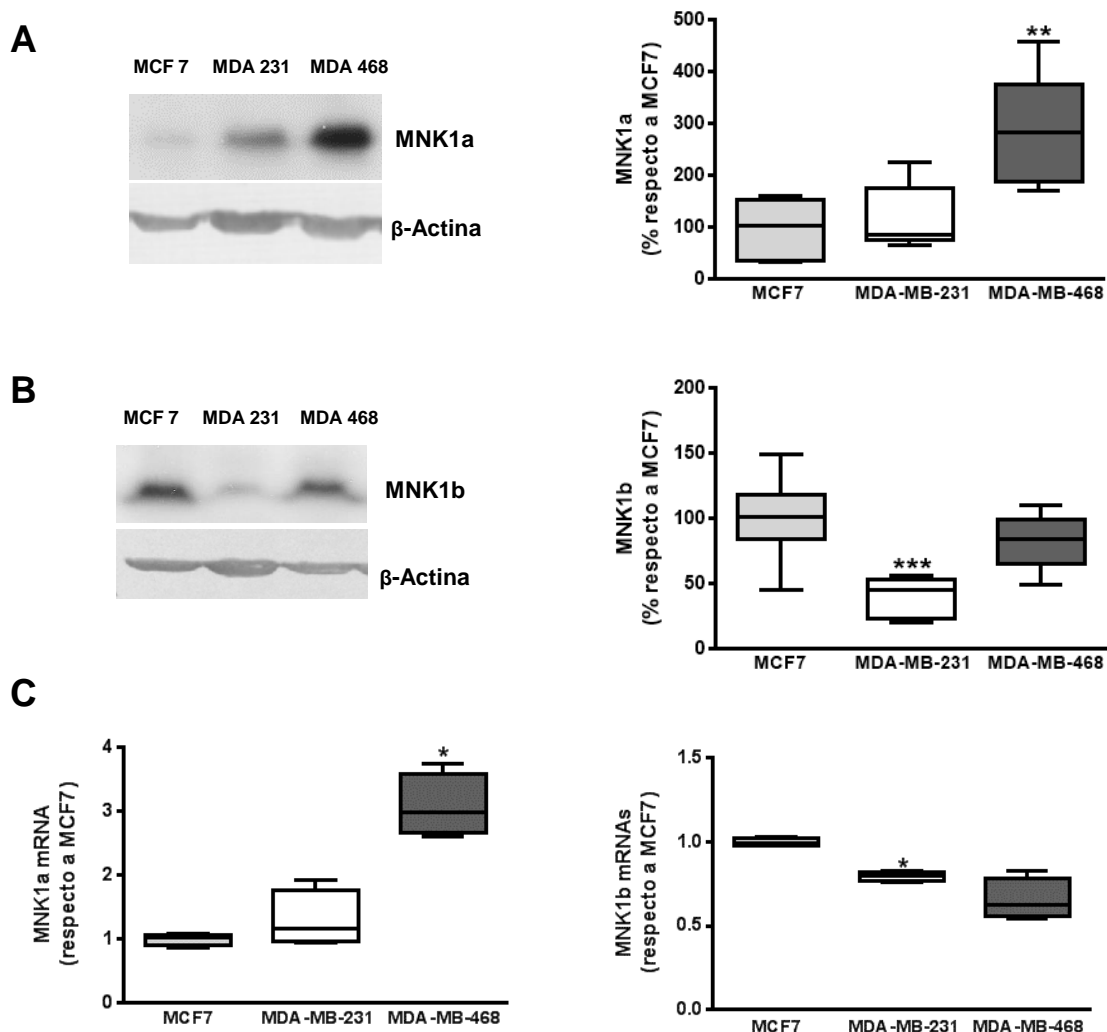


Figura 19. Niveles de MNK1a y MNK1b en líneas celulares de mama. (A) Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) de MNK1a y MNK1b en células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. **(B)** Los valores obtenidos tras la cuantificación se normalizaron respecto a los de β -actina, que se utilizó como control de carga. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 6 experimentos independientes. **(C)** Cuantificación de los niveles de mRNA de MNK1a y MNK1b mediante qRT-PCR como se describe en el apartado 4.11 de Materiales y métodos. Los datos se expresan como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a las células MCF7).

Para confirmar si los cambios en la expresión de ambas proteínas se deben a diferencias en los niveles de mRNA, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la expresión de dichos mRNAs mediante qRT-PCR como se indica en el apartado 2.2.2 y 4.11 de Materiales y métodos. Los resultados muestran que los niveles de mRNA de MNK1a son significativamente más altos en las células MDA-MB-468 respecto a las otras dos líneas celulares (**Figura 19C**) mientras que la línea MCF7 presenta niveles de mRNA de MNK1b significativamente mayores. Estos datos indican que existe una correlación entre los niveles

de los mRNAs y la expresión de las proteínas, excepto en el caso de MNK1b en las células MDA-MB-468.

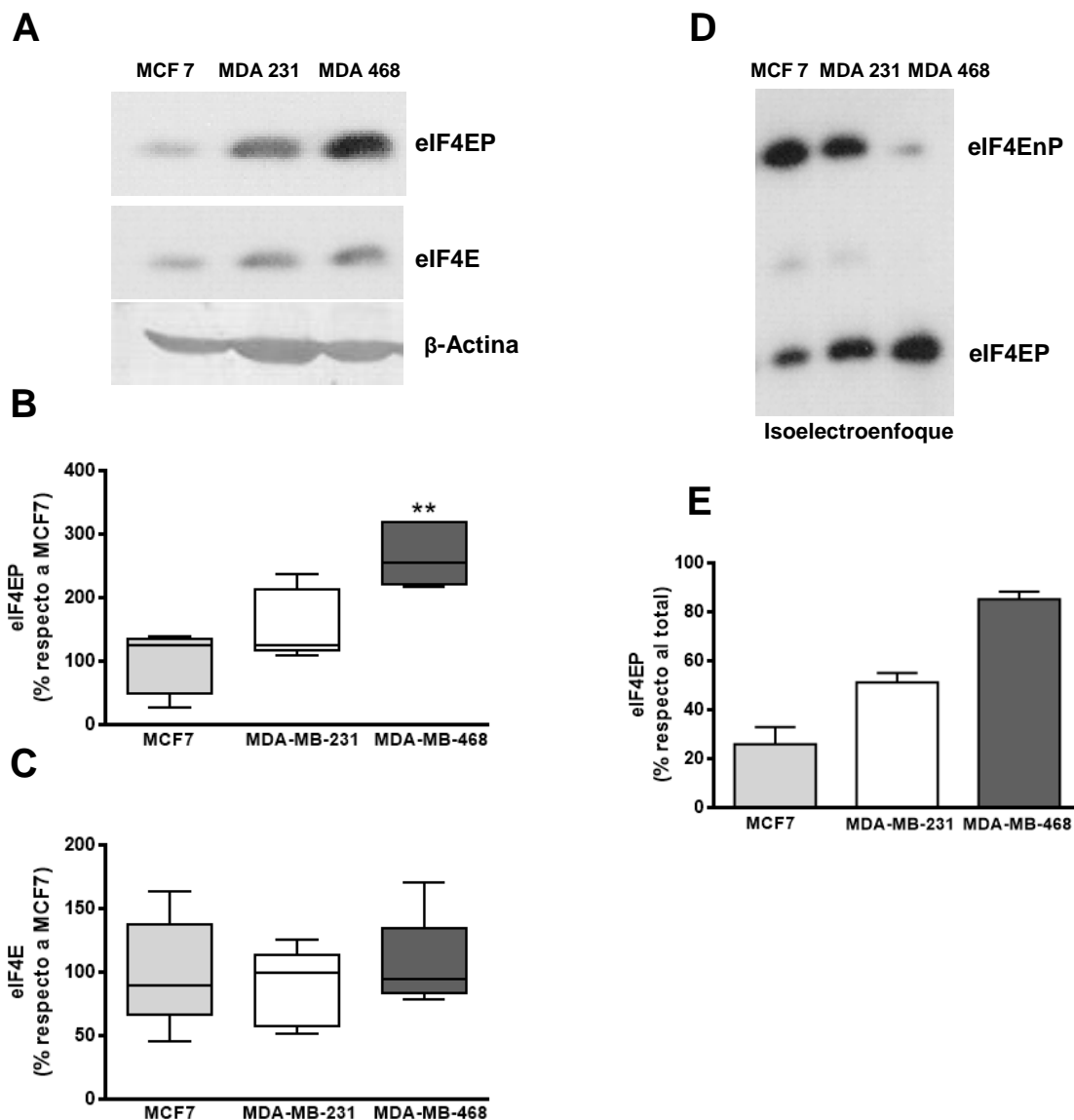


Figura 20. Expresión y fosforilación de eIF4E en líneas celulares de mama. Se utilizaron lisados celulares de las líneas MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. **(A)** Niveles del eIF4E y de eIF4EP mediante SDS-PAGE al 12% e inmunodetección. La β -actina se utilizó como control de carga. **(B)** Cuantificación de los niveles de eIF4EP respecto a los de eIF4E. Las cajas de representar la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. **(C)** Cuantificación de los niveles de eIF4E respecto a los de β -actina. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$ con respecto a MCF7). **(D)** Niveles de eIF4EP y de eIF4E mediante isoelectroenfoco. **(E)** Cuantificación de los niveles de eIF4EP respecto de los niveles totales de eIF4E. Las barras representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

El estudio de la expresión y fosforilación del eIF4E se realizó por inmunodetección con anticuerpos específicos frente a eIF4E y a eIF4EP (**Figura 20**). Los datos indican que los niveles de eIF4E son similares en las tres líneas celulares. Por otro lado, las células MDA-

MB-468 presentan una fosforilación de eIF4E significativamente más alta, mientras que las células MCF7 son las que menos fosforilación presentan.

Estos datos permiten concluir que no existe una correlación directa entre los niveles de las dos isoformas de MNK1 y la fosforilación de su sustrato eIF4E en las tres líneas celulares. Sólo en la MDA-MB-468 se observa una correlación entre la expresión de la isoforma MNK1a y la fosforilación de eIF4E.

3.3 Estudio de las vías PI3K/AKT/mTOR y MAP quinasas

La fosforilación del eIF4E por MNK se regula tanto por la disponibilidad del eIF4E para unirse al eIF4G por la acción de las proteínas inhibitorias 4E-BPs a través de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, como por la activación de las proteínas quinasas MNKs a través de la vía de señalización MAPK (**Figura 21A**). Para identificar el mecanismo responsable de las diferencias en el estado de fosforilación de eIF4E entre las distintas líneas de mama, se decidió estudiar las vías de señalización celular PI3K/AKT/mTOR y MAPK. Por este motivo se determinó la activación de AKT, p38 y ERK 1/2 mediante inmunodetección con anticuerpos fosfoespecíficos. Los resultados de estos ensayos muestran que las células MDA-MB-468 presentan una mayor fosforilación de AKT en relación con las otras dos líneas celulares que no tienen niveles detectables de fosforilación (**Figura 21B**). El hecho de que la línea celular MDA-MB-468 presente una mutación en PTEN (**Tabla VIII**) justifica este resultado, y en consecuencia indica que la vía AKT/mTOR está hiperactivada en estas células, lo que concuerda con que encontramos niveles más altos de la forma más fosforilada de 4E-BP1 en MDA-MB-468 respecto a las otras líneas celulares (**Figura 21B**).

Respecto a la activación de las vías MAP quinasas que regulan a MNK1, el análisis de la fosforilación de ERK1/2 muestra que el nivel de ERK1P es visiblemente más alto en las células MDA-MB-468 y algo menos en MCF7 (**Figura 21B**). El nivel de fosforilación de ERK2P en las células MDA-MB-468 es tan alto como el de ERK1P, mientras que en las células MCF7 el nivel es casi indetectable. La fosforilación de ERK1/2 en la línea MDA-MB-231 es en general muy baja. Por otro lado, se puede observar que los niveles de p38 en las células MDA-MB-231 son el doble respecto a las células MCF7 y MDA-MB-468 y su fosforilación es menor, mientras que en las otras dos líneas celulares no hay cambios.

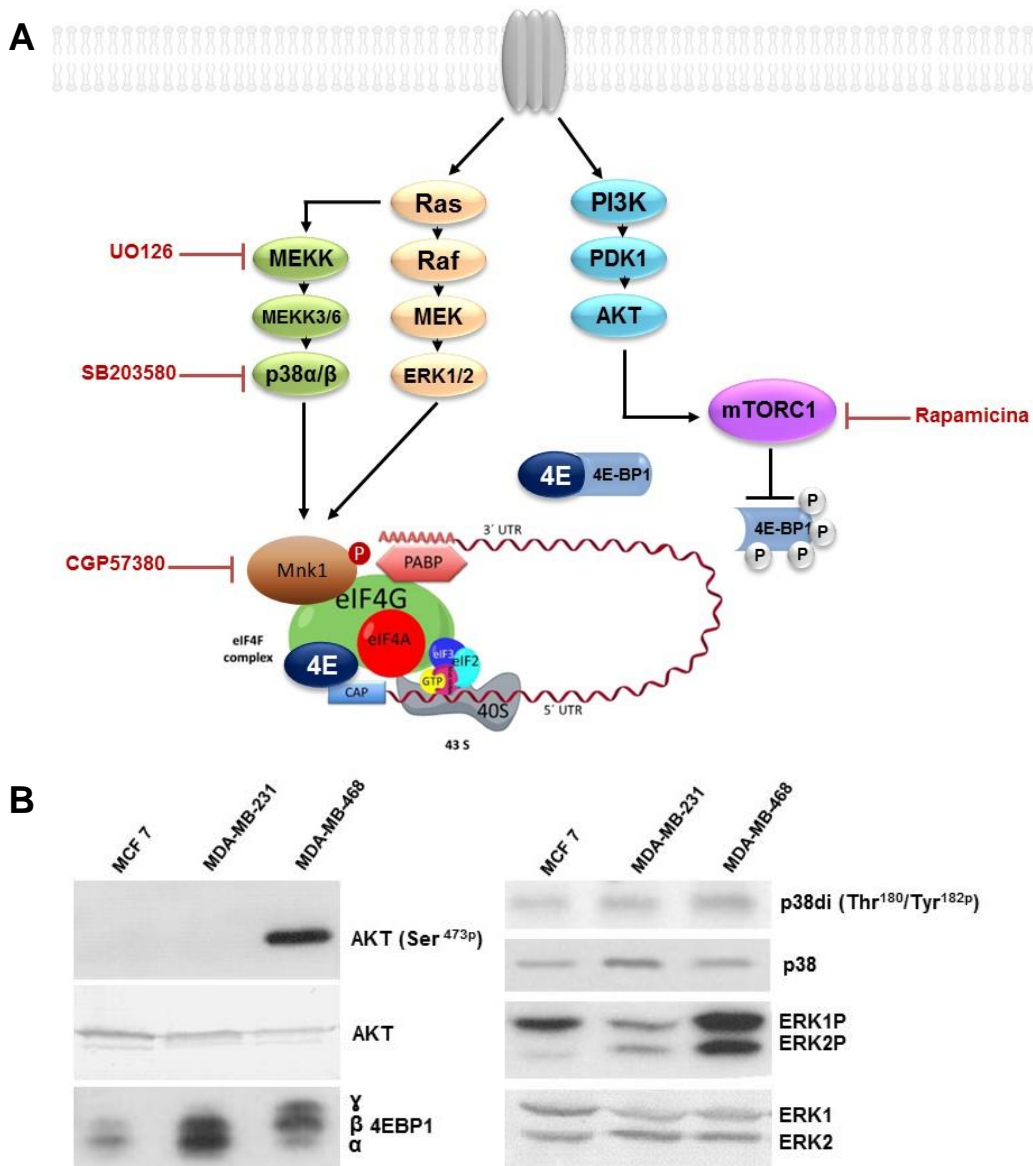


Figura 21. (A) Esquema de las cascadas de señalización celular y (B) estudio de las mismas en líneas celulares de mama. Para el estudio de las cascadas se utilizaron lisados celulares de las líneas MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 para realizar inmunodetección (SDS-PAGE 12%) con anticuerpos específicos frente a AKT(Ser⁴⁷³p), AKT, p38di (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²p), p38, ERKP, ERK, y 4EBP1.

En resumen, los resultados sugieren que las diferencias observadas en la fosforilación de eIF4E entre las tres líneas celulares estudiadas podrían ser debidas a la activación de distintas cascadas de señalización. Así, la línea MCF7 tiene activada la vía de las MAPK, la MDA-MB-468 presenta una activación de la vía PI3K/AKT/mTOR y la MDA-MB-231 muestra una menor activación de ambas vías.

4. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LA TUMOROGÉNESIS EN LAS CÉLULAS DE MAMA

4.1. Estudio de la actividad de apMNKQ2 sin el uso de transfectante

Una de las ventajas de los aptámeros de menor tamaño es que pueden tener facilitada su entrada en las células. Para analizar si apMNKQ2 es capaz de entrar directamente en las células, se sembraron 3×10^4 células/pocillo en cubres y a las 24 horas se añadió al medio celular el aptámero conjugado con Alexa fluor 488 estructurado a 250 nM. En paralelo se transfectó el aptámero con lipofectamina a la misma concentración. Tras 24 horas, las células se fijaron con metanol frío durante 20 minutos, se lavaron con PBS y se tiñeron y montaron en portas con medio de montaje Prolong™ que contiene Hoechst 30µM.

Como se puede observar en la **Figura 22**, apMNKQ2 es capaz de entrar solo en las células, aunque la intensidad es menor y la distribución es diferente a la que se observa cuando se transfecta con lipofectamina. La señal del aptámero con lipofectamina es más intensa y menos difusa que cuando entra directamente. Esta diferencia es más evidente en los acúmulos que co-localizan en el núcleo.

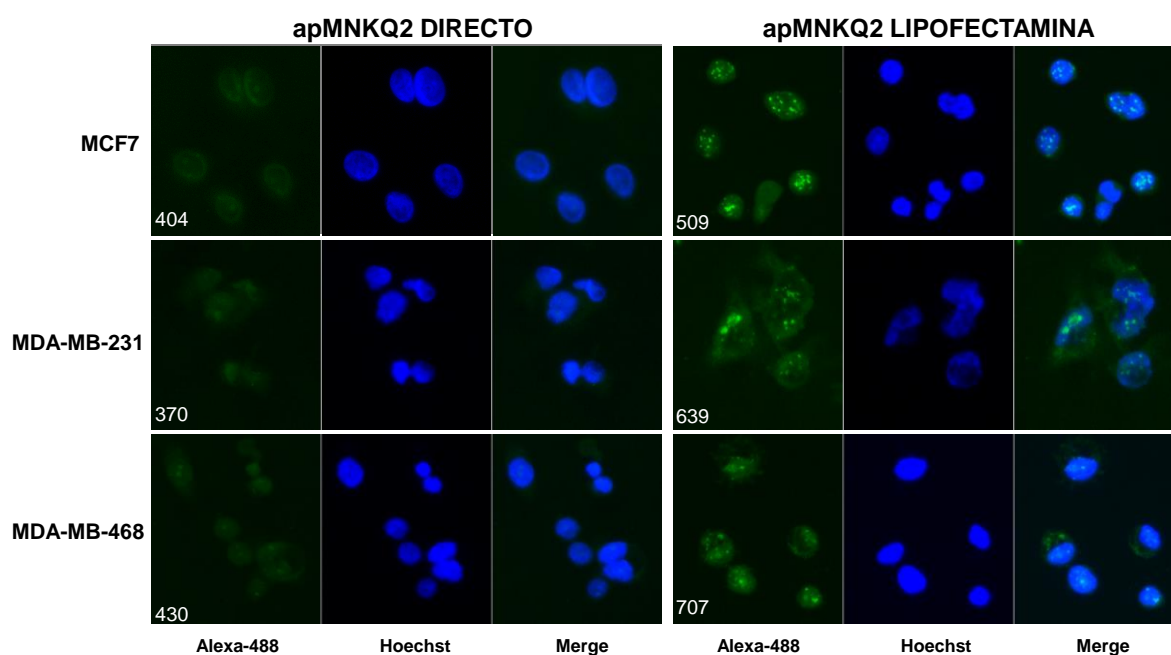


Figura 22. Estudio de la entrada del aptámero apMNKQ2 en las células. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron en p24 con cubres a una densidad de 3×10^4 células/pocillo, y a las 24 horas se transfectaron/añadió apMNKQ2 marcado con Alexa-488 a 250 nM. A las 24 horas tras la transfección, las células se fijaron, tiñeron y montaron en portas con medio de montaje Prolong™ con Hoechst. El número hace referencia a la intensidad del aptámero, medida con el programa ImageJ y expresada en unidades arbitrarias.

En vista de este resultado, se valoró el efecto de la adición de apMKNKQ2 a concentraciones superiores a 250 nM, utilizada en los ensayos de actividad MTT con las células transfectadas con lipofectamina. Los resultados muestran que el aptámero ejerce un ligero efecto, alcanzando una disminución del 15% de la actividad MTT a la concentración más alta ensayada (**Figura 23**), que es significativamente menor que la conseguida a 250 nM transfectando con lipofectamina (**Figura 13**). De estos ensayos se deduce que el aptámero por sí solo no es capaz de producir efecto al mismo nivel que cuando se utiliza el transfectante, probablemente porque su vía de entrada, diferente a la vía de entrada de los complejos con lipofectamina, afecte a la estructura. Por este motivo, para el resto de los ensayos se utilizó el sistema de transfección *Lipofectamine 2000*.

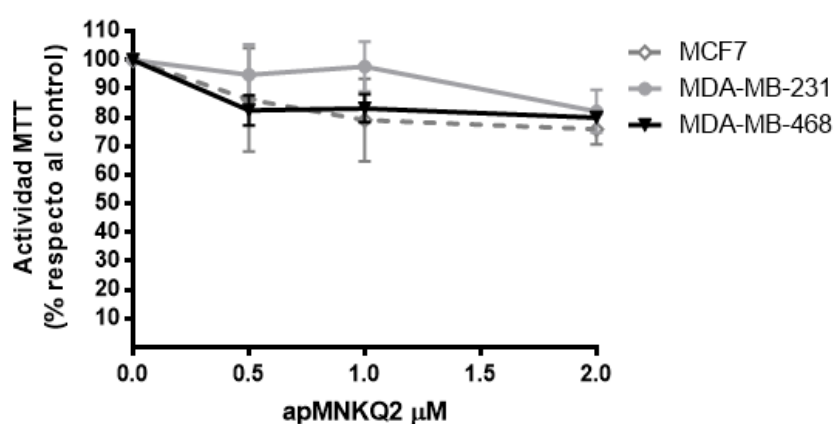


Figura 23. Medida de la actividad MTT en las líneas de mama tras la adición directa de apMKNKQ2. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron en p96 a una densidad de 10^4 células/pocillo, y a las 24 horas se adicionó apMKNKQ2 a concentraciones 0.5, 1 y 2 μM . Tras 48 horas se realizaron los ensayos de MTT. Las gráficas representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, y están normalizados respecto al control de las células sin tratar.

4.2. Estudio del efecto de apMKNKQ2 sobre la proliferación y apoptosis celulares

Para analizar el efecto del aptámero apMKNKQ2 sobre la viabilidad celular, las células se transfectaron con concentraciones crecientes de apMKNKQ2 (0 a 500nM) y se midió la actividad MTT a las 48 horas. Asimismo, el aptámero inespecífico AT se transfectó en paralelo a las mismas concentraciones. Al mismo tiempo se midió la actividad del enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) con los sobrenadantes de las células transfectadas a las 48 horas, antes de la adición del reactivo MTT. Como se muestra en la **Figura 24A**, apMKNKQ2 disminuyó la actividad MTT de forma dependiente de la concentración en las tres líneas, siendo las MDA-MB-468 las más sensibles. El aptámero control produce un ligero efecto, excepto en las células MDA-MB-468 en las que se produce una inhibición del 40% a partir de 100 nM, aunque significativamente menor que la inhibición producida por el aptámero

apMNKQ2. Como se puede observar en la **Figura 24B**, la reducción de la viabilidad celular no parece estar causada por necrosis, puesto que la citotoxicidad es nula (0% en MCF7 y en MDA-MB-468) o prácticamente nula (2% en MDA-MB-231) en la concentración GI50 de cada línea celular.

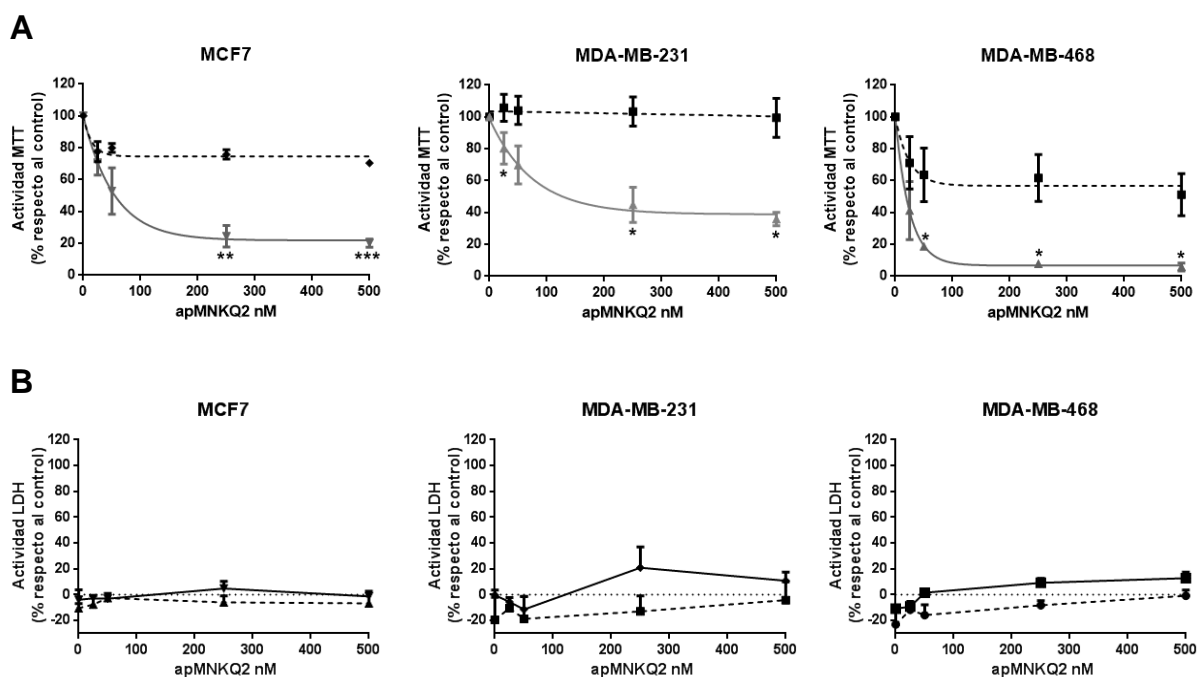


Figura 24. Efecto del aptámero apMNKQ2 sobre la actividad MTT y LDH de las líneas celulares de mama. Las células MCF7, MDA-MB-231 y las MDA-MB-468 se sembraron en p96 a una densidad de 10^4 células/pocillo. Tras 16-24 horas se transfectaron con apMNKQ2 a 0, 25, 50, 250 y 500 nM durante 48 horas, después de las cuales se realizaron ensayos de actividad (A) MTT y (B) LDH. Las gráficas representan las medias \pm SEM de 12 y 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control AT).

La GI50 que se obtuvo para cada una de las líneas celulares utilizadas en este trabajo fue 42 nM, 144 nM y 19 nM para MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, respectivamente. Para el resto de los experimentos se fijaron concentraciones aproximadamente tres veces la GI50, 150 nM para MCF7, 400 nM para MDA-MB-231 y 50 nM para MDA-MB-468.

A continuación, las líneas celulares se transfectaron con las concentraciones establecidas anteriormente y se determinó el número de células vivas 24 horas después de la transfección con apMNKQ2 o con el aptámero control AT mediante exclusión de azul tripán. En estas condiciones se observó una disminución significativa en el número total de células vivas (**Figura 25**) tratadas con apMNKQ2 en las líneas MCF7 y MDA-MB-468, mientras que en las MDA-MB-231 esa disminución es muy ligera.

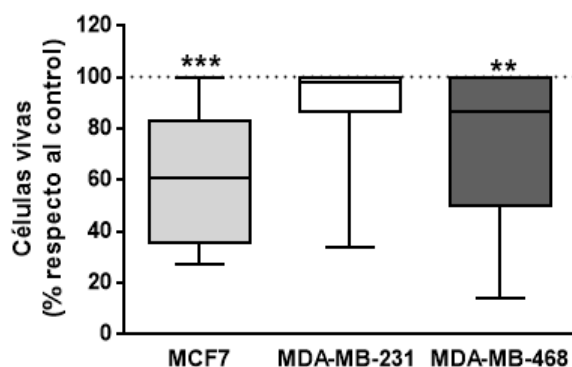


Figura 25. Análisis de la viabilidad celular por exclusión de azul tripán. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se recogieron 24 horas tras la transfección, se diluyeron 1:10 en azul tripán y se contaron en un contador TC20. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 12-14 experimentos independientes (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al aptámero control AT).

Por otra parte, se estudió el efecto de apMKNKQ2 sobre el ciclo celular como se describe en el apartado 4.9 de Materiales y métodos. En los datos obtenidos por citometría de flujo se observa una reducción de la fase G1 en MCF7 y en MDA-MB-468 que correlaciona con un aumento en la fase S del ciclo, lo que sugiere que apMKNKQ2 estaría produciendo una parada en la fase S en estas dos líneas celulares (**Figura 26**). Sin embargo, no hay cambios significativos en ninguna de las fases del ciclo celular en las células MDA-MB-231.

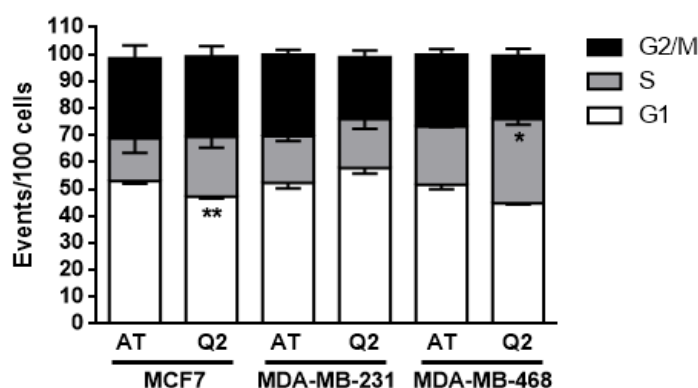


Figura 26. Estudio del efecto de apMKNKQ2 sobre el ciclo celular de las líneas de mama. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron a una densidad de 2.5×10^5 células/pocillo en una p6, y 24 horas después se transfectaron con el aptámero apMKNKQ2 a las concentraciones de trabajo fijadas en este mismo apartado 3.2. Tras 24 horas, las células se fijaron, tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría.

Para determinar si el efecto de apMKNKQ2 es consecuencia de que el aptámero promueve la apoptosis celular, se cuantificó por citometría de flujo la presencia de células en fase subG1 24 horas tras la transfección con los aptámeros apMKNKQ2 y AT (**Figura 27**). El aumento de la fase subG1 y, por tanto de la apoptosis, es evidente en las células MDA-MB-

468 y casi estadísticamente significativo con un valor de $p = 0.0519$. Sin embargo, el aumento de células en esta fase del ciclo es muy ligero e incluso inexistente en las líneas MCF7 y MDA-MB-231.

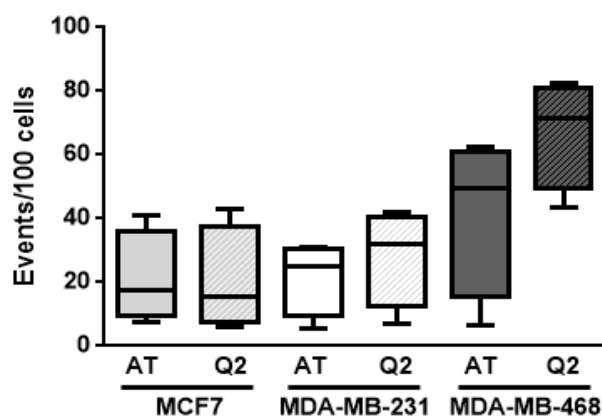


Figura 27. Análisis de la fase subG1 en las líneas celulares de mama. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron en placas p6 a densidad 2.5×10^5 células/pocillo, y transfectaron 24 horas después con apMKNKQ2 y AT a las concentraciones de trabajo anteriormente fijadas. Tras 24 horas las células se recogieron, se fijaron y tiñeron con yoduro de propidio para realizar ensayos de citometría. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 4 experimentos independientes.

La translocación de la proteína fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática de las células hacia la cara externa por translocasas es un proceso característico de células apoptóticas. Para estudiar este proceso se realizaron ensayos de Anexina V marcada con fluoresceína (FITC) en las tres líneas celulares. Esta proteína recombinante se une a los residuos de fosfatidilserina expuestos en la cara externa de la membrana plasmática de las células apoptóticas. Junto con ella, también se utilizó yoduro de propidio (IP), un marcador de ADN no permeable que sólo entra en las células con la membrana comprometida.

Para la realización de estos ensayos, las células se transfectaron con apMKNKQ2 y con el aptámero control AT a las concentraciones de trabajo. A las 24 horas las células se recogieron, se fijaron, y se tiñeron con anexina V-FITC y con yoduro de propidio. Por último, se analizaron mediante citometría de flujo y se diferenciaron entre células no apoptóticas (Anexina V-FITC negativo/IP negativo), células apoptóticas (Anexina V-FITC positivo/IP negativo), células apoptóticas tardías (Anexina V-FITC positivo/IP positivo) y células necróticas (Anexina V-FITC negativo/IP positivo). Los resultados indican que el aptámero apMKNKQ2 es capaz de inducir apoptosis en las células MDA-MB-231 y en las MDA-MB-468 con respecto al aptámero control, mientras que en las células MCF7 el efecto es muy ligero (Figura 28).

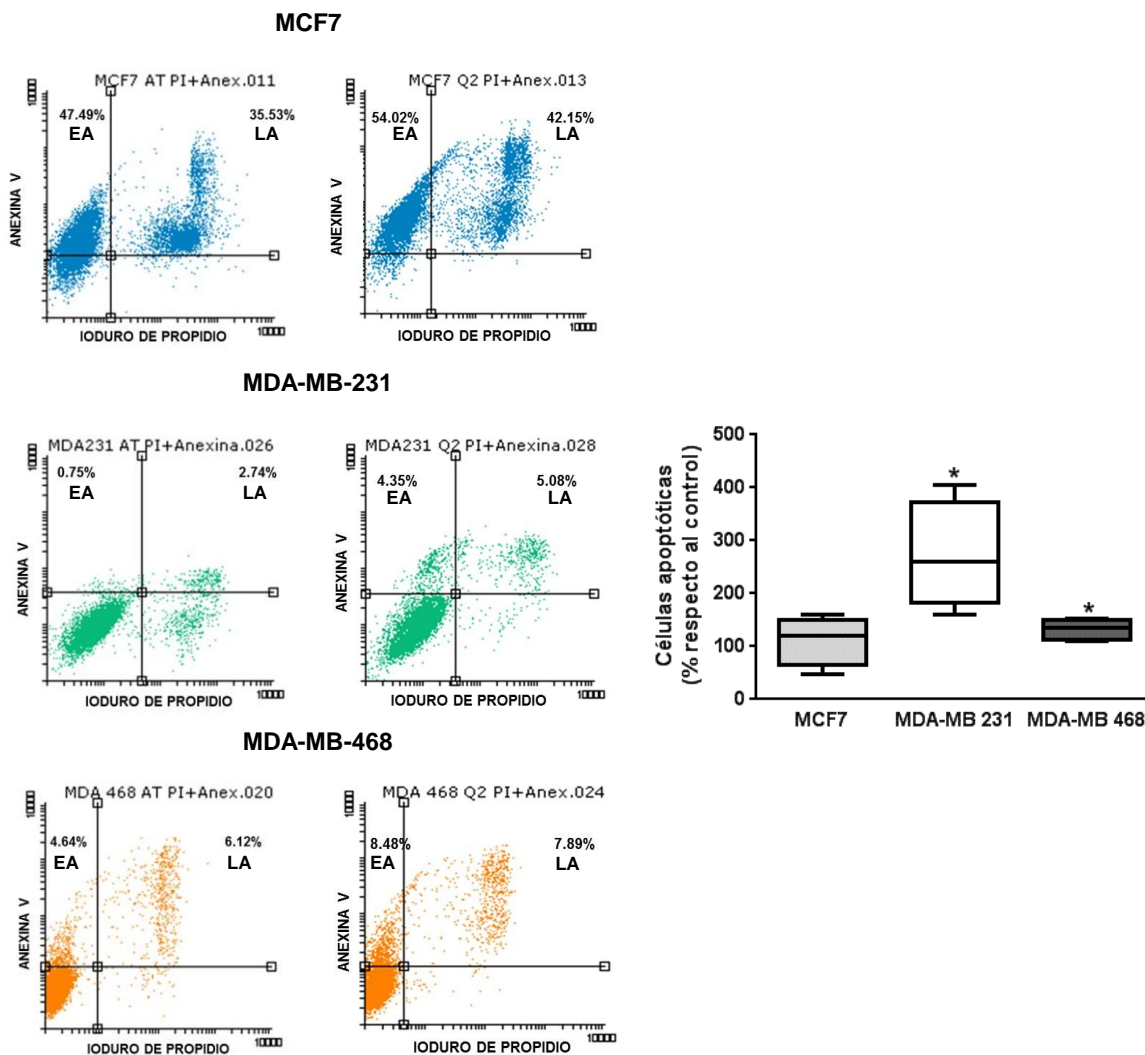


Figura 28. Análisis del efecto del aptámero sobre la apoptosis con Anexina V en las líneas celulares de mama. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron en p6 a densidad 2.5×10^5 células/pocillo y a las 24 horas se transfectaron con apMNKQ2 a las concentraciones de trabajo fijadas. Transcurridas 24 horas, las células se recogieron, se fijaron y tiñeron con Anexina V-FITC y con ioduro de propidio y se analizaron por citometría. En el diagrama de cajas se muestran los valores correspondientes a la suma de las células apoptóticas (EA, *Early Apoptosis*) y apoptóticas tardías (LA, *Late Apoptosis*) y expresadas como el porcentaje respecto a las células control. Las cajas representan la mediana \pm el máximo y el mínimo de 4 experimentos independientes (* $p < 0.05$).

Del mismo modo, para ratificar que apMNKQ2 es capaz de aumentar la apoptosis en las líneas celulares, se valoró la actividad de la caspasa 3, una proteasa que se activa en apoptosis. El estudio por western blot se realizó sobre dos sustratos endógenos de la caspasa 3: la enzima Poli ADP-Ribosa (PARP), procesada en estadios apoptóticos tardíos, y la proteína α -espectrina. La actividad de la caspasa 3 da lugar a patrones de proteólisis característicos sobre ambas proteínas, con fragmentos específicos de 89 kDa para PARP y de 150 y 120 kDa para α -espectrina.

En la **Figura 29** se muestra la inmunodetección de los fragmentos producidos por la proteólisis de PARP y de α -espectrina en las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, 24 horas post-transfección con los aptámeros apMKNKQ2 y AT. Los resultados evidencian el efecto apoptótico de apMKNKQ2 sobre las tres líneas celulares.

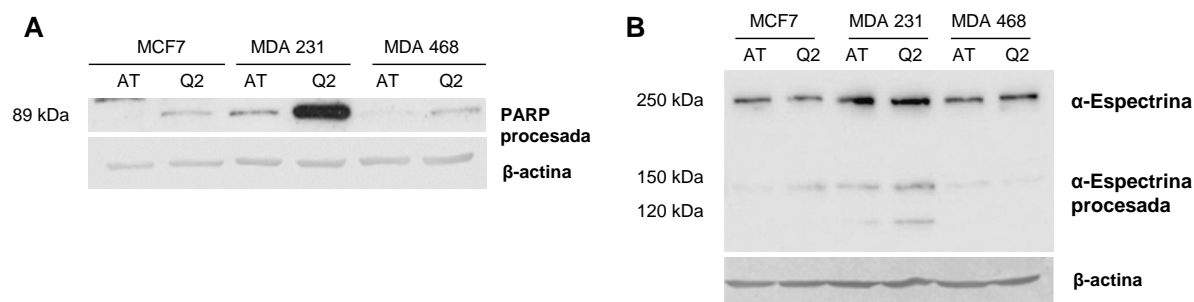


Figura 29. Efecto de apMKNKQ2 sobre la actividad de la caspasa 3 mediante los sustratos PARP y α -espectrina en las líneas celulares de mama. Inmunodetección con anticuerpos específicos mediante SDS-PAGE 12% de PARP procesada (**A**) y α -espectrina (**B**) para detectar la actividad proteolítica de la caspasa 3 tras la transfección de las líneas MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 con apMKNKQ2 y el aptámero control AT. La actividad de esta proteasa da lugar a patrones de proteólisis característicos con fragmentos específicos de 89 kDa para PARP y de 150 y 120 kDa para α -espectrina.

4.3 Efecto de apMKNKQ2 sobre la actividad clonogénica.

Los ensayos de formación de colonias son experimentos de supervivencia celular *in vitro* que se basan en la capacidad de una sola célula para formar una colonia, la cual debe de estar constituida por al menos 50 células (Puck *et al.* 1956). La capacidad de proliferación de las células madre es un requisito para la integridad y función de los tejidos normales, mientras que en los tumores se requiere la erradicación de esta capacidad para la prevención de recidivas (Franken *et al.* 2006). Esta característica de algunas células tumorales, que ocurre como consecuencia de la pérdida de la inhibición por contacto, se utiliza en esta técnica para determinar los efectos de agentes citotóxicos y terapias antitumorales permitiendo estudiar la capacidad tumorigénica de las células (Rafehi *et al.* 2011). De esta manera, se podrá analizar la efectividad del aptámero apMKNKQ2 estudiando si la célula mantiene la capacidad de dividirse de forma ilimitada después del tratamiento.

Anteriormente habíamos establecido para estos ensayos 1000 células/pocillo en placas de 6 pocillos para las líneas MCF7 y MDA-MB-231; sin embargo, la PE de las células MDA-MB-468 fue menor (11.5 ± 5.3 %), por lo que se sembraron 5000 células. Las células se transfectaron con apMKNKQ2 y el control AT, y a las 24 horas se recogieron y se re-sembraron para realizar el ensayo de formación de colonias. La cuantificación de las colonias se realizó a los 9-12 días de la siembra.

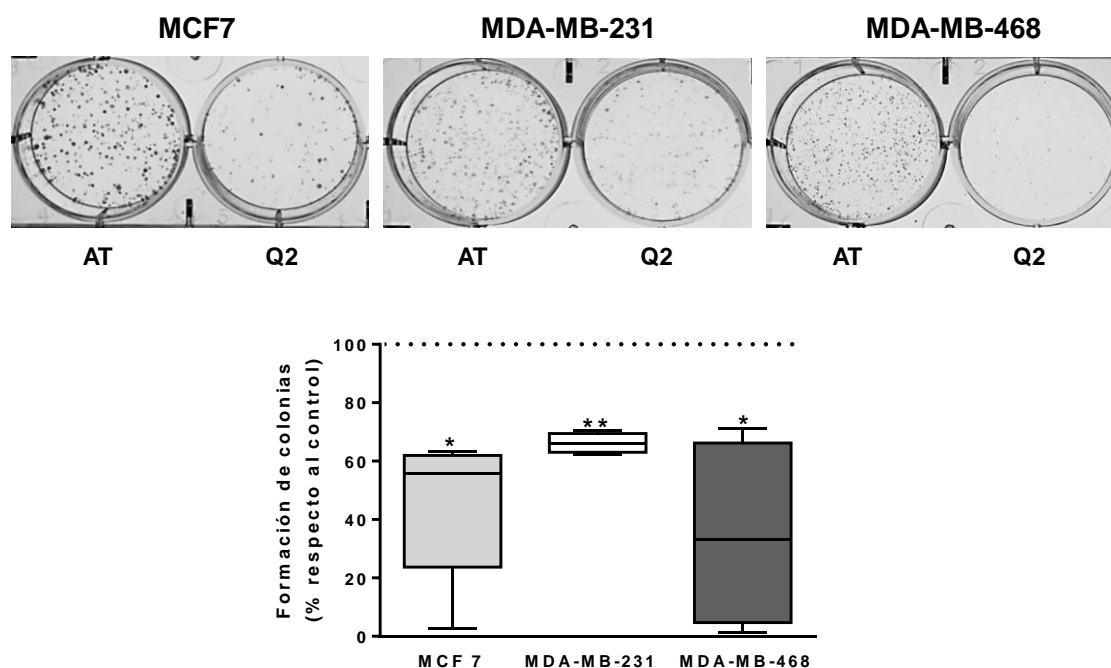


Figura 30. Efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad clonogénica de las células. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron en p24 a densidad 3×10^4 células/pocillo y se transfectaron a las 24 horas con apMNKQ2 a las concentraciones de trabajo establecidas previamente. Transcurridas 24 horas, las células se levantaron, contaron y sembraron en p6 con 1000 células/pocillo para MCF7 y MDA-MB-231 y con 5000 células/pocillo para MDA-MB-468. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 4-5 experimentos independientes (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al aptámero control AT).

La **Figura 30** muestra la acción inhibitoria del aptámero apMNKQ2 con respecto al aptámero control AT. Esta inhibición en la formación de colonias es estadísticamente significativa para las tres líneas celulares con respecto al control y con diferente eficacia según la línea celular.

5. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LA ACTIVIDAD METASTÁSICA DE LAS CÉLULAS DE MAMA

5.1 Efecto de apMNKQ2 en la migración e invasión celulares

Para analizar el efecto del aptámero sobre la migración celular, se llevaron a cabo experimentos utilizando transwells en lugar de la técnica *Wound healing*. Las células se transfectan con los aptámeros y a las 6 horas se retira el medio y se añade medio sin suero. A las 18 horas se recogen, se cuentan y se siembran 40 000 células en pequeñas "cestas" en medio sin suero, y estas se sumergen en el pocillo de la placa con suero completo de forma que el suero actúe como quimio-atrayente y las células migren de la cesta al pocillo

atravesando la membrana del transwell. Tras 24 horas, las células que han atravesado la membrana del transwell se fijan y se tiñen con Hoechst para su posterior cuantificación por microscopía de fluorescencia (**Figura 31A**).

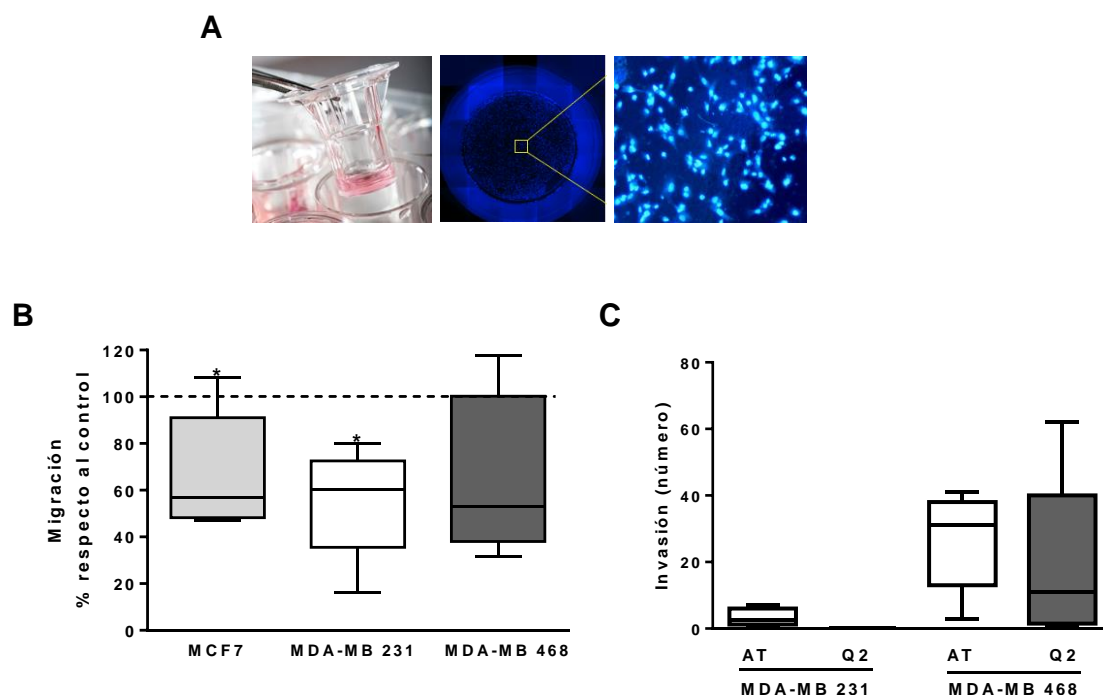


Figura 31. Efecto del aptámero apMKNQ2 en la migración y la invasión de las líneas celulares de mama. Las células se sembraron en p6 a una densidad de 2.5×10^5 células/pocillo y se transfectoraron con apMKNQ2 a las 24 horas con las concentraciones de trabajo establecidas. A las 6 horas se deprivan de suero, y tras 24 horas se recogen y re-sembran (4×10^4 células/pocillo) en un transwell sin y con matrigel, para hacer ensayos de migración e invasión, respectivamente. A las 24 horas se tiñen las membranas de los transwell con Hoechst y se cuantifican las células que la han atravesado por microscopía de fluorescencia. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 4-5 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al aptámero control AT).

Como se muestra en la **Figura 31B**, apMKNQ2 fue capaz de inhibir la migración en las tres líneas celulares, aunque de forma estadísticamente significativa en MCF7 y en MDA-MB-231. Asimismo, se realizaron ensayos de invasión con transwell, aunque en este caso a las “cestas” se les añadió matrigel, una preparación de membrana basal solubilizada extraída de sarcoma de ratón. Las células se siembran sobre él y migrarán hacia el estímulo degradando la matriz (**Figura 31C**).

En los ensayos de invasión no se incluyeron las células MCF7 porque en experimentos preliminares en nuestro laboratorio en condiciones control no se observó invasión después de 48 horas en esta línea celular. Sin embargo, el aptámero apMKNQ2 produjo una considerable reducción de la invasión en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (**Figura 31C**).

Los resultados anteriores muestran la capacidad del aptámero apMNKQ2 de inhibir procesos característicos de las células tumorales como la migración y la invasión.

5.2 Efecto de apMNKQ2 en la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)

Se realizaron zimogramas con objeto de estudiar el efecto del aptámero apMNKQ2 en la actividad de las metaloproteinasas (MMPs), proteínas encargadas de degradar la matriz extracelular para ayudar en el proceso migratorio e invasivo de las células. Esta técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con gelatina en condiciones no desnaturalizantes (para evitar la pérdida de la actividad de las enzimas) permite poner de manifiesto la actividad de las MMPs analizando la degradación de la gelatina, que sirve de sustrato a las enzimas.

En la **Figura 32** se muestra que el aptámero apMNKQ2 no produce ningún efecto sobre la actividad de las metaloproteinasas respecto al efecto del aptámero control AT. Esto puede deberse a la alta actividad de estas enzimas presentes en las células tumorales.

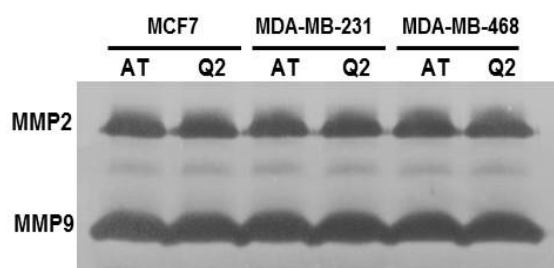


Figura 32. Efecto del aptámero apMNKQ2 sobre la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9. Los sobrenadantes de las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 previamente transfectadas con apMNKQ2 a las concentraciones de trabajo fijadas se recogieron a las 24 horas tras la transfección. La detección se realizó como se indica en Materiales y métodos.

A continuación, se analizó la expresión de marcadores de distintos estadios: como marcador epitelial se escogió la ocludina, una proteína de adhesión celular de membrana que cumple la función de unir las proteínas transmembrana al citoesqueleto de actina y a otras proteínas de señalización en la primera etapa de la TEM, y que está asociada a células no migratorias (células epiteliales); como marcador mesenquimal se estudió la Proteína Específica de Fibroblasto 1 (FSP1), asociada con la morfología y la motilidad de las células mesenquimales y que se expresa durante la transformación que ocurre en la TEM.

Los resultados obtenidos en la PCR cuantitativa mostrados en la **Figura 33** indican que las tres líneas celulares expresan ocludina, siendo la expresión más alta en las células MCF7 como corresponde a células de tipo epitelial. Por el contrario, la expresión de FSP1 es bastante más alta en las células MDA-MB-231. Esto correlaciona con la clasificación de esta línea celular puesto que se encuentra dentro del grupo Triple-negativo B, con morfología y

características de tipo mesenquimal. La expresión de FSP1 es menor en MDA-MB-468 y muy baja en las MCF7, como corresponde a células de tipo Luminal.

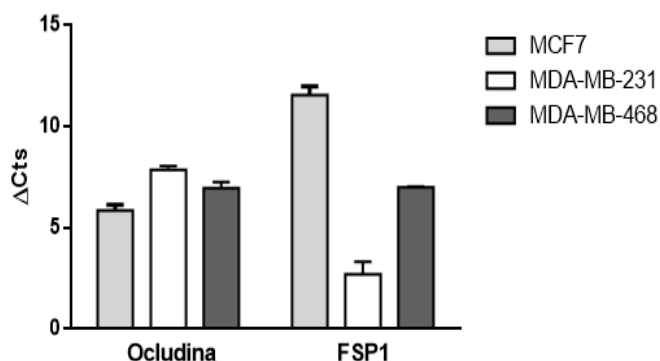


Figura 33. Expresión de marcadores de TEM en las líneas celulares de mama. Niveles de expresión de ocludina (marcador de estado epitelial) y de FSP1 (marcador mesenquimal) en las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 mediante qPCR como se indica en Materiales y métodos. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a la β -actina, y las barras representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

Una vez caracterizada la expresión de estos marcadores de transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares estudiadas, quisimos ver si apMKNKQ2 revierte el estado mesenquimal a un estado epitelial. Los resultados indican que el aptámero apMKNKQ2 produce un aumento en la expresión de ocludina en las tres líneas celulares con respecto al aptámero control, aunque sólo de forma estadísticamente significativa en las células MDA-MB-231 (**Figura 34A**). Asimismo, la expresión del marcador mesenquimal FSP1 disminuye en las células MCF7 y MDA-MB-231, en estas últimas de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, apMKNKQ2 no parece afectar la expresión de FSP1 en las células MDA-MB-468 (**Figura 34B**).

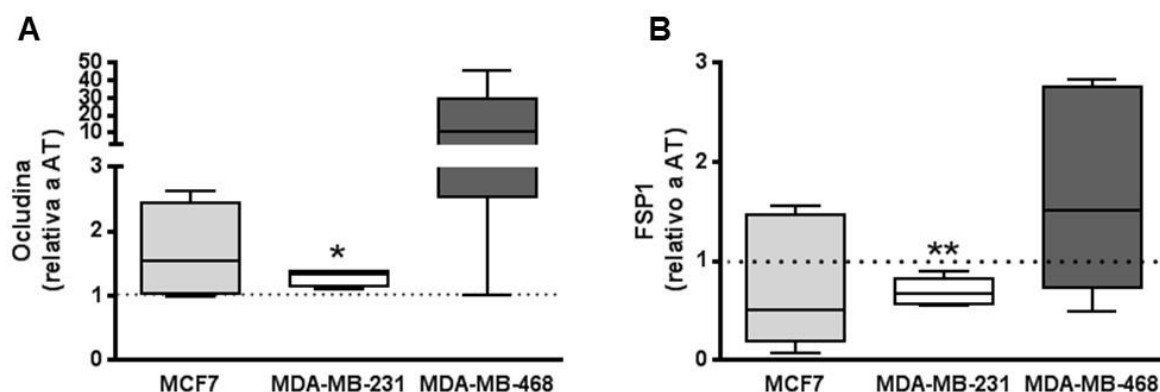


Figura 34. Efecto del aptámero sobre los niveles de expresión de marcadores de TEM en las líneas celulares de mama. Las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron en p6 a una densidad de 2.5×10^5 células/pocillo y se transfectaron con los aptámeros apMKNKQ2 y AT a la concentración de trabajo establecida anteriormente 24 horas después de la siembra. A las 24 horas tras la transfección, las células se recogieron y se aisló y purificó el RNA como se indica en Materiales y métodos. Los niveles de mRNA de ocludina (**A**) y FSP1 (**B**) se analizaron mediante qPCR. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 4-5 experimentos independientes (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al control AT).

5.3 Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de eIF4E y los niveles de MCL1

Para evaluar el efecto del aptámero apMNKQ2 sobre MNK1, se analizó la fosforilación de su sustrato mejor caracterizado, eIF4E, así como los niveles de MCL1. MCL1 es una proteína anti-apoptótica que pertenece a la familia de proteínas que regulan la apoptosis Bcl-2. El aumento de sus niveles promueve el mantenimiento de la viabilidad celular, así como la resistencia a terapias que inducen apoptosis. MCL1 está regulada por MNK1, tal y como han observado distintos autores (Wendel *et al.* 2007, Diab *et al.* 2016, Li *et al.* 2016) y como hemos publicado recientemente en nuestro laboratorio (Pinto-Diez *et al.* 2018).

En la **Figura 35A** se muestran los niveles de eIF4E fosforilado presentes en las células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, 24 horas después de haber sido transfectadas con el aptámero apMNKQ2. Como se puede observar, no se produce una disminución significativa de la fosforilación de eIF4E en ninguna de las 3 líneas celulares.

Por otra parte, es interesante señalar que apMNKQ2 redujo de forma significativa los niveles de la proteína antiapoptótica MCL1 en las células MCF7 y MDA-MB-231. Estos menores niveles se observan asimismo en las células MDA-MB-468, aunque la diferencia en este caso no es estadísticamente significativa. Estos resultados confirmarían el efecto proapoptótico del aptámero descrito anteriormente (apartado 4.2).

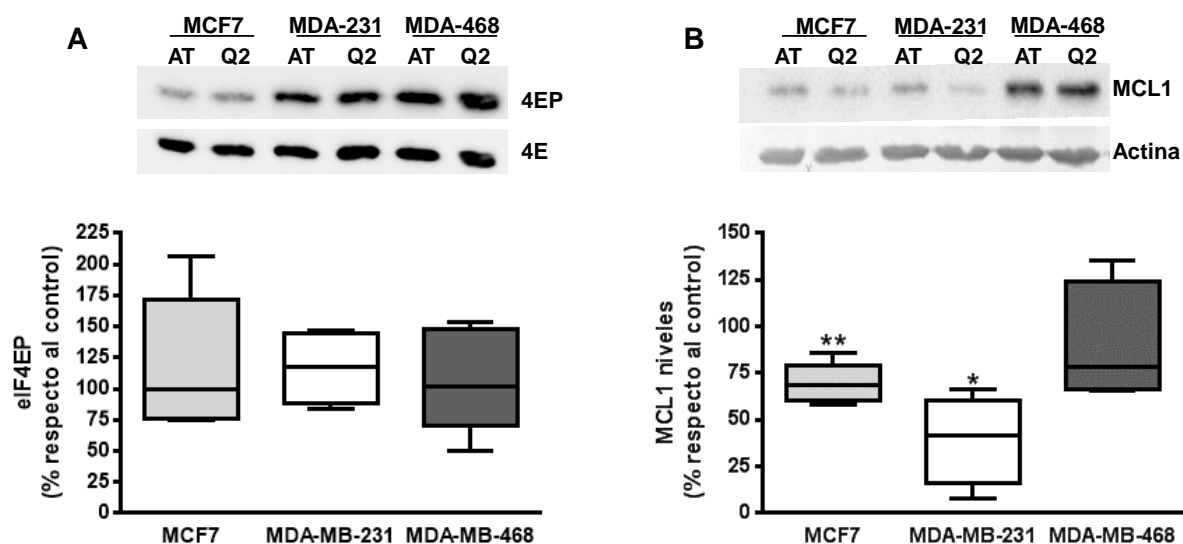


Figura 35. Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de eIF4E y los niveles de MCL1. (A) Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) de eIF4EP en células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 a las 24 horas post-transfección de las células con los aptámeros. (B) Inmunodetección de MCL1 en MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, 24 horas tras la transfección de las células con los aptámeros. Los valores se normalizaron respecto al aptámero control AT en (A) y en (B). Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 5 experimentos independientes (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al control).

6. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE apMKNQ2 IN VIVO EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE-NEGATIVO.

Para estos ensayos se utilizó un modelo de xenoinjerto ortotópico con las células MDA-MB-231. A la vista de los resultados previos en los que se observó que el aptámero apMKNQ2 es muy poco eficiente cuando es añadido solo a las células (**Figuras 22 y 23**), se decidió emplear un sistema de transfección *in vivo* para DNA y siRNAs, *in vivo*-jetPEI (Polyplus transfection, Francia). En primer lugar, comprobamos la actividad de apMKNQ2 y apMKNQ2 conjugado con Alexa fluor-488 utilizando este sistema de transfección en cultivos celulares de células MDA-MB-231 (**Figura 36**). La inhibición de la actividad MTT por apMKNQ2 (conjugado y no conjugado) es mayor del 90% cuando se utiliza *in vivo*-jetPEI, siendo más eficiente que la lipofectamina 2000.

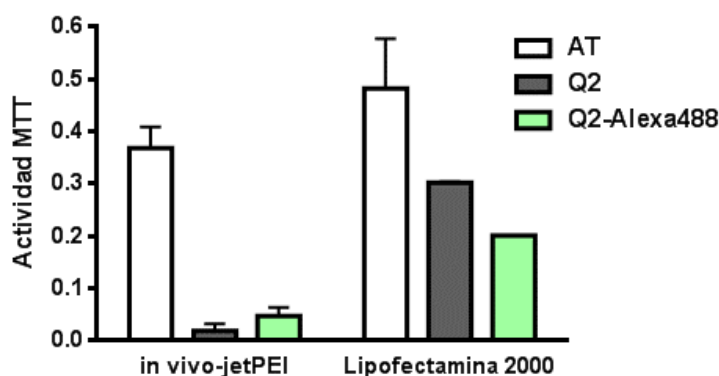
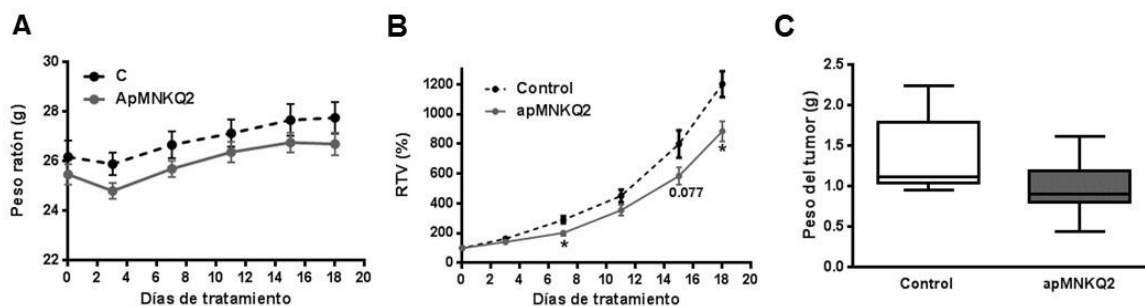


Figura 36. Medida de la actividad MTT en las líneas de mama tras la transfección con *in vivo*-jetPEI o lipofectamina 2000. Las células MDA-MB-231 se sembraron en p96 a una densidad de 10^4 células/pocillo, y a las 24 horas se transfectaron con los distintos aptámeros acomplejados a una concentración de 400 nM con los dos transfectantes. Tras 48 horas se realizaron los ensayos de MTT. Las gráficas representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

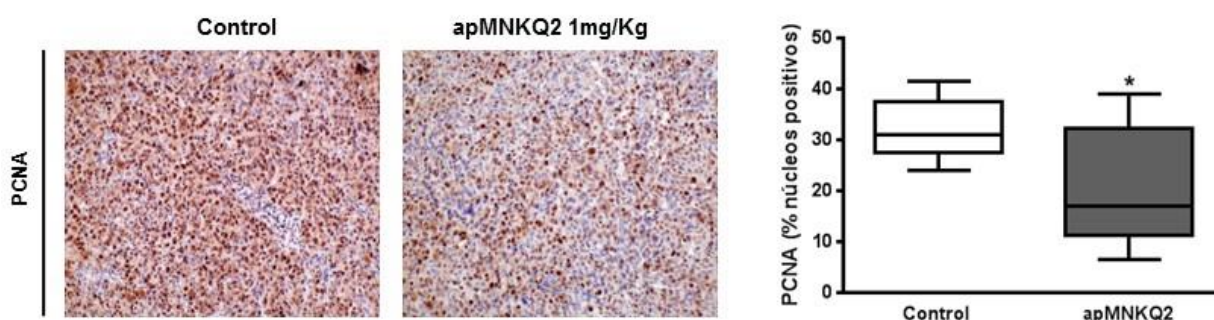
Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en ratones atímicos a los que se inocularon las células MDA-MB-231 generando así tumores ortotópicos. Cuando estos tumores alcanzaron un volumen de 100 mm^3 , los ratones se repartieron aleatoriamente en dos grupos de 9 animales. Al grupo de ratones tratados se les administró por vía intravenosa una solución de glucosa al 5% que contenía complejos apMKNQ2:jetPEI (ratio N/P 6) a una dosis de 1 mg/Kg de aptámero, tres veces por semana. Al grupo control se les inyectó la solución de glucosa al 5% que contenía el mismo volumen de reactivo *in vivo*-jetPEI y de buffer de aptámeros. Como parámetros de seguimiento se midieron el volumen tumoral (asumiendo que son elipsoides) y el peso de los animales.

Como se puede observar en la **Figura 37A**, no hubo diferencias de peso de los ratones tratados con el aptámero en comparación con los ratones control. Sin embargo, los resultados indican una reducción significativa de un 20% del volumen relativo del tumor (RTV) de los ratones tratados con una dosis de apMKNQ2 1mg/Kg, calculado como el volumen del tumor

a cada tiempo dividido entre el volumen inicial del tumor antes del tratamiento ($RTV = V_t/V_0 \times 100$) (**Figura 37B**). Además, los resultados también muestran una reducción del peso del tumor de los ratones tratados, aunque no de forma estadísticamente significativa (**Figura 37C**).



Tras los resultados tan prometedores de disminución del RTV, analizamos la capacidad proliferativa de las células, mediante inmunohistoquímica en el tejido tumoral de los ratones tratados y no tratados con apMNKQ2 utilizando el marcador de proliferación celular PCNA. En las imágenes de la **Figura 38** se puede apreciar una reducción del 50% en el número de núcleos positivos para PCNA en los animales tratados con apMNKQ2 respecto a los no tratados.



Por último, se analizaron los niveles de la proteína pro-apoptótica MCL1, así como el procesamiento de los sustratos de la caspasa 3, PARP y espectrina, en los tumores

procedentes de los animales controles y tratados con apMNKQ2. Como se observa, el aptámero reduce la expresión de MCL1 de forma significativa (**Figura 39A**) y aumenta el procesamiento de PARP y espectrina en los lisados obtenidos a partir de estos tumores (**Figura 39 B y C**), confirmando los resultados obtenidos previamente en los experimentos *in vitro* (**Figuras 29 y 35**).

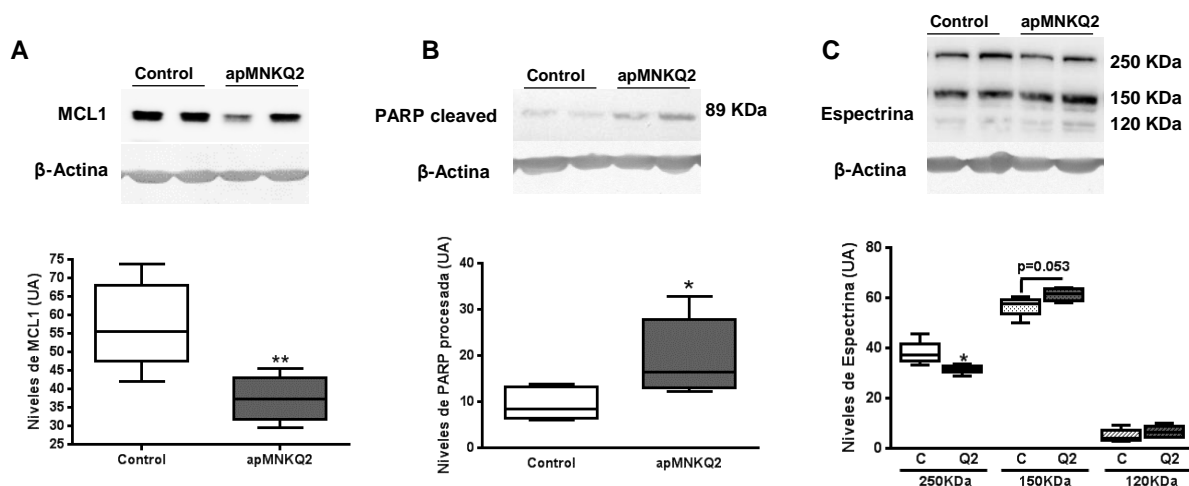


Figura 39. Efecto de apMNKQ2 en la expresión proteica. Inmunodetección de **(A)** MCL1, **(B)** PARP procesada y **(C)** α -espectrina. Los valores obtenidos tras la cuantificación se normalizaron respecto a los de β -actina, que se utilizó como control de carga. Las cajas representan la media \pm el máximo y el mínimo de 5 animales (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al control).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia en el mundo (11.6% del total de casos) por detrás del cáncer de pulmón. Entre las mujeres, el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado y el que lidera las muertes en mujeres con cáncer (Bray *et al.* 2018).

A pesar de los avances en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento y, por lo tanto, del consiguiente aumento de la supervivencia, sigue siendo una enfermedad compleja y heterogénea que en muchos casos no tiene cura, con un tiempo medio de supervivencia de 18-24 meses dependiendo de la extensión del tumor y de sus perfiles histopatológicos y moleculares (Toss *et al.* 2017).

En este trabajo se ha pretendido comprobar la utilidad del aptámero apMNKQ2, optimizado a partir del aptámero apMNK2F (García-Recio *et al.* 2016), previamente seleccionado en nuestro laboratorio frente a la proteína MNK1b, como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer de mama. Para ello, se han estudiado tanto sus características moleculares como su efecto antitumoral en líneas de cáncer de mama y en un modelo de cáncer de mama en ratón.

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este estudio son MCF7 (ER+PR+HER-), MDA-MB-231 (ER-PR-HER-) y MDA-MB-468 (ER-PR-HER-), representando las primeras al subtipo Luminal A y las dos siguientes al Triple-negativo.

El aptámero apMNKQ2 descrito en esta tesis tiene estructura *G-quadruplex* como demuestran los ensayos de RMN (**Figura 12**). El *G-quadruplex* es una estructura secundaria del DNA que tiende a aparecer en regiones ricas en guaninas, en la que cuatro segmentos de una misma hebra se disponen en paralelo gracias a la interacción mediante puentes de hidrógeno entre las guaninas (Capra *et al.* 2010). Las 4 guaninas pueden contemplarse como los vértices de un plano, y entre dos de estos planos se dispone un catión, preferentemente monovalente, que contribuye a estabilizar la estructura (**Figura 40**).

Los *G-quadruplex* se forman preferentemente en algunas regiones del genoma como en los telómeros, en promotores de genes (incluyendo promotores de genes oncogénicos) y en DNA ribosomal (rDNA). Estas estructuras también se forman a nivel de RNA y son particularmente frecuentes en regiones no traducidas del mRNA. Actualmente se acepta que los *G-quadruplex* existen *in vivo* y juegan un papel importante en distintos procesos biológicos clave como la transcripción, la replicación, la traducción y el mantenimiento de los telómeros.

Además, estudios recientes sugieren que existe una relación entre los *G-quadruplex*, la regulación génica y el desarrollo de distintas enfermedades (Kwok *et al.* 2017).

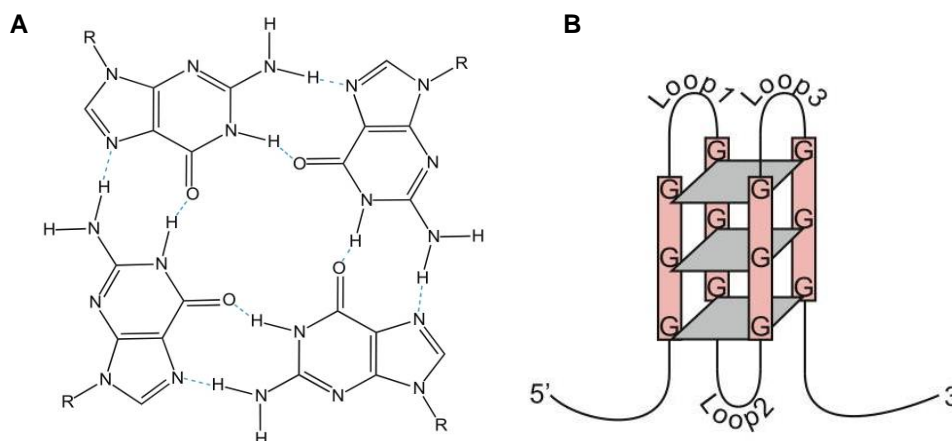


Figura 40. Estructura *G-quadruplex*. (A) Estructura de un cuarteto de guaninas. El anillo plano de cuatro guaninas unidas a hidrógeno está formado por guaninas de distintos segmentos separadas por bucles. (B) Esquema de un *G-quadruplex* intramolecular que consta de tres cuartetos de guaninas. Las estructuras *G-quadruplex* intermoleculares también pueden formarse a partir de dos o cuatro cadenas. Tomado de (Capra *et al.* 2010)

La estructura *G-quadruplex*, aunque aparentemente rígida, muestra una considerable plasticidad. En este alto nivel de adaptabilidad participan múltiples elementos: 1) el carácter intramolecular o intermolecular del sistema; 2) la dirección paralela o antiparalela de los segmentos ricos en guanina en el ensamblaje *G-quadruplex*; 3) la longitud, la secuencia y la dirección de los bucles; 4) la orientación *syn* o *anti* de las guaninas alrededor de los enlaces N-glucosídicos; y 5) el número de cuartetos G consecutivos formados. Todo parece indicar que las conformaciones *G-quadruplex* intramoleculares se forman generalmente de manera preferente frente a las intermoleculares, con bucles de 2–4 bases, adoptando a menudo una disposición antiparalela con orientaciones *Syn/anti* alternadas. El número más común de cuartetos G consecutivos es 2 o 3, para evitar una conformación excesivamente rígida (Platella *et al.* 2017).

Una posible explicación para el alto número de secuencias formadoras de *G-quadruplex* obtenidas en los procesos de selección de aptámeros es la significativa densidad de carga del *G-quadruplex* de DNA, dos veces la carga negativa por unidad de longitud en comparación con el DNA dúplex. El alto potencial electrostático da lugar a una fuerte unión a la carga positiva superficial de las proteínas, aunque las interacciones hidrófobas también pueden ser críticas para la unión a la diana de forma fuerte y específica (Platella *et al.* 2017).

Los aptámeros que contienen estructuras *G-quadruplex* suelen ser termodinámica y químicamente estables, resistentes a las nucleasas del suero, menos inmunogénicos y alcanzan más fácilmente el interior celular (Kwok *et al.* 2017).

Se han descrito varios aptámeros como agentes terapéuticos frente a diferentes patologías humanas como la degeneración macular relacionada con la edad, las enfermedades neurodegenerativas, la inflamación, la diabetes, etc. De hecho, hasta la fecha, once aptámeros se encuentran en ensayos clínicos para su uso como agentes terapéuticos (**Tabla III**).

Cabe destacar que entre los aptámeros con actividad terapéutica en cáncer, se han descrito seis que adoptan estructura *G-quadruplex*: 3R02 de 25 nt frente a la proteína VEGF (Nonaka *et al.* 2013), HJ24 de 78 nt frente a la proteína Shp2 (Hu *et al.* 2011), T40214 de 16 nt frente a la proteína STAT3 (Jing *et al.* 2003), AS1411 de 26 nt frente a la proteína Nucleolina (Bates *et al.* 2009), BC15 de 74 nt frente a la proteína hnRNP A1 (Li *et al.* 2012) y el aptámero apMNK2F de 75 nt frente a la proteína MNK1b (García-Recio *et al.* 2016). De los seis aptámeros mencionados, cuatro de ellos tienen actividad en cáncer de mama.

AS1411 es un aptámero de DNA rico en guaninas que contiene estructuras *G-quadruplex*. Este aptámero se seleccionó por su actividad antiproliferativa en cáncer y, posteriormente, se identificó a la nucleolina como su diana. Esta proteína se une preferentemente a ácidos nucleicos con estructuras *G-quadruplex* y se expresa a altos niveles en la superficie de las células cancerosas. La internalización celular de AS1411 es muy eficiente en comparación con otras secuencias de DNA que no contienen estructuras *G-quadruplex*, por lo que numerosos grupos de investigación lo han utilizado como agente de direccionamiento para internalizar nanopartículas, oligonucleótidos y moléculas pequeñas en las células cancerosas. Los estudios en modelos animales han demostrado que las moléculas ligadas a AS1411 se acumulan selectivamente en los tumores después de la administración sistémica. Los ensayos en humanos han indicado que el AS1411 es seguro y puede inducir remisiones duraderas del tumor en algunos pacientes (Bates *et al.* 2017).

En el artículo en el que se describe el aptámero parental de AS1411, GRO29A de 29 nucleótidos de longitud, se mostraba que la estructura *G-quadruplex*, así como la modificación del extremo terminal 3' con un grupo propilamino, protegían al aptámero de la degradación en medio con suero durante al menos 24 horas (Bates *et al.* 1999). Cabe destacar que el aptámero apMNKQ2, en el que no se ha incluido ninguna modificación, se mantiene íntegro al menos 72 horas (tiempo más largo ensayado) en presencia de plasma. Esto sugiere que la estructura *G-quadruplex* que presenta apMNKQ2, caracterizada por tener 5 planos, le confiere

una mayor estabilidad que la estructura *G-quadruplex* que forma el aptámero GRO29A, que sólo forma 4 planos.

Por otra parte, el análisis *in silico* utilizando el programa QGRS Mapper predice la misma estructura *G-quadruplex* tanto para el aptámero Vap7 de 66 nucleótidos como para su versión truncada 3R02. Por el contrario, los datos obtenidos mediante dicroísmo circular sugerían estructuras diferentes, lo que podría ser responsable del aumento de su afinidad por la diana de hasta 16 veces (K_d 300 pM) (Nonaka *et al.* 2013). En este trabajo mostramos mediante dicroísmo circular que apMNKQ2 y la versión más larga de 48 nt, apMNK2FT, conservan la misma estructura *G-quadruplex* y presentan una afinidad por su diana, MNK1b, similar (15.47 ± 2.36 nM y 8.47 ± 1.1 nM, respectivamente). Sin embargo, la eliminación de 19 nucleótidos sí parece afectar a la especificidad de los aptámeros, puesto que apMNKQ2 no sólo no ha perdido actividad, sino que ha mejorado su especificidad por la isoforma MNK1b (**Figuras 15 y 16**). Aptámeros modificados con moléculas tipo 2'-F-ANA (ácido 2'-fluoroarabinonucleico) muestran K_d significativamente menores que el aptámero no modificado y les confiere estructuras *G-quadruplex* altamente estables (Lietard *et al.* 2017). Probablemente incluir este tipo de modificaciones sería una interesante estrategia para optimizar la afinidad de apMNKQ2 por su diana.

Una de las propiedades que se buscan a la hora de identificar nuevos fármacos antitumorales es su capacidad de inhibir procesos implicados en el desarrollo del propio tumor como proliferación celular, apoptosis y actividad clonogénica. En este sentido, hemos demostrado que el aptámero apMNKQ2 es capaz de reducir la viabilidad en tres líneas celulares de cáncer de mama humanas (MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468) (**Figura 24**), principalmente por medio de la inducción de apoptosis mediada por caspasa 3 (**Figuras 28 y 29**). En cualquier caso, no se puede descartar que se produzca además la inhibición de la proliferación celular, ya que los estudios de citometría de flujo indican que las líneas MCF7 y MDA-MB-468 sufren una parada del ciclo en la fase S (**Figura 26**).

Aunque la mayoría de los inhibidores de las MNKs producen un efecto antiproliferativo, se han descrito algunos casos en los que la proliferación no está afectada. Así, el inhibidor MNK-7g, derivado de una retinamida, no afecta a la distribución de las células MDA-MB-231 en el ciclo celular y tampoco cambia la proporción de células en fase sub G0, indicando que no afecta a la viabilidad de las células. Sin embargo, es capaz de ejercer su acción inhibiendo la migración en la línea MDA-MB-231, lo que sugiere que MNK estaría afectando a procesos relacionados con metástasis (Jin *et al.* 2018). Otro grupo de investigadores (Teo *et al.* 2015a) tampoco ven efectos en el ciclo celular con el inhibidor que afecta sólo a MNK2, pero sí con el que afecta a ambas isoformas MNK1 y MNK2, lo que sugiere que MNK1 debe jugar cierto

papel en la proliferación celular. En este sentido, el aptámero apMNKQ2 muestra un ligero efecto antiproliferativo que produce puede justificarse por su mayor especificidad por MNK1.

En general, los inhibidores de MNK presentan valores de GI50 en el rango micromolar, aunque son dependientes del tipo celular y/o del tipo de tumor. Además, los inhibidores más tradicionalmente utilizados de las MNKs (CGP57380 y cercosporamida) han demostrado ser inespecíficos puesto que se unen a otras quinasas que comparten similitudes con MNK. Por esta razón se han realizado esfuerzos para identificar nuevos inhibidores que puedan ser más específicos aunque los nuevos inhibidores obtenidos siguen presentando valores de GI50 en el rango micromolar (Dreas *et al.* 2017, Reich *et al.* 2018). Es interesante señalar que todos los inhibidores de MNK descritos hasta la fecha reconocen tanto a MNK1 como a MNK2. Sin embargo, datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que apMNK2F, aptámero parental de apMNKQ2, es específico de MNK1. Este resultado puede ser debido a que mientras la mayoría de los inhibidores de MNKs se han obtenido buscando moléculas que bloqueasen la actividad quinasa, en concreto, el sitio catalítico del enzima, el cual está muy conservado en diferentes quinasas, apMNK2F se obtuvo mediante un proceso de selección frente a la proteína MNK1. Aunque el aptámero apMNKQ2 no ha sido todavía evaluado en lo que se refiere a su afinidad por MNK2, sería esperable que, al igual que la molécula parental, no mostrase afinidad por MNK2. De confirmarse este resultado, apMNKQ2 sería el primer inhibidor específico de MNK1 en desarrollarse.

La metástasis es un proceso complejo que requiere múltiples eventos, entre los que se incluyen la transición epitelio-mesénquima (TEM) de las células cancerosas epiteliales, la inducción de angiogénesis y la intravasación y extravasación de células cancerosas, de forma que las células recuperarán rasgos epiteliales (TME, transición mesénquimo-epitelial) y finalmente formarán una nueva colonia en el microentorno distante apropiado (Mao *et al.* 2013). En este trabajo hemos demostrado que apMNKQ2 es capaz de inhibir la migración en las tres líneas celulares de cáncer de mama humanas estudiadas, así como la invasión en las dos líneas Triple-negativo (invasivas) (**Figura 31**). Por otra parte, el aptámero parece estar implicado en la TME ya que afecta a la expresión de proteínas que se consideran marcadores de este proceso (**Figura 34**).

Muchos de los inhibidores de MNK son capaces de inhibir los procesos asociados a la metástasis como la migración (Wang *et al.* 2016, Kwegyir-Afful *et al.* 2017, Jin *et al.* 2018, Lineham *et al.* 2018, Sansook *et al.* 2018, Wang *et al.* 2018), la invasión (Ramalingam *et al.* 2014, Kwegyir-Afful *et al.* 2017, Tian *et al.* 2017, Evans *et al.* 2018, Wang *et al.* 2018) o la transición epitelio-mesénquima (Kwegyir-Afful *et al.* 2017, Evans *et al.* 2018, Matossian *et al.* 2018). Entre los aptámeros antitumorales se han descrito varios que afectan a procesos

implicados en metástasis produciendo la inhibición de migración e invasión en distintos tipos tumorales (Camorani *et al.* 2015, Cheng *et al.* 2016, Kanlikilicer *et al.* 2017, Weisberg *et al.* 2017, Esposito *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2018).

Como hemos mencionado en la sección de resultados, se observan claras diferencias en los niveles de expresión de los marcadores de la transición epitelio-mesénquima analizados entre las distintas líneas celulares. Además, hemos observado que apMNKQ2 no produce un descenso en los niveles de expresión del marcador mesenquimal en la línea celular MDA-MB-468, que tiene características de tipo basal, y que en ninguna de ellas afecta a la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9. A este respecto, se ha demostrado que las células tumorales no necesitan cambiar completamente el fenotipo (epitelial o mesenquimal) para migrar e invadir, lo que justifica la variabilidad de expresión de los distintos marcadores entre las distintas líneas celulares (Christiansen *et al.* 2006). En consecuencia, se puede interpretar que las células tumorales pueden invadir y metastatizar sin perder la morfología epitelial o los marcadores moleculares y sin inducir la expresión de genes mesenquimales. Por lo tanto, el amplio uso del término TEM no siempre puede ser adecuado para describir los diversos procesos asociados a invasión y metástasis, sino que puede representar sólo a un mecanismo que puede contribuir al avance de la malignidad en el carcinoma.

La utilización de apMNKQ2 en las líneas de cáncer de mama da como resultado la inhibición de aquellos procesos que definen a las células tumorales, de forma similar a lo que ocurría con el aptámero parental apMNK2F (Garcia-Recio *et al.* 2016), cuyos efectos sobre MNK1 eran independientes de la fosforilación de eIF4E, el sustrato mejor descrito y caracterizado de las MNKs. Como se menciona en la sección de resultados, el aptámero apMNKQ2 no parece afectar a la fosforilación de eIF4E (**Figura 35**). Estos datos apuntan a que el efecto del aptámero sobre MNK1 podría estar afectando a otros sustratos de MNK o a otras rutas en las que esta proteína está implicada. Así, el grupo de investigación de Blaydes (Wheater *et al.* 2010) observó que el tratamiento de distintas líneas de cáncer de mama (entre ellas las células MDA-MB-231) con el inhibidor de MNK CGP57380, no disminuye la fosforilación de eIF4E en algunas de las líneas analizadas y que la inhibición no es sostenida en el tiempo sino que en muchos casos se revierte a las 72 horas del tratamiento. En el caso del aptámero apMNKQ2, los tratamientos se prolongaron entre 6 y hasta 72 horas y la fosforilación de eIF4E no se vio afectada de forma significativa en ninguna de las líneas celulares estudiadas (datos no mostrados). Este efecto también se muestra en otros estudios publicados utilizando diferentes inhibidores de MNK (Wheater *et al.* 2010, Astanehe *et al.* 2012, Teo *et al.* 2015c, Evans *et al.* 2018, Lineham *et al.* 2018, Sansook *et al.* 2018). Como describimos previamente en nuestro laboratorio (Garcia-Recio *et al.* 2016), una posible

explicación a este hecho es que la principal quinasa implicada en la fosforilación de eIF4E en las líneas celulares utilizadas sea MNK2. Cabe resaltar que resultados previos en nuestro laboratorio indican que el aptámero parental apMNK2F, y muy posiblemente su forma truncada apMNKQ2, no reconocen a la isoforma MNK2 (datos no mostrados). Una posible hipótesis para explicar los efectos de apMNKQ2 sobre su diana MNK1, independientes de la fosforilación del eIF4E, es que impida la fosforilación de otros sustratos de MNK1 como hnRNP A1 o PSF.

La sobreexpresión de la proteína MCL1 se correlaciona con tumores de mama de alto grado y menor tasa de supervivencia (Ding *et al.* 2007). Esta proteína juega un papel importante en la supervivencia de las líneas celulares Triple-negativo (Yang *et al.* 2014, Goodwin *et al.* 2015) y estudios recientes la consideran una diana terapéutica (Xiao *et al.* 2015, Braso-Maristany *et al.* 2016, Bai *et al.* 2017). Previamente se había descrito que un mutante constitutivamente activo de MNK1 promueve la expresión de MCL1 (Wendel *et al.* 2007), lo cual ha sido confirmado en nuestro laboratorio en ensayos en los que la sobreexpresión de MNK1b correlaciona con un aumento de los niveles de esta proteína anti-apoptótica (Pinto-Diez *et al.* 2018). El hecho de que apMNKQ2 disminuya los niveles de MCL1, tanto *in vitro* como *in vivo*, confirma que el aptámero produce su efecto a través de MNK1, posiblemente disminuyendo los niveles del mRNA de MCL1 en el citoplasma y, en consecuencia, produciendo un aumento en la apoptosis que se observa en las tres líneas de cáncer de mama utilizadas en este estudio.

Recientemente, se ha visto que MNK regula la asociación de mTORC1 con el complejo TELO2-DDB1, lo que permite que mTOR fosforile a sus sustratos de forma que se activen los procesos regulados por mTORC1, entre ellos el crecimiento celular (Grzmil *et al.* 2011, Brown *et al.* 2017a, Brown *et al.* 2017b). Además, estos autores muestran que la isoforma MNK1b tiene mucha más afinidad por mTOR que MNK1a. En consecuencia, apMNKQ2 podría estar impidiendo la unión de MNK1 a mTORC1 inhibiendo su actividad. Este mecanismo podría ser especialmente relevante en las células MDA-MB-468 en las que la ruta de PI3K/AKT está constitutivamente activa puesto que presentan una mutación en PTEN.

En los últimos tres años se han descrito otras proteínas implicadas en metástasis que están reguladas por MNK1: i) La proteína ZEB1, *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*, un regulador de la transición epitelio-mesénquima cuya expresión está controlada por MNK1 a través de mecanismos dependientes de la fosforilación de eIF4E y/o hnRNP A1 (Kumar *et al.* 2016); ii) NDRG1, *N-myc downstream regulated gene 1*, regulador negativo de metástasis en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, cuyos niveles aumentan por la inhibición de MNK1 e inhiben la migración en líneas tumorales de mama. Además, MNK1,

pero no MNK2, regula la fosforilación de NDRG1, aunque hasta el momento se desconoce la función de esa fosforilación sobre su papel como inhibidor de la migración (Tian *et al.* 2017); y iii) XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis*, una proteína cuya sobreexpresión en tumores de cáncer de mama inflamatorios (IBC) correlaciona con peor pronóstico en estos pacientes. La inhibición de MNK disminuye los niveles de XIAP en dos líneas tumorales de mama inhibiendo procesos de migración e invasión *in vivo* (Evans *et al.* 2018). La inhibición de MNK1 por apMNKQ2 podría estar afectando a la migración e invasión a través de uno o varios de estos mecanismos.

En la **Figura 41** se resumen los posibles mecanismos sobre los que apMNKQ2 podría estar ejerciendo su función a través de MNK1, independientemente de la fosforilación de eIF4E.

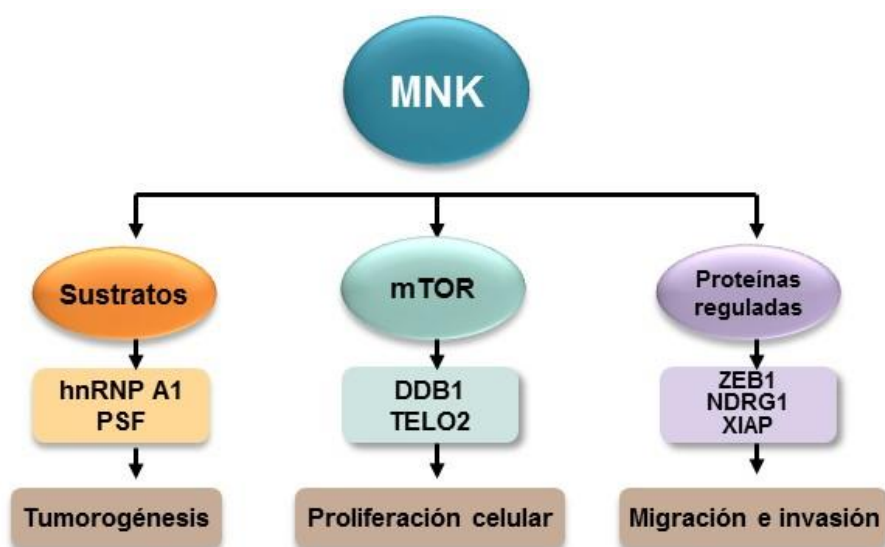


Figura 41: Mecanismos en los que MNK1 está implicada: Transporte de mensajeros a través de otros sustratos de MNK (PSF o hnRNP A1), asociación con el complejo mTORC1 y a través de proteínas reguladas por MNK (ZEB1, NDRG1 o XIAP).

La siguiente etapa en el desarrollo de un fármaco es la validación de su actividad en modelos animales. Un aspecto a considerar en este tipo de ensayos es la vía de administración del fármaco. Desde un punto de vista terapéutico, una de las rutas de administración de fármacos más convenientes es la vía intravenosa ya que asegura alcanzar la máxima concentración en plasma de forma rápida y evita la posibilidad de eliminación por el metabolismo pre-enterohepático. De hecho, otros aptámeros (Bates *et al.* 2009, Fernandez *et al.* 2018), así como otros inhibidores de MNK (Reich *et al.* 2018), son vehiculizados de esta manera obteniéndose muy buenos resultados. Por otra parte, como nuestra diana es intracelular, el aptámero debe alcanzar el interior celular para realizar su efecto, algo que no es necesario cuando las dianas son receptores de membrana (TLR4 o nucleolina). En este

sentido, hemos utilizado el aptámero apMNKQ2 directamente en ensayos *in vitro* observando que se introduce en las células, pero produce un efecto mucho menor que cuando es administrado en forma de complejos con transfectantes. Por este motivo, en los ensayos *in vivo* hemos utilizado el aptámero apMNKQ2 acompañado con el transfectante *in vivo*-JetPEI ya aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y que se utiliza en ensayos clínicos. Cabe plantear que muy posiblemente la vía de entrada del aptámero a la célula con y sin transfectante sea distinta y que, dependiendo del mecanismo de entrada, se pueda perder la estructura que es necesaria para unirse específicamente a MNK1b. Aun tratándose de unos experimentos preliminares en los que se ha utilizado una única dosis de aptámero (1 mg/kg) administrada de forma intravenosa, resulta interesante comprobar que se produce una reducción significativa en el tamaño del tumor, lo que implica que el aptámero ha sido capaz de alcanzar su diana en el interior del mismo.

Otro aspecto clave a considerar es la toxicidad que muestran los antitumorales en general. En un estudio para analizar la toxicidad que produce everolimus (un inhibidor de mTOR), en 24 de 29 pacientes con cáncer de mama encontraron efectos secundarios, de los que el 62% mostraba lesiones en pulmón, otro 62% desórdenes digestivos (colitis, estomatitis, anorexia, diarrea, náuseas), un 29% astenia y un 25% enfermedades en la piel, aunque en la mayor parte de los casos esta toxicidad es baja (Dejust *et al.* 2018). Trastuzumab, un fármaco utilizado en terapia dirigida en cáncer de mama HER2 positivo, produce cardiotoxicidad en pacientes, aunque conocer los factores de riesgo y monitorizar al paciente durante el tratamiento permite el uso de esta terapia adyuvante de forma segura y eficaz (Onitilo *et al.* 2014). En este sentido hay que resaltar la ausencia de toxicidad inespecífica de los aptámeros como agentes terapéuticos de forma general. Por ejemplo, para evaluar la posible toxicidad del aptámero apTLR#4FT *in vivo* se midieron distintos parámetros como las presiones de CO₂ y O₂, o las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en sangre tras la administración intravenosa del aptámero o del vehículo a los animales. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias entre el aptámero ApTLR#4FT y el vehículo, y que no se producían efectos tóxicos (Fernandez *et al.* 2018). En el caso del aptámero AS1411, se realizaron ensayos preclínicos de toxicología en ratas y perros, y los resultados se analizaron mediante autopsia macroscópica e histopatología de todos los órganos, así como con estudios bioquímicos y hematológicos, sin observar efectos tóxicos (Bates *et al.* 2009). Aunque nosotros no hemos analizado aún en profundidad la potencial toxicidad de apMNKQ2, hay que destacar que no se observa ninguna pérdida de peso en los animales tratados con el aptámero, lo que podría ser indicativo de baja toxicidad (Kwegyir-Afful *et al.* 2017, Reich *et al.* 2018).

A la vista del resultado obtenido hemos analizado otros parámetros como el índice de proliferación celular (**Figura 38**), apoptosis y expresión de MCL1 (**Figura 39**). Los resultados correlacionan con los obtenidos en los ensayos usando cultivos celulares, lo que refuerza la idea de que el aptámero es capaz de entrar en la célula reconociendo su diana MNK1 e interfiriendo en su capacidad proliferativa y metastásica.

A lo largo de este trabajo se han presentado evidencias de que el aptámero apMNKQ2 que hemos desarrollado frente a la quinasa MNK1 podría ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento del cáncer de mama y, posiblemente, otros tumores en los que MNK1 juegue un papel relevante. Nuestro propósito es realizar nuevos estudios que nos permitan conocer la dosis óptima efectiva para, posteriormente, llevar a cabo los correspondientes estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos.

CONCLUSIONES

1. El aptámero apMNKQ2 es el resultado de la optimización de un aptámero previamente generado frente a la proteína quinasa MNK1b, la cual juega un papel relevante en la ruta de las MAP quinasas, frente a la que no existen fármacos en la clínica, y que está implicada en mecanismos de resistencia a fármacos frente a la vía PI3K/AKT/mTOR.
2. El aptámero apMNKQ2, que tiene un reducido tamaño (29 nt) y es capaz de formar una estructura *G-quadruplex* formada por cinco planos de guaninas, presenta características moleculares y estructurales que le confieren elevadas estabilidad y especificidad, manteniendo la actividad del aptámero parental.
3. El aptámero apMNKQ2 es capaz de inhibir procesos moleculares característicos de las células tumorales, tanto en lo que se refiere a su actividad tumorogénica (proliferación, inhibición de apoptosis y formación de colonias) como metastásicas (migración e invasión) en células tumorales de mama.
4. En estudios preliminares en un modelo murino de cáncer de mama, el aptámero apMNKQ2 ha demostrado una eficacia significativa reduciendo el volumen de los tumores de los ratones, lo que permite concluir que apMNKQ2 puede ser un potencial fármaco para terapias sustitutivas y/o combinadas, tanto en el tratamiento del cáncer de mama como en otros tumores donde se ha demostrado la implicación de MNK1.

BIBLIOGRAFÍA

Abnous, K., N. M. Danesh, M. Ramezani, *et al.* (2017). "A novel chemotherapy drug-free delivery system composed of three therapeutic aptamers for the treatment of prostate and breast cancers in vitro and in vivo." *Nanomedicine* **13**(6): 1933-1940.

Astanehe, A., M. R. Finkbeiner, M. Krzywinski, *et al.* (2012). "MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition." *Oncogene* **31**(41): 4434-4446.

Badowska-Kozakiewicz, A. M. and M. P. Budzik (2016). "Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer." *Contemp Oncol (Pozn)* **20**(6): 436-443.

Bai, L., B. Zhou, C. Y. Yang, *et al.* (2017). "Targeted Degradation of BET Proteins in Triple-Negative Breast Cancer." *Cancer Res* **77**(9): 2476-2487.

Balogh, Z., G. Lautner, V. Bardoczy, *et al.* (2010). "Selection and versatile application of virus-specific aptamers." *FASEB J* **24**(11): 4187-4195.

Bates, P. J., J. B. Kahlon, S. D. Thomas, *et al.* (1999). "Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding." *J Biol Chem* **274**(37): 26369-26377.

Bates, P. J., D. A. Laber, D. M. Miller, *et al.* (2009). "Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer." *Exp Mol Pathol* **86**(3): 151-164.

Bates, P. J., E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, *et al.* (2017). "G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms." *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**(5 Pt B): 1414-1428.

Bell, J. B., F. D. Eckerdt, K. Alley, *et al.* (2016). "MNK Inhibition Disrupts Mesenchymal Glioma Stem Cells and Prolongs Survival in a Mouse Model of Glioblastoma." *Mol Cancer Res* **14**(10): 984-993.

Berens, C., A. Thain and R. Schroeder (2001). "A tetracycline-binding RNA aptamer." *Bioorg Med Chem* **9**(10): 2549-2556.

Bianchini, A., M. Loiarro, P. Bielli, *et al.* (2008). "Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells." *Carcinogenesis* **29**(12): 2279-2288.

Bilanges, B. and D. Stokoe (2007). "Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies." *Oncogene* **26**(41): 5973-5990.

Bock, C., M. Coleman, B. Collins, *et al.* (2004). "Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis." *Proteomics* **4**(3): 609-618.

Brachmann, S., C. Fritsch, S. M. Maira, *et al.* (2009). "PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents." *Curr Opin Cell Biol* **21**(2): 194-198.

Braso-Maristany, F., S. Filosto, S. Catchpole, *et al.* (2016). "PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer." *Nat Med* **22**(11): 1303-1313.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, *et al.* (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* **68**(6): 394-424.

Brody, E. N., M. C. Willis, J. D. Smith, *et al.* (1999). "The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics." *Mol Diagn* **4**(4): 381-388.

Brown, M. C., J. D. Bryant, E. Y. Dobrikova, *et al.* (2014). "Induction of viral, 7-methyl-guanosine cap-independent translation and oncolysis by mitogen-activated protein kinase-interacting kinase-mediated effects on the serine/arginine-rich protein kinase." *J Virol* **88**(22): 13135-13148.

Brown, M. C. and M. Gromeier (2017a). "MNK Controls mTORC1:Substrate Association through Regulation of TELO2 Binding with mTORC1." *Cell Rep* **18**(6): 1444-1457.

Brown, M. C. and M. Gromeier (2017b). "MNK inversely regulates TELO2 vs. DEPTOR to control mTORC1 signaling." *Mol Cell Oncol* **4**(3): e1306010.

Bundschu, K., U. Walter and K. Schuh (2006). "The VASP-Spred-Sprouty domain puzzle." *J Biol Chem* **281**(48): 36477-36481.

Buxade, M., N. Morrice, D. L. Krebs, *et al.* (2008a). "The PSF.p54nrb complex is a novel Mnk substrate that binds the mRNA for tumor necrosis factor alpha." *J Biol Chem* **283**(1): 57-65.

Buxade, M., J. L. Parra-Palau and C. G. Proud (2008b). "The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases)." *Front Biosci* **13**: 5359-5373.

Camorani, S., E. Crescenzi, D. Colecchia, *et al.* (2015). "Aptamer targeting EGFRvIII mutant hampers its constitutive autophosphorylation and affects migration, invasion and proliferation of glioblastoma cells." *Oncotarget* **6**(35): 37570-37587.

Capra, J. A., K. Paeschke, M. Singh, *et al.* (2010). "G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLoS Comput Biol* **6**(7): e1000861.

Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(1): 50-83.

Costa, F. and J. B. F (2007). "[Treatment of non-small cell lung cancer in elderly patients]." *Rev Port Pneumol* **13**(6): 841-854.

Cruz-Aguado, J. A. and G. Penner (2008). "Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer." *J Agric Food Chem* **56**(22): 10456-10461.

- Culjkovic, B. and K. L. Borden (2009). "Understanding and Targeting the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E in Head and Neck Cancer." *J Oncol* **2009**: 981679.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic and K. L. Borden (2007). "Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E." *Cell Cycle* **6**(1): 65-69.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, L. Skrabanek, *et al.* (2005). "eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR." *J Cell Biol* **169**(2): 245-256.
- Chakravarthy, U. (2006). "Age related macular degeneration." *BMJ* **333**(7574): 869-870.
- Chappell, W. H., L. S. Steelman, J. M. Long, *et al.* (2011). "Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health." *Oncotarget* **2**(3): 135-164.
- Charlton, J., J. Sennello and D. Smith (1997). "In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase." *Chem Biol* **4**(11): 809-816.
- Chen, F., J. Zhou, F. Luo, *et al.* (2007). "Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(3): 743-748.
- Cheng, Y., G. Zhao, S. Zhang, *et al.* (2016). "AS1411-Induced Growth Inhibition of Glioma Cells by Up-Regulation of p53 and Down-Regulation of Bcl-2 and Akt1 via Nucleolin." *PLoS One* **11**(12): e0167094.
- Chrestensen, C. A., A. Eschenroeder, W. G. Ross, *et al.* (2007). "Loss of MNK function sensitizes fibroblasts to serum-withdrawal induced apoptosis." *Genes Cells* **12**(10): 1133-1140.
- Chrestensen, C. A., J. K. Shuman, A. Eschenroeder, *et al.* (2007). "MNK1 and MNK2 regulation in HER2-overexpressing breast cancer lines." *J Biol Chem* **282**(7): 4243-4252.
- Christiansen, J. J. and A. K. Rajasekaran (2006). "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis." *Cancer Res* **66**(17): 8319-8326.
- D'Abronzio, L. S. and P. M. Ghosh (2018). "eIF4E Phosphorylation in Prostate Cancer." *Neoplasia* **20**(6): 563-573.
- Dai, X., H. Cheng, Z. Bai, *et al.* (2017). "Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping." *J Cancer* **8**(16): 3131-3141.
- Darfeuille, F., S. Reigadas, J. B. Hansen, *et al.* (2006). "Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides." *Biochemistry* **45**(39): 12076-12082.
- DaSilva, J., L. Xu, H. J. Kim, *et al.* (2006). "Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation." *Mol Cell Biol* **26**(5): 1898-1907.

Davis, J. P., N. Janjic, B. E. Javornik, *et al.* (1996). "Identifying consensus patterns and secondary structure in SELEX sequence sets." *Methods Enzymol* **267**: 302-314.

De Abreu, F. B., G. N. Schwartz, W. A. Wells, *et al.* (2014). "Personalized therapy for breast cancer." *Clin Genet* **86**(1): 62-67.

De Benedetti, A. and J. R. Graff (2004). "eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases." *Oncogene* **23**(18): 3189-3199.

Dejust, S., D. Morland, C. Bruna-Muraille, *et al.* (2018). "Everolimus-induced pulmonary toxicity: Findings on 18F-FDG PET/CT imaging." *Medicine (Baltimore)* **97**(40): e12518.

Denizot, F. and R. Lang (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Methods* **89**(2): 271-277.

Diab, S., P. Li, S. K. Basnet, *et al.* (2016). "Unveiling new chemical scaffolds as Mnk inhibitors." *Future Med Chem* **8**(3): 271-285.

Ding, Q., X. He, W. Xia, *et al.* (2007). "Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3 β activity and associates with poor prognosis in human breast cancer." *Cancer Res* **67**(10): 4564-4571.

Dobrikov, M., E. Dobrikova, M. Shveygert, *et al.* (2011). "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C $\{\alpha\}$ regulates eIF4G1 binding to Mnk1." *Mol Cell Biol* **31**(14): 2947-2959.

Dostie, J., M. Ferraiuolo, A. Pause, *et al.* (2000). "A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E." *EMBO J* **19**(12): 3142-3156.

Dreas, A., M. Mikulski, M. Milik, *et al.* (2017). "Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Interacting Kinases 1 and 2 (MNK1 and MNK2) as Targets for Cancer Therapy: Recent Progress in the Development of MNK Inhibitors." *Curr Med Chem* **24**(28): 3025-3053.

Drolet, D. W., L. Moon-McDermott and T. S. Romig (1996). "An enzyme-linked oligonucleotide assay." *Nat Biotechnol* **14**(8): 1021-1025.

Duncan, R., S. C. Milburn and J. W. Hershey (1987). "Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F." *J Biol Chem* **262**(1): 380-388.

Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature* **346**(6287): 818-822.

Esposito, C. L., S. Nuzzo, S. Catuogno, *et al.* (2018). "STAT3 Gene Silencing by Aptamer-siRNA Chimera as Selective Therapeutic for Glioblastoma." *Mol Ther Nucleic Acids* **10**: 398-411.

- Evans, M. K., M. C. Brown, J. Geradts, *et al.* (2018). "XIAP Regulation by MNK Links MAPK and NFkappaB Signaling to Determine an Aggressive Breast Cancer Phenotype." *Cancer Res* **78**(7): 1726-1738.
- Fan, S., S. S. Ramalingam, J. Kauh, *et al.* (2009). "Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues." *Cancer Biol Ther* **8**(15): 1463-1469.
- Fernandez, G., A. Moraga, M. I. Cuartero, *et al.* (2018). "TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models." *Mol Ther* **26**(8): 2047-2059.
- Ferreira, C. S., K. Papamichael, G. Guilbault, *et al.* (2008). "DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours." *Anal Bioanal Chem* **390**(4): 1039-1050.
- Flynn, A. and C. G. Proud (1995). "Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **270**(37): 21684-21688.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, *et al.* (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." *Nat Protoc* **1**(5): 2315-2319.
- Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." *EMBO J* **16**(8): 1921-1933.
- Garcia-Recio, E. M., C. Pinto-Diez, M. I. Perez-Morgado, *et al.* (2016). "Characterization of MNK1b DNA Aptamers That Inhibit Proliferation in MDA-MB231 Breast Cancer Cells." *Mol Ther Nucleic Acids* **5**: e275.
- Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, A. S. Coates, *et al.* (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." *Ann Oncol* **22**(8): 1736-1747.
- Goodwin, C. M., O. W. Rossanese, E. T. Olejniczak, *et al.* (2015). "Myeloid cell leukemia-1 is an important apoptotic survival factor in triple-negative breast cancer." *Cell Death Differ* **22**(12): 2098-2106.
- Goto, S., Z. Yao and C. G. Proud (2009). "The C-terminal domain of Mnk1a plays a dual role in tightly regulating its activity." *Biochem J* **423**(2): 279-290.
- Graff, J. R., E. R. Boghaert, A. De Benedetti, *et al.* (1995). "Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts." *Int J Cancer* **60**(2): 255-263.

Grate, D. and C. Wilson (2001). "Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex." *Bioorg Med Chem* **9**(10): 2565-2570.

Grzmil, M., P. Morin, Jr., M. M. Lino, *et al.* (2011). "MAP kinase-interacting kinase 1 regulates SMAD2-dependent TGF-beta signaling pathway in human glioblastoma." *Cancer Res* **71**(6): 2392-2402.

Hefner, Y., A. G. Borsch-Haubold, M. Murakami, *et al.* (2000). "Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases." *J Biol Chem* **275**(48): 37542-37551.

Hermann, T. and D. J. Patel (2000). "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers." *Science* **287**(5454): 820-825.

Herschkowitz, J. I., K. Simin, V. J. Weigman, *et al.* (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." *Genome Biol* **8**(5): R76.

Hofmann, H. P., S. Limmer, V. Hornung, *et al.* (1997). "Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair." *RNA* **3**(11): 1289-1300.

Holliday, D. L. and V. Speirs (2011). "Choosing the right cell line for breast cancer research." *Breast Cancer Res* **13**(4): 215.

Hou, J., F. Lam, C. Proud, *et al.* (2012). "Targeting Mnk1 for cancer therapy." *Oncotarget* **3**(2): 118-131.

Hou, S., P. Du, P. Wang, *et al.* (2017). "Significance of MNK1 in prognostic prediction and chemotherapy development of epithelial ovarian cancer." *Clin Transl Oncol* **19**(9): 1107-1116.

Hu, J., J. Wu, C. Li, *et al.* (2011). "A G-quadruplex aptamer inhibits the phosphatase activity of oncogenic protein Shp2 in vitro." *Chembiochem* **12**(3): 424-430.

Huang, Y. F., H. T. Chang and W. Tan (2008). "Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods." *Anal Chem* **80**(3): 567-572.

Ismail, S. I. and W. Alshaer (2018). "Therapeutic aptamers in discovery, preclinical and clinical stages." *Adv Drug Deliv Rev*.

Ismail, S. I. and W. Alshaer (2018). "Therapeutic aptamers in discovery, preclinical and clinical stages." *Adv Drug Deliv Rev* **134**: 51-64.

Jauch, R., M. K. Cho, S. Jakel, *et al.* (2006). "Mitogen-activated protein kinases interacting kinases are autoinhibited by a reprogrammed activation segment." *EMBO J* **25**(17): 4020-4032.

Jauch, R., S. Jakel, C. Netter, *et al.* (2005). "Crystal structures of the Mnk2 kinase domain reveal an inhibitory conformation and a zinc binding site." *Structure* **13**(10): 1559-1568.

- Jayasena, S. D. (1999). "Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics." *Clin Chem* **45**(9): 1628-1650.
- Jin, X., J. Merrett, S. Tong, *et al.* (2018). "Design, synthesis and activity of Mnk1 and Mnk2 selective inhibitors containing thieno[2,3-d]pyrimidine scaffold." *Eur J Med Chem* **162**: 735-751.
- Jing, N., Y. Li, X. Xu, *et al.* (2003). "Targeting Stat3 with G-quartet oligodeoxynucleotides in human cancer cells." *DNA Cell Biol* **22**(11): 685-696.
- Joshi, B., A. L. Cai, B. D. Keiper, *et al.* (1995). "Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209." *J Biol Chem* **270**(24): 14597-14603.
- Joshi, S. and L. C. Plataniias (2014). "Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes." *World J Biol Chem* **5**(3): 321-333.
- Kalra, P., A. Dhiman, W. C. Cho, *et al.* (2018). "Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity." *Front Mol Biosci* **5**: 41.
- Kanlikilicer, P., B. Ozpolat, B. Aslan, *et al.* (2017). "Therapeutic Targeting of AXL Receptor Tyrosine Kinase Inhibits Tumor Growth and Intraperitoneal Metastasis in Ovarian Cancer Models." *Mol Ther Nucleic Acids* **9**: 251-262.
- Karaki, S., C. Andrieu, H. Ziouziou, *et al.* (2015). "The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) as a Therapeutic Target for Cancer." *Adv Protein Chem Struct Biol* **101**: 1-26.
- Kaur, H., J. G. Bruno, A. Kumar, *et al.* (2018). "Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines." *Theranostics* **8**(15): 4016-4032.
- Kjellerup, R. B., K. Kragballe, L. Iversen, *et al.* (2008). "Pro-inflammatory cytokine release in keratinocytes is mediated through the MAPK signal-integrating kinases." *Exp Dermatol* **17**(6): 498-504.
- Knauf, U., C. Tschopp and H. Gram (2001). "Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2." *Mol Cell Biol* **21**(16): 5500-5511.
- Konicek, B. W., J. R. Stephens, A. M. McNulty, *et al.* (2011). "Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases." *Cancer Res* **71**(5): 1849-1857.
- Koshkin, A. A., S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen and J. Wengel (1998). "LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition." *Tetrahedron* **54**(14): 3607-3630.
- Kumar, K., C. R. Chow, K. Ebine, *et al.* (2016). "Differential Regulation of ZEB1 and EMT by MAPK-Interacting Protein Kinases (MNK) and eIF4E in Pancreatic Cancer." *Mol Cancer Res* **14**(2): 216-227.

Kumar, R., N. Khandelwal, R. Thachamvally, *et al.* (2018). "Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication." *Virus Res* **253**: 48-61.

Kwegyir-Afful, A. K., F. N. Murigi, P. Purushottamachar, *et al.* (2017). "Galeterone and its analogs inhibit Mnk-eIF4E axis, synergize with gemcitabine, impede pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation and inhibit tumor growth in mice." *Oncotarget* **8**(32): 52381-52402.

Kwok, C. K. and C. J. Merrick (2017). "G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application." *Trends Biotechnol* **35**(10): 997-1013.

Lao, Y. H., K. K. Phua and K. W. Leong (2015). "Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation." *ACS Nano* **9**(3): 2235-2254.

Lazaris-Karatzas, A., K. S. Montine and N. Sonenberg (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." *Nature* **345**(6275): 544-547.

Li, P., S. Diab, M. Yu, *et al.* (2016). "Inhibition of Mnk enhances apoptotic activity of cytarabine in acute myeloid leukemia cells." *Oncotarget* **7**(35): 56811-56825.

Li, S., W. Wang, H. Ding, *et al.* (2012). "Aptamer BC15 against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 has potential value in diagnosis and therapy of hepatocarcinoma." *Nucleic Acid Ther* **22**(6): 391-398.

Li, Z., Y. Sun, M. Qu, *et al.* (2017). "Inhibiting the MNK-eIF4E-beta-catenin axis increases the responsiveness of aggressive breast cancer cells to chemotherapy." *Oncotarget* **8**(2): 2906-2915.

Lietard, J., H. Abou Assi, I. Gomez-Pinto, *et al.* (2017). "Mapping the affinity landscape of Thrombin-binding aptamers on 2F-ANA/DNA chimeric G-Quadruplex microarrays." *Nucleic Acids Res* **45**(4): 1619-1632.

Lim, S., T. Y. Saw, M. Zhang, *et al.* (2013). "Targeting of the MNK-eIF4E axis in blast crisis chronic myeloid leukemia inhibits leukemia stem cell function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(25): E2298-2307.

Lineham, E., J. Spencer and S. J. Morley (2017). "Dual abrogation of MNK and mTOR: a novel therapeutic approach for the treatment of aggressive cancers." *Future Med Chem* **9**(13): 1539-1555.

Lineham, E., G. J. Tizzard, S. J. Coles, *et al.* (2018). "Synergistic effects of inhibiting the MNK-eIF4E and PI3K/AKT/ mTOR pathways on cell migration in MDA-MB-231 cells." *Oncotarget* **9**(18): 14148-14159.

Liss, M., B. Petersen, H. Wolf, *et al.* (2002). "An aptamer-based quartz crystal protein biosensor." *Anal Chem* **74**(17): 4488-4495.

- Liu, Y., L. Sun, X. Su, *et al.* (2016). "Inhibition of eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation by cercosporamide selectively suppresses angiogenesis, growth and survival of human hepatocellular carcinoma." *Biomed Pharmacother* **84**: 237-243.
- Makkinje, A., H. Xiong, M. Li, *et al.* (1995). "Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insulin-stimulated protamine kinase." *J Biol Chem* **270**(24): 14824-14828.
- Mallikaratchy, P., Z. Tang, S. Kwame, *et al.* (2007). "Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells." *Mol Cell Proteomics* **6**(12): 2230-2238.
- Mao, Y., E. T. Keller, D. H. Garfield, *et al.* (2013). "Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer." *Cancer Metastasis Rev* **32**(1-2): 303-315.
- Masud, M. M., M. Kuwahara, H. Ozaki, *et al.* (2004). "Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX." *Bioorg Med Chem* **12**(5): 1111-1120.
- Matossian, M. D., H. E. Burks, S. Elliott, *et al.* (2018). "Panobinostat suppresses the mesenchymal phenotype in a novel claudin-low triple negative patient-derived breast cancer model." *Oncoscience* **5**(3-4): 99-108.
- Mayer, G. (2009). "The chemical biology of aptamers." *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(15): 2672-2689.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, C. R. Kempf, *et al.* (2011). "Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways." *J Cell Physiol* **226**(11): 2762-2781.
- Meric-Bernstam, F. and A. M. Gonzalez-Angulo (2009). "Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy." *J Clin Oncol* **27**(13): 2278-2287.
- Michaud, M., E. Jourdan, A. Villet, *et al.* (2003). "A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC." *J Am Chem Soc* **125**(28): 8672-8679.
- Muller, J., O. El-Maarri, J. Oldenburg, *et al.* (2008). "Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography." *Anal Bioanal Chem* **390**(4): 1033-1037.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, *et al.* (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." *Biotechnology* **24**: 17-27.
- Murphy, M. B., S. T. Fuller, P. M. Richardson, *et al.* (2003). "An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification." *Nucleic Acids Res* **31**(18): e110.
- Nimjee, S. M., R. R. White, R. C. Becker, *et al.* (2017). "Aptamers as Therapeutics." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **57**: 61-79.

Nonaka, Y., W. Yoshida, K. Abe, *et al.* (2013). "Affinity improvement of a VEGF aptamer by in silico maturation for a sensitive VEGF-detection system." *Anal Chem* **85**(2): 1132-1137.

O'Loughlen, A., V. M. Gonzalez, T. Jurado, *et al.* (2007). "Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b." *Biochim Biophys Acta* **1773**(9): 1416-1427.

O'Loughlen, A., V. M. Gonzalez, D. Pineiro, *et al.* (2004). "Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1." *Exp Cell Res* **299**(2): 343-355.

Onitilo, A. A., J. M. Engel and R. V. Stankowski (2014). "Cardiovascular toxicity associated with adjuvant trastuzumab therapy: prevalence, patient characteristics, and risk factors." *Ther Adv Drug Saf* **5**(4): 154-166.

Pareja, F., F. C. Geyer, C. Marchio, *et al.* (2016). "Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants." *NPJ Breast Cancer* **2**: 16036.

Parra, J. L., M. Buxade and C. G. Proud (2005). "Features of the catalytic domains and C termini of the MAPK signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine their differing activities and regulatory properties." *J Biol Chem* **280**(45): 37623-37633.

Pashenkov, M. V., L. S. Balyasova, Y. A. Dagil, *et al.* (2017). "The Role of the p38-MNK-eIF4E Signaling Axis in TNF Production Downstream of the NOD1 Receptor." *J Immunol* **198**(4): 1638-1648.

Pereira, R. L., I. C. Nascimento, A. P. Santos, *et al.* (2018). "Aptamers: novelty tools for cancer biology." *Oncotarget* **9**(42): 26934-26953.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, *et al.* (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.

Phillips, A. and J. P. Blaydes (2008). "MNK1 and EIF4E are downstream effectors of MEKs in the regulation of the nuclear export of HDM2 mRNA." *Oncogene* **27**(11): 1645-1649.

Pinto-Diez, C., E. M. Garcia-Recio, M. I. Perez-Morgado, *et al.* (2018). "Increased expression of MNK1b, the spliced isoform of MNK1, predicts poor prognosis and is associated with triple-negative breast cancer." *Oncotarget* **9**(17): 13501-13516.

Platella, C., C. Riccardi, D. Montesarchio, *et al.* (2017). "G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics." *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**(5 Pt B): 1429-1447.

Poolsup, S. and C. Y. Kim (2017). "Therapeutic applications of synthetic nucleic acid aptamers." *Curr Opin Biotechnol* **48**: 180-186.

Proud, C. G. (2015). "Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1849**(7): 766-773.

Puck, T. T. and P. I. Marcus (1956). "Action of x-rays on mammalian cells." *J Exp Med* **103**(5): 653-666.

Pyronnet, S. (2000). "Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1." *Biochem Pharmacol* **60**(8): 1237-1243.

Pyronnet, S., H. Imataka, A. C. Gingras, *et al.* (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." *EMBO J* **18**(1): 270-279.

Rafehi, H., C. Orlowski, G. T. Georgiadis, *et al.* (2011). "Clonogenic assay: adherent cells." *J Vis Exp*(49).

Ramalingam, S., L. Gediya, A. K. Kwegyir-Afful, *et al.* (2014). "First MNKs degrading agents block phosphorylation of eIF4E, induce apoptosis, inhibit cell growth, migration and invasion in triple negative and Her2-overexpressing breast cancer cell lines." *Oncotarget* **5**(2): 530-543.

Raught, B., A. C. Gingras, S. P. Gygi, *et al.* (2000). "Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI." *EMBO J* **19**(3): 434-444.

Reich, S. H., P. A. Sprengeler, G. G. Chiang, *et al.* (2018). "Structure-based Design of Pyridone-Aminal eFT508 Targeting Dysregulated Translation by Selective Mitogen-activated Protein Kinase Interacting Kinases 1 and 2 (MNK1/2) Inhibition." *J Med Chem* **61**(8): 3516-3540.

Robertson, D. L. and G. F. Joyce (1990). "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA." *Nature* **344**(6265): 467-468.

Rousseau, D., R. Kaspar, I. Rosenwald, *et al.* (1996). "Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1065-1070.

Rowlett, R. M., C. A. Chrestensen, M. Nyce, *et al.* (2008). "MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(2): G452-459.

Ruiz Ciancio, D., M. R. Vargas, W. H. Thiel, *et al.* (2018). "Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer." *Pharmaceuticals (Basel)* **11**(3).

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, *et al.* (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-1354.

Sansook, S., E. Lineham, S. Hassell-Hart, *et al.* (2018). "Probing the Anticancer Action of Novel Ferrocene Analogues of MNK Inhibitors." *Molecules* **23**(9).

Santag, S., F. Siegel, A. M. Wengner, *et al.* (2017). "BAY 1143269, a novel MNK1 inhibitor, targets oncogenic protein expression and shows potent anti-tumor activity." *Cancer Lett* **390**: 21-29.

Sazani, P. L., R. Larralde and J. W. Szostak (2004). "A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP." *J Am Chem Soc* **126**(27): 8370-8371.

Scheper, G. C., J. L. Parra, M. Wilson, *et al.* (2003). "The N and C termini of the splice variants of the human mitogen-activated protein kinase-interacting kinase Mnk2 determine activity and localization." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5692-5705.

Scheper, G. C., B. van Kollenburg, J. Hu, *et al.* (2002). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA." *J Biol Chem* **277**(5): 3303-3309.

Shahbazian, D., P. P. Roux, V. Mieulet, *et al.* (2006). "The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity." *EMBO J* **25**(12): 2781-2791.

Shangguan, D., Y. Li, Z. Tang, *et al.* (2006). "Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 11838-11843.

Shao, F., H. Sun and C. X. Deng (2017). "Potential therapeutic targets of triple-negative breast cancer based on its intrinsic subtype." *Oncotarget* **8**(42): 73329-73344.

Shi, Y., P. Frost, B. Hoang, *et al.* (2013). "MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells." *Oncogene* **32**(2): 190-197.

Shveygert, M., C. Kaiser, S. S. Bradrick, *et al.* (2010). "Regulation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation by mitogen-activated protein kinase occurs through modulation of Mnk1-eIF4G interaction." *Mol Cell Biol* **30**(21): 5160-5167.

Siddiqui, N. and N. Sonenberg (2015). "Signalling to eIF4E in cancer." *Biochem Soc Trans* **43**(5): 763-772.

Silva, R. L. and H. G. Wendel (2008). "MNK, EIF4E and targeting translation for therapy." *Cell Cycle* **7**(5): 553-555.

Slentz-Kesler, K., J. T. Moore, M. Lombard, *et al.* (2000). "Identification of the human Mnk2 gene (MKNK2) through protein interaction with estrogen receptor beta." *Genomics* **69**(1): 63-71.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, *et al.* (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-10874.

Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz (2005). "FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection." *Anal Bioanal Chem* **383**(1): 83-91.

Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz (2007). "SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands." *Biomol Eng* **24**(4): 381-403.

Svobodova, M., A. Pinto, P. Nadal, *et al.* (2012). "Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes." *Anal Bioanal Chem* **404**(3): 835-842.

- Teo, T., F. Lam, M. Yu, *et al.* (2015a). "Pharmacologic Inhibition of MNKs in Acute Myeloid Leukemia." *Mol Pharmacol* **88**(2): 380-389.
- Teo, T., Y. Yang, M. Yu, *et al.* (2015b). "An integrated approach for discovery of highly potent and selective Mnk inhibitors: Screening, synthesis and SAR analysis." *Eur J Med Chem* **103**: 539-550.
- Teo, T., M. Yu, Y. Yang, *et al.* (2015c). "Pharmacologic co-inhibition of Mnk and mTORC1 synergistically suppresses proliferation and perturbs cell cycle progression in blast crisis-chronic myeloid leukemia cells." *Cancer Lett* **357**(2): 612-623.
- Thumma, S. C. and R. A. Kratzke (2007). "Translational control: a target for cancer therapy." *Cancer Lett* **258**(1): 1-8.
- Tian, S., X. Wang and C. G. Proud (2017). "Oncogenic MNK signalling regulates the metastasis suppressor NDRG1." *Oncotarget* **8**(28): 46121-46135.
- Tombelli, S., M. Minunni and M. Mascini (2005). "Analytical applications of aptamers." *Biosens Bioelectron* **20**(12): 2424-2434.
- Topisirovic, I., M. Ruiz-Gutierrez and K. L. Borden (2004). "Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities." *Cancer Res* **64**(23): 8639-8642.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, V. L. Lapointe, *et al.* (2009). "Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP." *EMBO J* **28**(8): 1087-1098.
- Toss, A., M. Venturelli, C. Peterle, *et al.* (2017). "Molecular Biomarkers for Prediction of Targeted Therapy Response in Metastatic Breast Cancer: Trick or Treat?" *Int J Mol Sci* **18**(1).
- Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* **249**(4968): 505-510.
- Ueda, T., M. Sasaki, A. J. Elia, *et al.* (2010). "Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(32): 13984-13990.
- Ueda, T., R. Watanabe-Fukunaga, H. Fukuyama, *et al.* (2004). "Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6539-6549.
- Wang, D., P. Wu, H. Wang, *et al.* (2016). "SIN1 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells by Akt activation." *Biosci Rep* **36**(6).
- Wang, F., C. Han, C. He, *et al.* (2008). "Self-sorting organization of two heteroditopic monomers to supramolecular alternating copolymers." *J Am Chem Soc* **130**(34): 11254-11255.

Wang, X., Y. Wang, Q. Zhang, *et al.* (2018). "MAP Kinase-Interacting Kinase 1 Promotes Proliferation and Invasion of Hepatocellular Carcinoma and Is an Unfavorable Prognostic Biomarker." *Med Sci Monit* **24**: 1759-1767.

Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud, *et al.* (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." *EMBO J* **16**(8): 1909-1920.

Weisberg, E. L., M. Sattler, A. K. Azab, *et al.* (2017). "Inhibition of SDF-1-induced migration of oncogene-driven myeloid leukemia by the L-RNA aptamer (Spiegelmer), NOX-A12, and potentiation of tyrosine kinase inhibition." *Oncotarget* **8**(66): 109973-109984.

Wendel, H. G., R. L. Silva, A. Malina, *et al.* (2007). "Dissecting eIF4E action in tumorigenesis." *Genes Dev* **21**(24): 3232-3237.

Wheater, M. J., P. W. Johnson and J. P. Blaydes (2010). "The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival." *Cancer Biol Ther* **10**(7): 728-735.

Xiao, Y., P. Nimmer, G. S. Sheppard, *et al.* (2015). "MCL-1 Is a Key Determinant of Breast Cancer Cell Survival: Validation of MCL-1 Dependency Utilizing a Highly Selective Small Molecule Inhibitor." *Mol Cancer Ther* **14**(8): 1837-1847.

Yang, L., A. A. Perez, S. Fujie, *et al.* (2014). "Wnt modulates MCL1 to control cell survival in triple negative breast cancer." *BMC Cancer* **14**: 124.

Zhan, Y., J. Guo, W. Yang, *et al.* (2017). "MNK1/2 inhibition limits oncogenicity and metastasis of KIT-mutant melanoma." *J Clin Invest* **127**(11): 4179-4192.

Zhang, X., L. Peng, Z. Liang, *et al.* (2018). "Effects of Aptamer to U87-EGFRvIII Cells on the Proliferation, Radiosensitivity, and Radiotherapy of Glioblastoma Cells." *Mol Ther Nucleic Acids* **10**: 438-449.