



**Programa de Doctorado en  
Señalización Celular**

# **UN APTÁMERO FRENTE A MNK1 COMO AGENTE ANTITUMORAL EN CÁNCER DE PULMÓN**

**Tesis Doctoral presentada por  
Rebeca Carrión Marchante**

Directores:

Dra. María Elena Martín Palma

Dr. Víctor Manuel González Muñoz

Alcalá de Henares, 2022

---



Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Grupo de Aptámeros del Área 4 del IRYCIS-Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Su desarrollo ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos: “Estudio del mecanismo de acción de un aptámero frente a la proteína quinasa MNK1 como fármaco antitumoral en cáncer de mama” (PID2019-105417RB-I00) y “AptaBreast: Desarrollo Preclínico de un Aptámero para el Tratamiento del Cáncer” (RTC2019-007227-1), a dos contratos predoctorales de la Comunidad de Madrid (PEJD-2016/BMD-2145 y PEJD-2018-PRE/BMD-9201) y a un contrato asociado al proyecto RTC2019-007227-1.

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

- Pinto-Díez C, Ferreras-Martín R, Carrión-Marchante R, González VM, Martín ME. “Deeping in the Role of the MAP-Kinases Interacting Kinases (MNKs) in Cancer”. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 23;21(8):2967. doi: 10.3390/ijms21082967. PMID: 32340135; PMCID: PMC7215568.

- Pinto-Díez C, Ferreras-Martín R, Carrión-Marchante R, Klett-Mingo JI, García-Hernández M, Pérez-Morgado MI, Sacristán S, Barragán M, Seijo-Vila M, Tundidor I, Blasco-Benito S, Pérez-Gómez E, Gómez-Pinto I, Sánchez C, González C, González VM, Martín ME. “An optimized MNK1b aptamer, apMNKQ2, and its potential use as a therapeutic agent in breast cancer”. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Nov 15;30:553-568. doi: 10.1016/j.omtn.2022.11.009. PMID: 36457699; PMCID: PMC9705393.

Y un artículo recientemente enviado a la revista *Pharmaceutics* que se encuentra en revisión: Rebeca Carrión-Marchante, Celia Pinto-Díez, José Ignacio Klett-Mingo, Esther Palacios, Miriam Barragán-Usero, María Isabel Pérez-Morgado, Manuel Pascual-Mellado, Laura Ruiz-Cañas, Bruno Sainz, Víctor M. González, M. Elena Martín. “An aptamer against MNK1 for non-small cell lung cancer treatment” (*Pharmaceutics*, submitted).

Además, durante el desarrollo de esta tesis se ha publicado un artículo relacionado, Carrión-Marchante R, Frezza V, Salgado-Figueroa A, Pérez-Morgado MI, Martín ME, González VM. “DNA Aptamers against Vaccinia-Related Kinase (VRK) 1 Block Proliferation in MCF7 Breast Cancer Cells”. *Pharmaceutics (Basel)*. 2021 May 17;14(5):473. doi: 10.3390/ph14050473. PMID: 34067799; PMCID: PMC8156982 y un segundo artículo que está en segunda revisión: José Ignacio Klett-Mingo, Celia Pinto-Díez, Julio Cambroner-Plaza, Rebeca Carrión-Marchante, Miriam Barragán-Usero, María Isabel Pérez-Morgado, Eulalia Rodríguez, M<sup>a</sup> Val Toledo-Lobo, Víctor M González, M. Elena Martín. “Potential Therapeutic use of aptamers against HAT1 in lung cancer” (*Cancers*, 2<sup>a</sup> revision).



*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar este pequeño espacio para dar las gracias a todas aquellas personas que han estado presentes en este viaje:

En primer lugar, agradecer a mis directores, la Dra. María Elena Martín y el Dr. Víctor Manuel González, la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. Han pasado unos cuantos años desde que me abristeis las puertas para dar esos primeros pasos como “científica” antes de terminar la carrera, ¡y mirad ahora dónde estoy! Gracias por los conocimientos adquiridos durante estos años, vuestra paciencia, apoyo y dedicación, pero sobre todo, gracias por la confianza que habéis mostrado siempre en mí.

Gracias al laboratorio del Dr. Bruno Sainz por el trabajo realizado con los ensayos en animales y por la ayuda que me habéis prestado en los últimos meses.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio: Maribel, Marta, Miriam, Gero, Ana G, Ana S, Nacho, Celia, Esther, Valerio, Raquel, Manuel, Alberto, Silvia y al grupo del Dr. Alberto Alcázar, Merche, Emma, Lorena y Alejandro. Gracias por vuestros consejos, por echarme una mano siempre que lo he necesitado y por vuestra paciencia para enseñarme todo lo que sé. Me habéis regalado tantos momentos divertidos, que me quedaría corta si me pusiera a escribirlos aquí.

Quiero hacer mención especial a unas personas muy importantes para mí: Miri, Nacho, Celia, Esther y Ana. Empezaron siendo mis compañeros de laboratorio, y se han convertido en amigos, más bien, en grandísimos amigos. No soy capaz de describir en estas líneas la suerte que tengo de teneros en mi vida. Nuestro grupo empezó cuando decidimos hacer un escape room juntos, y ahora os habéis convertido en mi vía de escape. Sois un maravilloso cocktail de paz, amor, diversión y sabiduría. Con vosotros he llorado, reído y, lo más importante, comido hasta explotar. No se cómo agradeceros todo lo que habéis hecho por mí y la disposición que tenéis siempre para salir al rescate cuando más perdida me siento. Ya estoy llorando. Sois increíbles chicos, doy gracias al Ramón y Cajal por el regalo tan bonito que me hizo hace 7 años. Cualquiera que os tenga cerca, puede sentirse afortunado/a. Os quiero taco.

Por supuesto, gracias a mis amigos, por el simple hecho de estar ahí. A las de siempre: Noe, Carol, Cris, Irene, superando juntas desde el cole cada nueva etapa. A María, Guille, Ira y Silvia, un grupo en el que hay poco amor, pero nos queremos mucho. Gracias chicos por vuestro apoyo. Gracias a Ainhoa y a la bonita casualidad que hizo que llegáramos tarde

el primer día de universidad y nos conociéramos. Desde entonces hemos sido inseparables, superando juntas lo bueno, y lo menos bueno. Eres esa clase de persona que quieres nada más conocerla, darte las gracias por TODO se queda corto. Quiero dar las gracias también a mucha gente de Alcalá, que aunque no nombre, saben muy bien quiénes son, en especial a mis chicas, Lau y Rachel, por la amistad tan bonita que hemos formado, a Silvia y a Alba, por estar a mi lado cuando lo necesito, y a Bea, los aptámeros nos unieron desde el máster y desde entonces no has dudado en echarme un cable siempre que lo he necesitado.

Por último, gracias a mi familia, y a mi bebé peludo de cuatro patas (no tan bebé) que roncaba a mi lado día tras día mientras escribía esta tesis. En especial, gracias a mis padres, por apoyarme y estar a mi lado en todas mis decisiones. No sería quien soy, ni estaría aquí, si no fuera por vosotros. Os quiero.

---

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
1. <b>BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>17</b>
1.1. Clasificación del cáncer de pulmón .....	17
a) Tumores neuroendocrinos .....	18
I. Carcinoma de célula pequeña o microcítico (SCLC).....	19
II. Carcinoma neuroendocrino de célula grande (LCNEC) .....	19
III. Tumores carcinoides típicos y atípicos.....	19
b) Cáncer de célula no pequeña o no microcítico (NSCLC).....	20
I. Adenocarcinoma.....	20
II. Carcinoma de célula escamosa.....	20
III. Carcinoma de célula grande .....	21
1.2. Tratamiento del cáncer de pulmón .....	21
a) Cirugía .....	21
b) Quimioterapia.....	22
c) Radioterapia.....	22
d) Inmunoterapia .....	22
e) Terapia molecular dirigida .....	22
1.3. Factores de riesgo del cáncer de pulmón.....	23
2. <b>PROTEÍNAS QUINASAS QUE INTERACCIONAN CON MAPK: MNKs .....</b>	<b>25</b>
2.1. Familia de MNKs .....	25
2.2. Sustratos de las MNKs.....	28
a) Factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) .....	28
b) Factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G) .....	29
c) Ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 (hnRNP A1).....	30
d) Factor de splicing asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF) .....	30
e) Fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2) .....	31

f) Sprouty 2 (Spry2) .....	31
2.3. MNKs, eIF4E y cáncer .....	31
2.4. MNKs en otras patologías .....	36
2.5. Inhibidores de MNK.....	37
3. APTÁMEROS COMO HERRAMIENTAS TERAPEUTICAS.....	39
3.1. Estructura de los aptámeros.....	42
3.2. Ventajas y limitaciones de los aptámeros.....	42
3.3. Aptámeros en biomedicina .....	43
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
MATERIALES .....	53
MÉTODOS.....	57
1. CULTIVOS CELULARES .....	57
2. TRANSFECCIÓN Y PROCESAMIENTO CELULAR .....	58
2.1. Transfección de células .....	58
2.2. Procesamiento celular .....	59
2.2.1. Obtención de lisados celulares .....	59
2.2.2. Obtención de RNA.....	59
3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	59
3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	59
3.2. Transferencia de proteínas e inmunodetección .....	60
4. ENSAYOS.....	61
4.1. Ensayos de viabilidad celular. Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT).....	61
4.2. Determinación de la citotoxicidad celular por LDH .....	61
4.3. Ensayos de formación de colonias.....	62
4.4. Ensayos de migración celular por hendidura o herida ( <i>Wound healing assay</i> )	62
4.5. Ensayos de migración e invasión por transwells .....	63
4.6. Ensayos de adhesión celular .....	64

4.7. Zimograma .....	64
4.8. Cuantificación intracelular de apMNKQ2 .....	65
4.9. Análisis de los niveles de RNA mensajero .....	66
5. MODELOS ANIMALES .....	67
5.1. Ensayos de eficacia en ratones con xenoinjertos de células tumorales de pulmón .....	67
5.2. Cuantificación de apMNKQ2 en tumores .....	68
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	68
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL APTÁMERO EN LA TUMORIGÉNESIS EN LÍNEAS CELULARES.....	71
1.1. Efecto de los aptámeros sobre la proliferación de líneas tumorales de pulmón..	71
1.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la proliferación y la necrosis en células tumorales de pulmón.....	72
1.3. Análisis de la vida media de apMNKQ2 en las líneas tumorales de pulmón .....	73
1.4. Efecto de apMNKQ2 sobre la apoptosis celular en células tumorales de pulmón.....	74
1.5. Actividad anticlonogénica de apMNKQ2 en células tumorales de pulmón.....	76
2. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LA ACTIVIDAD METASTÁSICA DE LAS CÉLULAS DE PULMÓN .....	77
2.1. Efecto de apMNKQ2 en la migración, invasión y adhesión de las células tumorales de pulmón .....	77
2.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la transición epitelio-mesénquima (TEM) .....	80
3. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LAS MNKs .....	82
3.1. Expresión de MNK1a, MNK1b y eIF4E en líneas tumorales de pulmón .....	82
3.2. Efecto de apMNKQ2 sobre las isoformas de MNK1 y la fosforilación de eIF4E..	84
4. ESTUDIO DE LA EFICACIA IN VIVO DE apMNKQ2 EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA PULMONAR.....	86
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>103</b>

Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Histogénesis de los principales tipos de cáncer de pulmón .....	18
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los principales tipos de cáncer de pulmón y principales métodos de diagnóstico y terapia .....	24
<b>Figura 3.</b> Esquema general de las MNKs humanas.....	26
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de MNK.....	35
<b>Figura 5.</b> Esquema del método SELEX. ....	40
<b>Figura 6.</b> Esquema del ensayo de migración/invasión en transwell.....	63
<b>Figura 7.</b> Esquema del método de cuantificación de apMNKQ2.....	65
<b>Figura 8.</b> Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT de las líneas A549 y SW900.....	71
<b>Figura 9.</b> Efecto del aptámero apMNKQ2 sobre la actividad MTT y LDH de las líneas celulares de pulmón.....	73
<b>Figura 10.</b> Estudio de la vida media de apMNKQ2 en líneas tumorales de pulmón.....	74
<b>Figura 11.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre la actividad de la caspasa 3 a través del sustrato PARP en líneas tumorales de pulmón.....	74
<b>Figura 12.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de XIAP y MCL-1 .....	75
<b>Figura 13.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad de formación de colonias de las células .....	76
<b>Figura 14.</b> Efecto del aptámero apMNKQ2 en la migración de las líneas celulares tumorales de pulmón mediante ensayos <i>Wound healing</i> .....	77
<b>Figura 15.</b> Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la migración de las líneas tumorales de pulmón mediante ensayos con transwell.....	78
<b>Figura 16.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 .....	79
<b>Figura 17.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre la adhesión celular en líneas tumorales de pulmón. ....	80
<b>Figura 18.</b> Expresión de marcadores y factores de transcripción de TEM en líneas tumorales de pulmón.....	81
<b>Figura 19.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de expresión de marcadores de TEM en las líneas tumorales de pulmón.....	81
<b>Figura 20.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de expresión de factores de transcripción de TEM en las líneas tumorales de pulmón .....	82
<b>Figura 21.</b> Niveles de las MNKs en líneas tumorales de pulmón .....	83

---

<b>Figura 22.</b> Fosforilación de eIF4E en las líneas celulares de cáncer de pulmón.....	84
<b>Figura 23.</b> Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de 4E y las isoformas de MNK1 en líneas tumorales de pulmón.....	85
<b>Figura 24.</b> Efecto del silenciamiento de MNK2 sobre la fosforilación de eIF4E en las células A549.....	86
<b>Figura 25.</b> Eficacia <i>in vivo</i> de apMNKQ2 en un modelo de ratón con xenoinjerto subcutáneo de células A549.....	87
<b>Figura 26.</b> Cantidad de apMNKQ2 detectada en los tumores de células A549.....	87
<b>Figura 27.</b> Efecto de apMNKQ2 en la expresión de proteínas antiapoptóticas de xenoinjertos tumorales de células A549.....	88
<b>Tabla I.</b> Inhibidores de MNK.....	38
<b>Tabla II.</b> Principales ventajas de los aptámeros respecto a los anticuerpos.....	43
<b>Tabla III.</b> Aptámeros terapéuticos en ensayos clínicos.....	45
<b>Tabla IV.</b> Relación de oligonucleótidos empleados en qPCR.....	54
<b>Tabla V.</b> Relación de anticuerpos primarios empleados.....	55
<b>Tabla VI.</b> Relación de anticuerpos secundarios utilizados.....	55
<b>Tabla VII.</b> Relación de aptámeros utilizados.....	56
<b>Tabla VIII.</b> Programa de PCR a tiempo real utilizado en la cuantificación intracelular de apMNKQ2.....	66
<b>Tabla IX.</b> Programa de PCR a tiempo real utilizado en el análisis de los niveles de mRNA.....	66



# **ABREVIATURAS**



**ABREVIATURAS**

<b>4E-BPs</b>	Proteínas de unión a eIF4E
<b>4E-SE</b>	Elementos sensibles al eIF4E
<b>4ET</b>	Proteína transportadora del eIF4E
<b>AC</b>	Tumor carcinoide atípico
<b>AKT o PKB</b>	Proteína quinasa B
<b>ALK</b>	Linfoma anaplásico quinasa
<b>AMD</b>	Degeneración macular asociada a la edad
<b>AML</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>ANGPTL-4</b>	Proteína similar a la angiopoyetina 4
<b>ARE</b>	Secuencia rica en AU
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
<b>BRAF</b>	V-RAF homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murino
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>Cap</b>	Ácido 7-metilguanílico en el extremo 5' del mRNA
<b>cDNA</b>	DNA copia
<b>CK</b>	Caseína quinasa
<b>CLL</b>	Leucemia linfocítica crónica
<b>CML</b>	Leucemia mieloide crónica
<b>COVID-19</b>	Infección viral por coronavirus
<b>cPLA2</b>	Fosfolipasa A2 citoplasmática
<b>CXCL-12</b>	Ligando 12 de la quimioquina CXC
<b>DEPTOR</b>	Proteína de interacción con mTOR con dominio DEP

<b>DMEM</b>	Medio de cultivo <i>Dulbecco modified Eagles minimal essential medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>eIF</b>	Factor de iniciación eucariota
<b>ELONA</b>	Ensayo enzimático en placa con aptámeros
<b>ERK</b>	Quinasa regulada a través de señalización extracelular
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HER2</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HER3</b>	Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HDM2</b>	Proteína <i>Human Double minute 2</i>
<b>HGNEC</b>	Carcinoma neuroendocrino de alto grado
<b>hnRNP</b>	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IRES</b>	Sitio interno de entrada al ribosoma
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>KRAS</b>	Virus del sarcoma de rata Kristen
<b>LCNEC</b>	Carcinoma neuroendocrino de célula grande
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos

---

<b>MCL-1</b>	Proteína de células de leucemia mieloide 1
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón
<b>MK</b>	Proteína quinasa activada por MAPK
<b>MKK</b>	MAPK quinasa
<b>MM</b>	Mieloma múltiple
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>MNK1/2</b>	Proteína quinasa de interacción con MAPK
<b>MNK1bSR</b>	Región específica de MNK1b
<b>MPNST</b>	Tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MSK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos y estrés
<b>mTOR</b>	Proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos
<b>mTORC1</b>	Complejo 1 de mTOR
<b>MTT</b>	Metiltiazol tetrazolio
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolio/x-fosfato
<b>NDRG1</b>	Proteína <i>N-Myc Downstream Regulated 1</i>
<b>NES</b>	Señal de exportación nuclear
<b>NF1</b>	Neurofibromina 1
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa potenciador de la cadena ligera de las células B activadas
<b>NFX1</b>	Proteína <i>nuclear RNA export factor 1</i>
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de célula no pequeña
<b>NTRK</b>	Receptor neurotrófico tirosina quinasa
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

<b>OPTI-MEM</b>	Medio de suero reducido
<b>PABP</b>	Proteína de unión a la cola de poli adeninas
<b>PARP</b>	Polimerasa de poli ADP-ribosa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCNSL</b>	Linfoma primario del sistema nervioso central
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD-1</b>	Molécula de muerte programada 1
<b>PDAC</b>	Adenocarcinoma pancreático ductal
<b>PDK1</b>	Quinasa dependiente de 3'fosfoinositol 1
<b>PD-L1</b>	Ligando 1 de muerte programada
<b>PDX</b>	Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 quinasa
<b>PIK3CA</b>	Subunidad catalítica p110 $\alpha$
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PSF</b>	Proteína de unión al tramo de polipirimidina
<b>PTEN</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>RAPTOR</b>	Proteína reguladora asociada a mTOR
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAsa</b>	Ribonucleasa
<b>RET</b>	Reorganizado durante la transfección
<b>ROS1</b>	Protooncogén tirosina proteína quinasa ROS
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

---

<b>RSK</b>	p90S6 quinasa
<b>S6K</b>	Proteína quinasa de la proteína ribosomal S6
<b>SARS-COV-2</b>	Síndrome respiratorio agudo severo causado por coronavirus tipo 2
<b>SCLC</b>	Cáncer de pulmón de célula pequeña
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>SELEX</b>	Enriquecimiento exponencial por evolución sistemática de ligandos
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>siRNA</b>	RNA de interferencia
<b>Spry</b>	Proteína Sprouty
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena sencilla
<b>STK11</b>	Serina treonina quinasa 11
<b>TBS</b>	Tampón salino tamponado TRIS
<b>TC</b>	Tumor carcinoide típico
<b>TELO2</b>	Proteína de mantenimiento de la telomerasa 2
<b>TEM</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>TEMED</b>	N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TGI</b>	Inhibición del crecimiento tumoral
<b>TKI</b>	Inhibidor tirosina-quinasa
<b>TLR</b>	Receptor tipo toll
<b>TME</b>	Transición mesénquimo-epitelial
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TP53</b>	Proteína tumoral 53

<b>TSC</b>	Complejo supresor de tumores
<b>U.A.</b>	Unidades arbitrarias
<b>ULK1</b>	Quinasa 1 activadora de la autofagia tipo Unc-51
<b>UTR</b>	Región no codificante del mRNA
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>XIAP</b>	Proteína inhibidora de apoptosis ligada a X
<b>ZEB-1</b>	Proteína Zinc Finger E-Box Binding Homeobox1

# **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

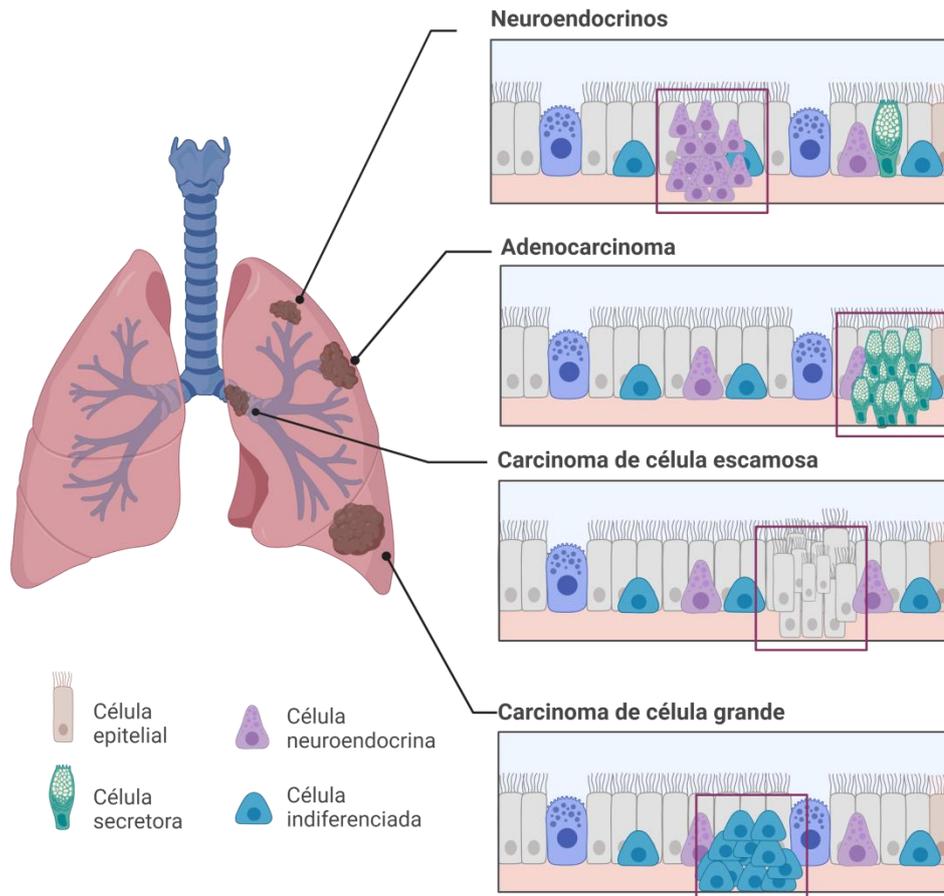
## 1. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial y el segundo más común entre todos los tipos de cáncer (Sung *et al.* 2021). En países en vías de desarrollo, se espera un incremento en la incidencia debido al aumento reciente en el consumo de tabaco, mientras que en países más desarrollados, la incidencia está disminuyendo ya que el consumo comenzó más pronto y ahora se está reduciendo. En mujeres, la mortalidad por cáncer de pulmón ha superado a la mortalidad por cáncer de mama en algunas regiones de Norteamérica, Norte de Europa, Australia y Nueva Zelanda (Bade *et al.* 2020). Esta tendencia al alza se debe en parte al aumento del consumo de tabaco en mujeres a partir de los años 70, mientras que en los varones el inicio del consumo fue anterior y se está reduciendo en los últimos años. Aun así, la mortalidad todavía sigue siendo mayor en hombres (Thai *et al.* 2021).

A pesar de los avances realizados en las diferentes estrategias terapéuticas, la supervivencia media a los 5 años para el cáncer de pulmón es solo de un 19%. El cáncer de pulmón generalmente se diagnostica cuando el tumor se encuentra en una etapa avanzada, o incluso cuando ya ha desarrollado metástasis, siendo el cerebro el sitio más común de éstas. Esto incrementa las posibilidades de fracaso terapéutico, y disminuye la supervivencia de los pacientes notablemente, ya que las opciones de tratamiento son principalmente paliativas. Por tanto, la búsqueda de biomarcadores tumorales específicos es crucial para un diagnóstico precoz de la enfermedad (Li *et al.* 2022).

### 1.1. Clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad heterogénea que implica una acumulación de eventos genéticos y epigenéticos en el epitelio respiratorio (**Figura 1**) (Langevin *et al.* 2015). En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una clasificación de tumores pulmonares que contenía numerosos cambios importantes con respecto a la edición anterior (Travis *et al.* 2015). La última clasificación de tumores pulmonares de la OMS de 2021, ha sido publicada recientemente (Nicholson *et al.* 2022), y recoge algunos avances con respecto a la de 2015. Los criterios de clasificación siguen siendo los de utilizar primero la morfología, apoyada por la inmunohistoquímica y, posteriormente, técnicas moleculares.



**Figura 1. Histogénesis de los principales tipos de cáncer de pulmón.** Los tumores de pulmón neuroendocrinos se originan a partir de células neuroendocrinas. El adenocarcinoma surge de las células secretoras, el carcinoma de células escamosas de las células epiteliales que recubren las vías respiratorias, y las células del carcinoma de célula grande carecen de diferenciación. Figura creada con Biorender.

En 2015, se hizo especial hincapié en el uso de la inmunohistoquímica para hacer una clasificación más precisa, mientras que en la clasificación de 2021 hay un mayor énfasis en la patología molecular. Aunque algunas anomalías moleculares no tengan aún impacto en la clasificación de los tumores, pueden afectar al manejo del paciente. Según las últimas actualizaciones de la OMS, los principales subtipos de tumores pulmonares de origen epitelial son los siguientes (**Figura 2**):

### a) Tumores neuroendocrinos

Los tumores neuroendocrinos se dividen en 4 subtipos: carcinoma de célula pequeña o microcítico (Small Cell Lung Cancer o SCLC), carcinoma neuroendocrino de célula grande (Large Cell Neuroendocrine Carcinoma o LCNEC) y tumores carcinoides típicos (Typical Carcinoid o TC) y atípicos (Atypical Carcinoid o AC). Los dos primeros, SCLC y LCNEC, se consideran carcinomas neuroendocrinos de alto grado (High Grade Neuroendocrine

Carcinoma o HGNEC), AC de grado intermedio y TC de grado bajo. La forma de diagnóstico más común es a través de inmunohistoquímicas de biopsias (Nicholson *et al.* 2022).

### **I. Carcinoma de célula pequeña o microcítico (SCLC)**

Es el más frecuente entre los tumores de pulmón neuroendocrinos. Es un carcinoma agresivo, poco diferenciado y de alto grado, que representa aproximadamente el 13% de todos los carcinomas de pulmón. La tasa de supervivencia a 5 años en etapas avanzadas de la enfermedad es de menos del 10% (Araz *et al.* 2021). Suele estar localizado en zonas periféricas del pulmón. Las células son redondas y pequeñas, con bordes difusos, un citoplasma escaso o nulo, y un alto índice mitótico. Además, estos tumores poseen extensas zonas de necrosis, y se caracterizan por la aparición de desechos nucleares basófilos en las paredes de los vasos sanguíneos. Se observa con mayor frecuencia en fumadores compulsivos en etapas avanzadas de la enfermedad, se presenta clínicamente con una diseminación metastásica temprana y una buena respuesta a la terapia inicial, que, en la mayoría de pacientes, es seguida por una recaída con resistencia al tratamiento quimioterapéutico (Raso *et al.* 2021).

### **II. Carcinoma neuroendocrino de célula grande (LCNEC)**

Es un tipo de cáncer muy agresivo y poco común, representa aproximadamente el 2% de todos los casos, y se asocia con antecedentes de tabaquismo. Se presenta como grandes masas con áreas necrosadas y metástasis tempranas. Es muy parecido al carcinoma microcítico, aunque está formado por células mucho más grandes y poligonales (Altmayer *et al.* 2020; Corbett *et al.* 2021).

### **III. Tumores carcinoides típicos y atípicos**

Como se ha descrito anteriormente, los tumores carcinoides se dividen en típicos y atípicos, diferenciándose en el índice de proliferación celular del tumor, siendo más bajo para los típicos (por debajo del 5%) y más alto en los atípicos (entre 9-18%) (Nicholson *et al.* 2022). En comparación con los tumores neuroendocrinos de grado alto (SCLC y LCNEC), los pacientes con tumores carcinoides son significativamente más jóvenes, tienen un mejor pronóstico, y no existe tanta relación con el tabaquismo. Además, los tumores carcinoides presentan índices mitóticos más bajos, menos zonas necrosadas, muy pocas anomalías genéticas, y están mejor diferenciados en comparación con SCLC y LCNEC (Travis *et al.* 2015). Los pacientes tienen una supervivencia a largo plazo favorable tras la extirpación quirúrgica del tumor (Altmayer *et al.* 2020).

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

El carcinoma de célula no pequeña es el tipo de cáncer de pulmón más común, ya que se produce en aproximadamente un 85% de todos los casos diagnosticados (Thai *et al.* 2021). Se divide en 3 subtipos diferenciados:

### **I. Adenocarcinoma**

Es el tipo más común de cáncer de pulmón, representa aproximadamente el 50% de todos los casos, y es el más común entre los no fumadores, aunque el tabaco es un factor de riesgo importante. El adenocarcinoma suele desarrollarse en la periferia del pulmón y surge de las células glandulares de la mucosa bronquial. Las células poseen un nucléolo prominente y un citoplasma mucinoso con vacuolas (Altmayer *et al.* 2020). Comparado con otros tipos, su crecimiento es más lento, por lo que puede ser detectado antes de que se extienda. No obstante, entre todos los subtipos de NSCLC, el adenocarcinoma tiene la incidencia más alta de metástasis cerebral (Karimpour *et al.* 2021). Los subtipos del adenocarcinoma se agrupan en tres categorías según su grado de invasión: pre-invasivo, mínimamente invasivo e invasivo (Travis *et al.* 2015). Se diagnostican mediante características histológicas y citológicas (biopsias y citologías) complementadas normalmente con inmunohistoquímicas de marcadores específicos que distingan entre los diferentes subtipos.

El adenocarcinoma es el subtipo que con mayor frecuencia presenta alteraciones o mutaciones genéticas con terapia molecular dirigida ya aprobada. Algunas de las mutaciones identificadas son en *KRAS* (virus del sarcoma de rata Kristen), *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico), *ALK* (linfoma anaplásico quinasa), *ROS-1* (protooncogén tirosina proteína quinasa ROS), *BRAF* (V-RAF homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murino), *HER2* (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), *RET* (reorganizado durante la transfección), *NTRK* (receptor neurotrófico tirosina quinasa), el protooncogén *MET* y *TP53* (proteína tumoral 53) (Herbst *et al.* 2018; Altmayer *et al.* 2020; Nicholson *et al.* 2022; Pendharkar *et al.* 2013; Tan 2020).

### **II. Carcinoma de célula escamosa**

Representa aproximadamente el 30% de casos de cáncer de pulmón, y está muy asociado al hábito tabáquico. Se presenta como masas localizadas en la zona central del pulmón, envolviendo lóbulos o bronquios. Surge de las células escamosas inmaduras que recubren el interior de las vías respiratorias. Las células muestran un núcleo con una cromatina oscura y un nucléolo poco evidente (Altmayer *et al.* 2020). El carcinoma de célula

escamosa se subclasifica en queratinizante, no queratinizante y basaloide (Travis *et al.* 2015). Las mutaciones o alteraciones de genes, para las cuales se emplean tratamientos de terapia dirigida, son menos frecuentes que en el adenocarcinoma (Herbst *et al.* 2018; Socinski *et al.* 2018). Su diagnóstico se basa en las mismas técnicas que los adenocarcinomas.

### **III. Carcinoma de célula grande**

Comprende un grupo heterogéneo de neoplasias malignas indiferenciadas que carecen de las características citológicas del carcinoma de células pequeñas, y de la diferenciación glandular o escamosa (Zamay *et al.* 2017). Supone hasta el 5% de todos los casos, aunque su incidencia ha comenzado a disminuir en los últimos años, probablemente debido a los nuevos criterios de clasificación de los tumores poco diferenciados y al uso en mayor medida de marcadores de inmunohistoquímica. Está fuertemente asociado al tabaco y son muy agresivos. Suele originarse en la parte central de los pulmones aunque puede aparecer en cualquier zona como una masa grande con márgenes lobulados o espiculados, zonas necrosadas y metástasis tempranas (Altmayer *et al.* 2020). Se diagnostica por exclusión de otras posibilidades.

#### **1.2. Tratamiento del cáncer de pulmón**

Las principales estrategias terapéuticas en cáncer de pulmón incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y terapia molecular dirigida. Los protocolos de tratamiento (con intención curativa o paliativa) se aplican en función de la extensión del tumor en el momento del diagnóstico, de su tipo histológico y/o molecular, de la existencia de otras patologías y de los antecedentes que rodean al paciente.

##### **a) Cirugía**

En el caso del cáncer de pulmón microcítico, la cirugía se limita a un pequeño grupo de pacientes con la enfermedad localizada en etapas muy iniciales (Raso *et al.* 2021). En el caso del cáncer no microcítico, se lleva a cabo la cirugía en etapas iniciales de la enfermedad, en estadios I y II e incluso IIIA, siempre y cuando el paciente se encuentre en condiciones de ser operado. Para determinar si el tumor se puede extirpar, se combina con el diagnóstico por imagen. En muchos casos la cirugía se complementa con terapia adyuvante como quimioterapia o radioterapia (Nasim *et al.* 2019).

### **b) Quimioterapia**

Se suelen usar derivados del platino (cisplatino o carboplatino) combinados con otros agentes citotóxicos, siendo la combinación platino-etopósido la más frecuente. Además de terapia adyuvante de la cirugía, se usa en pacientes con cáncer microcítico y en aquellos no microcíticos en etapas avanzadas (estadío IV) en los que se descarta la cirugía (Hirsch *et al.* 2017). El objetivo de tratar a estos pacientes es mejorar su supervivencia y reducir los efectos adversos de la enfermedad.

### **c) Radioterapia**

Se emplea en algunos cánceres microcíticos y en aquellos pacientes con NSCLC en etapas tempranas que no pueden ser sometidos a cirugía o como paliativo para mejorar la calidad de vida de aquellos pacientes que no responden a cirugía o quimioterapia (Nasim *et al.* 2019).

### **d) Inmunoterapia**

La inmunoterapia trata de aprovechar la respuesta inmunitaria del propio cuerpo humano como defensa natural para luchar contra el cáncer. Durante el proceso de tumorigénesis, la señalización de PD-1 (molécula de muerte programada 1), estimulada por su ligando PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), inactiva a las células T que reconocen antígenos específicos de tumores, permitiendo la progresión tumoral y metástasis (Iwai *et al.* 2002). El bloqueo de esta ruta mediante anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 ha sido significativamente beneficioso en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico. Se emplea en aquellos casos avanzados que no responden al tratamiento quimioterapéutico, o tienen unos niveles de expresión de PD-L1 de más del 50%. Es frecuentemente usada en casos de carcinoma de célula escamosa, donde los pacientes se benefician de esta terapia sola, o en combinación con quimioterapia (Herbst *et al.* 2018).

### **e) Terapia molecular dirigida**

El análisis de las alteraciones moleculares de los tumores permite llevar a cabo una medicina personalizada en la que la decisión de la terapia depende de las características de cada tumor en cada paciente. En sujetos que presentan algunas de las mutaciones descritas anteriormente, se emplean como tratamientos de primera línea inhibidores específicos como erlotinib y gefitinib, para mutaciones en EGFR, o crizotinib, para mutaciones en ALK (Hirsch *et al.* 2017; Herbst *et al.* 2018; Duma *et al.* 2019). El desarrollo de estos fármacos, también conocidos como inhibidores tirosina-quinasa (TKIs), ha supuesto un avance exitoso en el abordaje terapéutico de estos tumores, ya que en algunos casos suponen una mejora en la

tasa de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, en comparación con otros tratamientos como la quimioterapia. No obstante, muchos acaban desarrollando resistencia a estos tratamientos, y progresión de la enfermedad, en una media de 10-12 meses (Yuan *et al.* 2019). Esto hace que sea crucial el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas con el fin de mejorar el pronóstico del paciente.

### **1.3. Factores de riesgo del cáncer de pulmón**

El tabaquismo es el principal factor de riesgo en el desarrollo del cáncer de pulmón, especialmente para el carcinoma escamoso y el de células pequeñas. De hecho, el 80% de casos de cáncer de pulmón se deben al tabaco, y los fumadores pasivos tienen altas probabilidades de desarrollarlo. La frecuencia de cigarrillos fumados o la duración del hábito afectan de forma proporcional al riesgo de padecer la enfermedad, es más, la reducción de cigarrillos fumados al día reduce de forma significativa el riesgo de cáncer de pulmón (Langevin *et al.* 2015).

Los factores genéticos también están involucrados, ya que la existencia de antecedentes familiares de cáncer de pulmón aumenta el riesgo de padecer la enfermedad incluso en no fumadores (Molina *et al.* 2008).

Otras de las principales causas de padecer cáncer de pulmón son la contaminación del aire, especialmente en grandes ciudades, y la exposición a factores ambientales cancerígenos como el gas radón, que se produce por la descomposición natural del uranio en el suelo y las rocas. La exposición laboral al asbesto, y otros agentes cancerígenos como el arsénico o los hidrocarburos policíclicos aromáticos, pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer de pulmón, sobre todo en fumadores. El consumo de alcohol, el tipo de dieta, el ejercicio y la actividad física, también se han visto relacionados con la etiopatogenia de esta enfermedad (Molina *et al.* 2008; Torre *et al.* 2015).

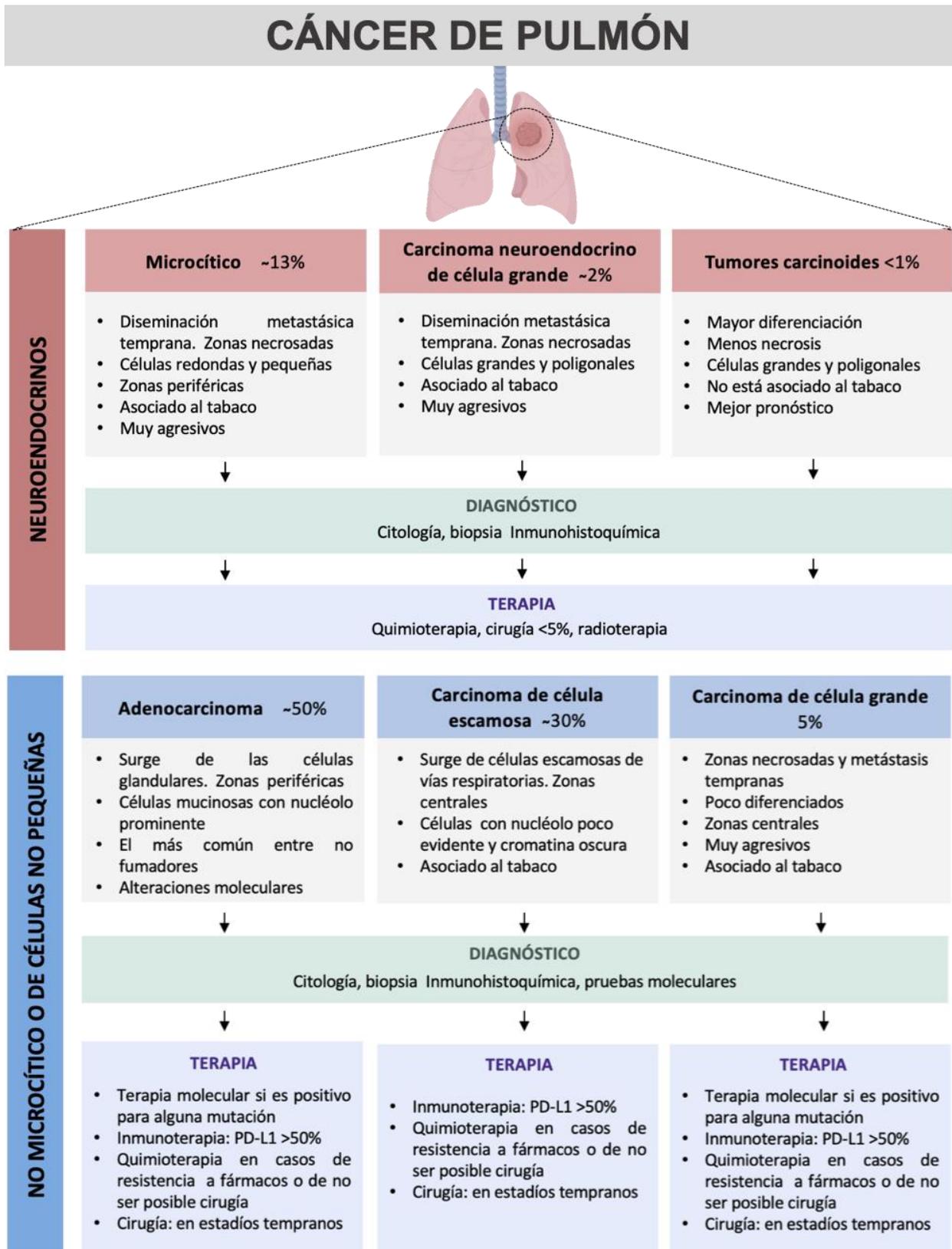


Figura 2. Clasificación de los principales tipos de cáncer de pulmón y principales métodos de diagnóstico y terapia.

## 2. PROTEÍNAS QUINASAS QUE INTERACCIONAN CON MAPK: MNKS

### 2.1. Familia de MNKS

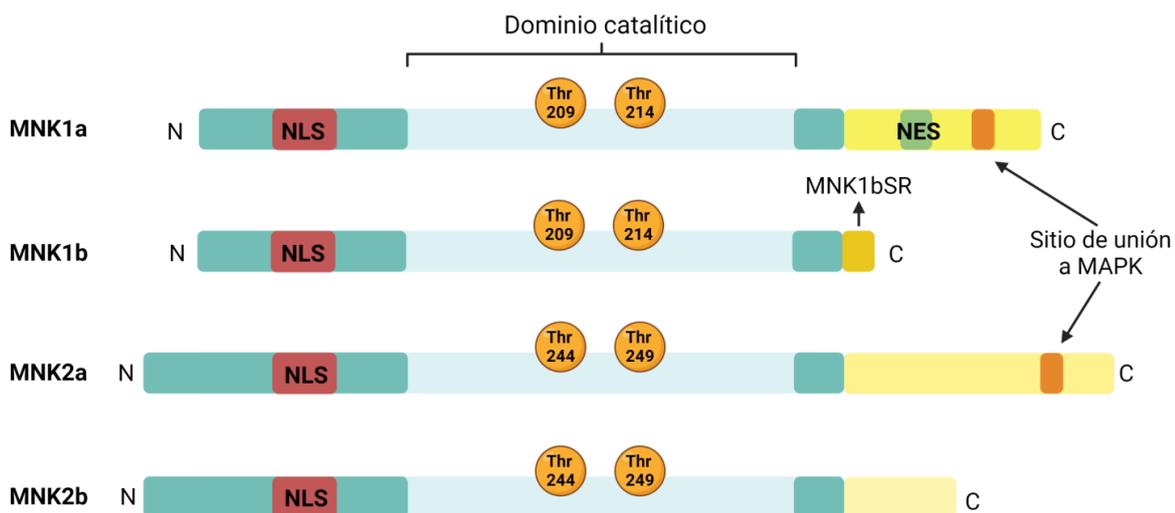
Las MNKS (MNK1 y MNK2), proteínas quinasas que interaccionan con MAP quinasas, fueron identificadas de forma simultánea en el año 1997 por dos grupos de investigación independientes cuyo objetivo era la búsqueda de proteínas de unión a ERK (quinasa regulada a través de señalización extracelular).

Por una parte, el grupo de Waskiewicz y colaboradores (Waskiewicz *et al.* 1997), a través de la realización de ensayos de doble híbrido en levaduras, identificó a MNK1 y MNK2 como una nueva subfamilia de serina/treonina quinasas de ratón. Además se demostró que cuando ambas eran fosforiladas por ERK1/2 y por p38, se estimulaba su actividad quinasa *in vitro* hacia un sustrato, el factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E), identificando así a la proteína quinasa MNK como la responsable de la fosforilación de eIF4E (Waskiewicz *et al.* 1997).

Por otra parte, Fukunaga y colaboradores (Fukunaga *et al.* 1997) identificaron la quinasa MNK1 humana a través de ensayos de expresión de librerías de cDNAs en bacterias. Estos estudios establecieron que MNK1 se fosforilaba y activaba *in vitro*, por ERK y por p38, pero no por JNK/SAPK y que, además, se activaba mediante estímulos que activan a ERK (suero, ésteres de forbol) o a p38 (debido a condiciones de estrés como la hiperosmolaridad y la radiación UV-C; o por citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa, TNF- $\alpha$ , y la interleuquina 1 beta, IL-1 $\beta$ ).

Las proteínas MNKS están codificadas por los genes *MKNK1* y *MKNK2*. En ratón, cada uno de los genes da lugar a una proteína, MNK1 y MNK2, mientras que en humanos, cada uno de los genes da lugar a dos isoformas distintas (MNK1a, MNK1b y MNK2a, MNK2b) por splicing o procesamiento alternativo (Slentz-Kesler *et al.* 2000; O'Loughlen *et al.* 2004). El extremo N-terminal de las cuatro isoformas es idéntico (**Figura 3**), y contiene una secuencia polibásica que funciona como una secuencia de localización nuclear (NLS) a la cual se une la proteína  $\alpha$ -importina, la cual permite la entrada de las proteínas al núcleo celular (Parra-Palau *et al.* 2003). Esta secuencia polibásica del extremo N-terminal también está implicada en la unión al factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G), proteína que sirve de anclaje para las MNKS, las cuales se unen para fosforilar de forma eficiente al eIF4E (Pyronnet *et al.* 1999). Sin embargo, los residuos de esta secuencia polibásica implicados en la unión de la  $\alpha$ -importina y del eIF4G no son los mismos (Parra-Palau *et al.* 2003).

El extremo C-terminal es distinto, lo que hace que las isoformas “a” sean más largas que las isoformas “b”. MNK1a y MNK2a presentan en su región C-terminal una zona de unión a MAPK, cuya secuencia difiere ligeramente, (LARRR y LAQRR, respectivamente), haciendo que MNK1a se una a las quinasas ERK1/2 y p38, y MNK2a solo se asocie con ERK1/2 (Waskiewicz *et al.* 1997). Sin embargo, las isoformas cortas no poseen este dominio. MNK2b se identificó por primera vez como una proteína de unión al receptor de estrógenos  $\beta$  (Er $\beta$ ) (Slentz-Kesler *et al.* 2000), y MNK1b fue descrita por primera vez en 2004 al clonar MNK1a a partir del RNA de células HL-60 (O’Loughlen *et al.* 2004). MNK1b se genera por procesamiento alternativo ya que ha perdido la región correspondiente al exón 12, lo cual produce un cambio en el marco de lectura generando un codón de parada. De esta manera, la proteína resultante pierde 89 aminoácidos del extremo C-terminal (336-424) que son reemplazados por 12 aminoácidos distintos (336-347), a los que se denomina región específica de MNK1b (MNK1bSR) (O’Loughlen *et al.* 2007). MNK1a se encuentra principalmente en el citoplasma debido a la presencia, en su extremo C-terminal, de una secuencia de exportación nuclear (NES) (Parra-Palau *et al.* 2003). MNK1b, al ser más corta, ha perdido esta secuencia, por lo que se puede encontrar tanto en el núcleo como en el citoplasma (O’Loughlen *et al.* 2004). El caso de MNK2a es más complicado, se encuentra principalmente en el citoplasma aunque carezca de NES, debido a una posible interferencia entre los extremos C-terminal y N-terminal, que dejaría inaccesible la zona de unión a la  $\alpha$ -importina, impidiendo la entrada de MNK2a al núcleo. MNK2b se localiza principalmente en el núcleo ya que también carece de NES (Scheper *et al.* 2003).



**Figura 3. Esquema general de las MNKs humanas.** Las cuatro isoformas presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) y las treoninas (Thr) del dominio catalítico. Solamente MNK1a presenta una secuencia de exportación nuclear (NES) y solo MNK1a y MNK2a tienen el dominio de unión a MAPK. Figura creada con Biorender.

Los dominios catalíticos de MNK1 y MNK2 presentan un 80% de similitud de secuencias (Jauch *et al.* 2006) y los sitios activos se encuentran altamente conservados. Estos poseen 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. Estos residuos de treonina van seguidos de prolinas que actúan como potenciales sustratos de fosforilación para las MAPK, característica que comparten con otras proteínas quinasas activadas por MAPK como MK2/3 y la proteína p90S6 quinasa (RSK) (Waskiewicz *et al.* 1997). Sin embargo, los dominios catalíticos de las MNKs también presentan ciertas particularidades, como la presencia de un dominio DFD (Asp-Phe-Asp) que marca el inicio del bucle de activación, en lugar de DFG (Asp-Phe-Gly) que presentan otras quinasas. Además, estos dominios catalíticos tienen dos insertos o secuencias cortas, uno de siete residuos situado entre el motivo DFD y el bucle de activación, y otro, de cinco residuos, localizado junto al motivo APE (Ala-Pro-Glu) (Buxade *et al.* 2008). Los estudios de las estructuras tridimensionales de MNK1 y MNK2 revelaron que el bucle de activación de MNK2 adquiere una inusual conformación abierta y que, además, el dominio DFD interfiere en la unión a ATP (Jauch *et al.* 2005). Por otro lado, el estudio de la estructura de MNK1 reveló que su bucle de activación se auto-inhibe debido a la presencia de residuos de fenilalanina localizados en el sitio de unión del ATP, impidiendo su unión (Jauch *et al.* 2006).

En ratón, MNK1 y MNK2 se expresan en todos los tejidos adultos a excepción de MNK2 en el cerebro, donde sus niveles se reducen considerablemente. La expresión de ambas proteínas es bastante abundante en músculo esquelético en comparación con el resto de tejidos (Waskiewicz *et al.* 1997). En humanos, se encuentran niveles elevados de MNK1a en corazón, hígado, placenta y páncreas, en comparación con cerebro, riñón, pulmón y músculo esquelético. MNK1b se expresa de forma similar en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, riñón o páncreas, mientras que en músculo esquelético los niveles son más bajos (O'Loghlen *et al.* 2004). MNK2a y MNK2b están presentes en una amplia variedad de tejidos, excepto en corazón y en cerebro donde los niveles de ambas isoformas son muy bajos, y también en timo y ovario, donde los niveles de MNK2a son muy reducidos (Slentz-Kesler *et al.* 2000).

La actividad basal de las MNKs y su regulación por parte de las MAPK varían en función de las distintas isoformas. MNK1a tiene una actividad basal baja que mejora en gran medida mediante la activación de las rutas de ERK o p38. Esto podría deberse a su extremo C-terminal, el cual dificulta el acceso al dominio catalítico de la proteína reprimiendo así tanto su actividad basal como su fosforilación en el bucle de activación (Goto *et al.* 2009). Por el contrario, MNK2a posee una alta actividad basal débilmente modificable por los agonistas de la ruta de ERK, debido a la capacidad de MNK2a de mantenerse unida a ERK incluso

después de que éste haya sido activado por fosforilación. De esta forma se impide la desfosforilación e inactivación de ERK. (Parra *et al.* 2005). MNK1b posee una alta actividad basal mucho más alta que MNK1a e independiente de la activación por las quinasas ERK1/2 y p38 (O'Loughlen *et al.* 2004). No obstante, se ha demostrado que aunque no se active por la vía de ERK, puede responder ligeramente a la activación de vías de señalización de MAPK como c-Jun o p38 (Goto *et al.* 2009). La falta de los 77 aminoácidos en el extremo C-terminal de MNK1b no justifica su alta actividad eIF4E quinasa, por lo que esta podría deberse a la secuencia específica de 12 aminoácidos de su extremo C-terminal (MNK1bSR) (O'Loughlen *et al.* 2007). Sin embargo otros autores discrepan y consideran que esta región específica no es la responsable de la mayor actividad de MNK1b (Goto *et al.* 2009). MNK2b tiene una actividad basal muy baja y se desconoce qué condiciones promueven su actividad (Scheper *et al.* 2003).

## 2.2. Sustratos de las MNKs

### a) Factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E)

El factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) fue el primer sustrato identificado de las MNKs tanto *in vitro* como *in vivo* (Waskiewicz *et al.* 1997; Waskiewicz *et al.* 1999). Estudios en ratones knockout para MNK1 y MNK2 han demostrado que las MNKs son las únicas quinasas de eIF4E (Ueda *et al.* 2004). En las células eucarióticas todos los mRNAs poseen en su extremo 5' una estructura llamada cap ( $m^7GpppN$ , donde N es cualquier nucleótido) a la que se une directamente el eIF4E, reclutando así la subunidad ribosómica 40 S y facilitando la síntesis de proteínas (Yang, Zhong, *et al.* 2020). El factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) está formado por tres subunidades: eIF4A, una RNA helicasa dependiente de ATP, eIF4E, y eIF4G, que sirve de proteína de anclaje para las MNKs, las cuales se unen fosforilando así de forma eficiente al eIF4E (Pyronnet *et al.* 1999).

El eIF4E es fosforilado en la serina 209 tras el tratamiento de las células con mitógenos, hormonas y factores de crecimiento (Joshi *et al.* 1995; Makkinje *et al.* 1995; Flynn *et al.* 1995), aunque el significado fisiológico de esta fosforilación sigue siendo indeterminado. Inicialmente se pensó que la fosforilación del eIF4E aumentaba su afinidad hacia el cap de los mRNAs (Minich *et al.* 1994). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la fosforilación del eIF4E reduce su afinidad por el cap del mRNA, lo que podría deberse a una repulsión entre el fosfato de la serina 209 del eIF4E y los grupos fosfato del mRNA. De esta forma eIF4E quedaría libre y disponible para continuar con el proceso de traducción de otros mRNAs (Scheper and Proud 2002; Scheper, van Kollenburg, *et al.* 2002; Zuberek *et al.* 2003).

La delección de MNK1 y MNK2 en ratones muestra que tanto la expresión de ambas proteínas como la fosforilación del eIF4E son prescindibles para la supervivencia y que, además, estos ratones no muestran defectos en su reproducción o desarrollo (Ueda *et al.* 2004). Asimismo, ratones con una mutación en eIF4E que impide su fosforilación, tampoco muestran defectos en la viabilidad o desarrollo (Furic *et al.* 2010). Estos resultados sugieren que aunque la fosforilación del eIF4E no sea crítica para la traducción general del mRNA, podría ser especialmente importante para la traducción de mRNAs con estructuras secundarias complejas en las regiones 5' no traducidas (5'UTR) (Koromilas *et al.* 1992).

La regulación del eIF4E es muy importante ya que la concentración presente en la célula es limitada (0.01-0.2 moléculas por ribosoma), en comparación con la de otros factores de iniciación (0.3-0.5 moléculas por ribosoma) (Duncan *et al.* 1987). La disponibilidad del eIF4E está regulada a través de interacciones reversibles con las proteínas de unión a 4E (4E-BPs, siendo 4E-BP1 la más estudiada), las cuales impiden la unión del eIF4E al eIF4G, evitando la formación del complejo eIF4F, y, por tanto, inhibiendo la síntesis de proteínas. Las 4E-BPs compiten con eIF4G en su unión a eIF4E. Esta competición depende del estado de fosforilación de las 4E-BPs, que en su estado hipofosforilado se asocian fuertemente a eIF4E, mientras que su hiperfosforilación disminuye drásticamente la unión a dicho factor (Gingras *et al.* 2001). La fosforilación de las 4E-BPs se lleva a cabo por el complejo 1 de la proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1), la cual es activada por las vías de señalización de Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/AKT (Martineau *et al.* 2013; Proud 2015).

### **b) Factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G)**

El factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G) es una proteína de anclaje que forma parte del complejo eIF4F uniéndose a diferentes componentes implicados en la traducción, incluidos las MNKs y eIF4E. Las MNKs se unen a la región C-terminal de eIF4G, eIF4E, eIF4A y eIF3 a su región central, y la proteína de unión a poli (A) (PABP) se une a su región N-terminal. Estas interacciones hacen que eIF4G esté implicado en diferentes procesos de la traducción ya que permite el reclutamiento de la subunidad ribosómica 40S al mRNA mediante su interacción con eIF3; facilita la circularización del mRNA mediante su unión a PABP, la cual se une al extremo 3' del mRNA favoreciendo así su traducción; ayuda en la apertura de las estructuras secundarias de las regiones 5' UTR mediante su unión con eIF4A; y favorece la fosforilación de eIF4E mediante la unión con las MNKs (Buxade *et al.* 2008; Cargnello *et al.* 2011).

MNK1 no puede interactuar con eIF4E en ausencia de eIF4G, por lo que la interacción MNK-eIF4G es esencial para la fosforilación del eIF4E (Pyronnet *et al.* 1999; Shveygert *et al.* 2010). Además, MNK1 regula su propia interacción con eIF4G a través de la señalización de

ERK o p38 (Shveygert *et al.* 2010), pero también la quinasa PKC $\alpha$  fosforila a eIF4G en la serina 1186 facilitando su unión a MNK1, lo que podría desempeñar un papel importante en la regulación de la actividad de MNK1 mediante el control de forma indirecta de la fosforilación del eIF4E (Dobrikov *et al.* 2011). Aunque hay estudios que sugieren que eIF4G es fosforilado por MNK1 *in vitro* (Pyronnet *et al.* 1999), no parece ser relevante *in vivo* ya que al inhibir la quinasa, no se ve afectada la unión a eIF4G de otros factores como eIF3 o eIF4A (Raught *et al.* 2000).

### **c) Ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 (hnRNP A1)**

La hnRNP A1 es una proteína nuclear muy abundante que tiene un papel importante en el metabolismo del mRNA. Aunque es principalmente nuclear, se desplaza entre el núcleo y el citoplasma mediante el motivo M9 que media el transporte bidireccional de la proteína (Izaurralde *et al.* 1997). La hnRNPA1 es una proteína de unión a regiones 3' UTR ricas en residuos de A y U (AREs) y está implicada en el control de la estabilidad del mRNA (Hamilton *et al.* 1997). Se ha observado una disminución en la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en queratinocitos humanos tras la inhibición de MNK con CGP57380, en respuesta a agonistas de la quinasa p38 (Kjellerup *et al.* 2008). Otros estudios han observado que la inhibición de MNK induce una disminución en la producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos tras el tratamiento con agonistas de la familia de los TLRs (Toll like receptor) (Rowlett *et al.* 2008). En respuesta a la activación de los linfocitos T, las MNKs fosforilan la serina 192 y la serina 310/311/312 de la proteína hnRNP A1, la cual pierde la capacidad de unión al mRNA del TNF- $\alpha$ , promoviendo la traducción de éste (Buxade *et al.* 2005). Esto sugiere que las MNKs juegan un papel importante en la regulación de la traducción de mRNAs específicos. Por otro lado, en respuesta a estrés osmótico a través de la ruta de p38, las MNKs fosforilan a hnRNP A1, lo que conlleva a su acumulación en gránulos de estrés, lo que indica que las MNKs tienen un papel importante en la fisiología celular a través de la regulación de la traducción de mRNAs específicos en situaciones de estrés (Guil *et al.* 2006). También se ha sugerido que las MNKs podrían estar implicadas en la senescencia celular mediante la regulación de la distribución celular de hnRNP A1 (Shimada *et al.* 2009).

### **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 implicada en la transcripción y en el procesamiento del RNA. Al igual que hnRNP A1, es una proteína de unión a AREs y junto con p54<sup>nrb</sup>, una proteína de unión a DNA/RNA, PSF forma un factor de transcripción-procesamiento implicado en diferentes procesos biológicos como la transcripción, el procesamiento del mRNA o la relajación del

DNA. PSF se identificó como sustrato de las MNKs al examinar la capacidad de éstas para fosforilar proteínas que se unieran al cap 5'. Las MNKs fosforilan a PSF en la serina 8 y la serina 283 favoreciendo su unión al mRNA de TNF- $\alpha$ , aunque esta fosforilación no afecta ni a la estabilidad, ni a la localización nuclear/citoplasmática de PSF o del mRNA de TNF- $\alpha$  (Buxadé *et al.* 2008). Por tanto, MNK parece estar implicada en la producción de TNF- $\alpha$  controlando la abundancia de su mRNA, aunque la implicación de PSF y/o hnRNP A1 no se ha determinado (Pashenkov *et al.* 2017).

#### **e) Fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2)**

La cPLA2 es una enzima que cataliza la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, por lo que tiene un papel importante en la producción de eicosanoides, los cuales están implicados en inmunidad e inflamación. MNK1 fosforila a cPLA2 en la serina 727 a través de la vía de señalización de p38 MAPK. Esta fosforilación favorece la actividad enzimática de cPLA2, lo que indica que MNK está implicada en la vía de señalización de los eicosanoides (Hefner *et al.* 2000). Además, la cPLA2 también es fosforilada *in vitro* por otras quinasas activadas por p38 como MSK1 y MSK5 (Cargnello *et al.* 2011).

#### **f) Sprouty 2 (Spry2)**

Sprouty 2 (Spry) es una proteína asociada a membrana que suprime la activación y/o señalización de ERK (Bundschu *et al.* 2006). MNK1 fosforila a Spry2 en la serina 112 y la serina 121, y el cambio de estas serinas por alaninas hace que aumente la degradación de Spry2 mediada por proteasoma (DaSilva *et al.* 2006). La inhibición de MNK con CGP57380 también produce una degradación de Spry2 mediada por proteasoma (Buxade *et al.* 2008), lo que sugiere que la fosforilación de Spry2 mediada por MNK1 proporciona un mecanismo para prolongar la vida media de Spry2 y, por tanto, su capacidad de inhibir la señalización de ERK.

### **2.3. MNKs, eIF4E y cáncer**

Para conocer cómo las MNKs están implicadas en tumorigénesis, muchas investigaciones se han enfocado en estudiar su sustrato mejor conocido, el eIF4E y su función en la expresión génica (Pinto-Díez *et al.* 2020; Yang, Zhong, *et al.* 2020). Fue en 1990 cuando el grupo de Lazaris-Karatzas y colaboradores (Lazaris-Karatzas *et al.* 1990) determinó por primera vez la relación del eIF4E con el control del crecimiento celular y la transformación neoplásica, ya que la sobreexpresión de eIF4E en las células NIH-3T3 daba lugar al crecimiento de colonias en agar, y a la formación de tumores cuando se inoculaban

en ratones. Además, hay diferentes estudios en los que se ha visto que la inhibición de eIF4E impide la proliferación y la alteración de la morfología celular, así como la formación de tumores, invasión y metástasis en diferentes modelos experimentales (De Benedetti *et al.* 1991; Graff *et al.* 1995; DeFatta *et al.* 2000). Asimismo, varios estudios han demostrado que el eIF4E se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer como tumores de colon, mama, vejiga, pulmón, próstata, tracto intestinal, cuello y cabeza, etc., lo que se correlaciona con la progresión y el pronóstico de la enfermedad (De Benedetti *et al.* 2004; Culjkovic *et al.* 2009; Kleiner *et al.* 2009; Proud 2015).

El eIF4E puede tener diferentes efectos en la expresión génica. Por una parte, aumenta la eficiencia de la traducción de algunos mRNAs que ya están en el citoplasma, debido a la presencia de estructuras secundarias complejas en la región 5'UTR que las hace particularmente dependientes de la actividad del eIF4E (Koromilas *et al.* 1992). Algunas de estas proteínas facilitan la angiogénesis como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); otras están implicadas en proliferación celular como la ciclina D1, ciclina D3, c-Myc, ornitina descarboxilasa (ODC) y Hdm2; en supervivencia como Bcl-2; o en invasión como metaloproteinasas (MMPs) o Snail (Rousseau *et al.* 1996; Culjkovic *et al.* 2007; Furic *et al.* 2010; Robichaud *et al.* 2015; Robichaud *et al.* 2018).

Por otra parte, eIF4E participa en la exportación de algunos mRNAs del núcleo al citoplasma. El eIF4E interacciona con la proteína transportadora del eIF4E (4ET) (Dostie *et al.* 2000) para entrar al núcleo, donde su capacidad para exportar mRNAs depende tanto de su fosforilación, como de la presencia de los 4E-SE (elementos sensibles al eIF4E) en la región 3'UTR de dichos mRNAs (Culjkovic *et al.* 2005). Los mRNAs que contienen los elementos 4E-SE son exportados al citoplasma a través de la proteína CRM1, a diferencia de la mayoría de los mRNAs, que se exportan a través de la proteína NXF1 (nuclear RNA export factor 1) (Culjkovic *et al.* 2006). Algunos de los mRNAs que son exportados del núcleo al citoplasma mediante el eIF4E son de proteínas implicadas en la proliferación celular como ciclina D1, Hdm2 u ornitina descarboxilasa (Rousseau *et al.* 1996; Phillips *et al.* 2008).

La fosforilación del eIF4E en la serina 209 por las MNKs es un requisito indispensable para su acción oncogénica. De hecho, se han observado niveles elevados de eIF4E fosforilado en diferentes tipos de cáncer como carcinoma nasofaríngeo, astrocitoma o melanoma, lo que correlaciona con un peor pronóstico en la enfermedad (Yang, Zhong, *et al.* 2020). Es más, hay estudios que demuestran que la fosforilación del eIF4E tiene un papel importante en la transformación celular y en el control del transporte del mRNA de la ciclina

D1, ya que la inhibición de la fosforilación del eIF4E con CGP57380 disminuía los niveles citoplasmáticos tanto del mRNA como de los niveles de proteína de la ciclina D1 (Topisirovic *et al.* 2004).

Asimismo, se ha observado una sobreexpresión de las MNKs en glioblastoma, cáncer de pulmón, de hígado, de ovario y de mama (Wheater *et al.* 2010; Grzmil *et al.* 2011; Guo *et al.* 2017; Hou *et al.* 2017; Pinto-Díez *et al.* 2018; Wang, Wang, *et al.* 2018), además de una correlación significativa entre la alta expresión de MNK1 y un peor pronóstico en cáncer de hígado, riñón y próstata; y entre la alta expresión de MNK2 y un peor pronóstico en cáncer de próstata y glioma de grado bajo (Pinto-Díez *et al.* 2020). La sobreexpresión de MNK1 está asociada con niveles elevados de c-Myc en leucemia mieloide aguda (AML), y la inhibición de MNK1 mediante CGP57380 disminuye de forma significativa la proliferación de las células hematopoyéticas (Worch *et al.* 2004). Otros estudios han demostrado que en varias líneas tumorales de mama, el aumento de la fosforilación y la actividad de las MNKs se correlacionan con la sobreexpresión de HER2, y que la inhibición de las MNKs con CGP57380 reduce la formación de colonias en agar (Chrestensen, Shuman, *et al.* 2007). Además, la pérdida de MNK1/2 reduce la tumorigénesis en un modelo de ratón con linfoma PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa) negativo (Ueda *et al.* 2010). Grzmil y colaboradores (Grzmil *et al.* 2011) observaron que la inhibición de MNK disminuye la traducción de mRNAs implicados en la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e induce una parada del ciclo celular en células de glioblastoma.

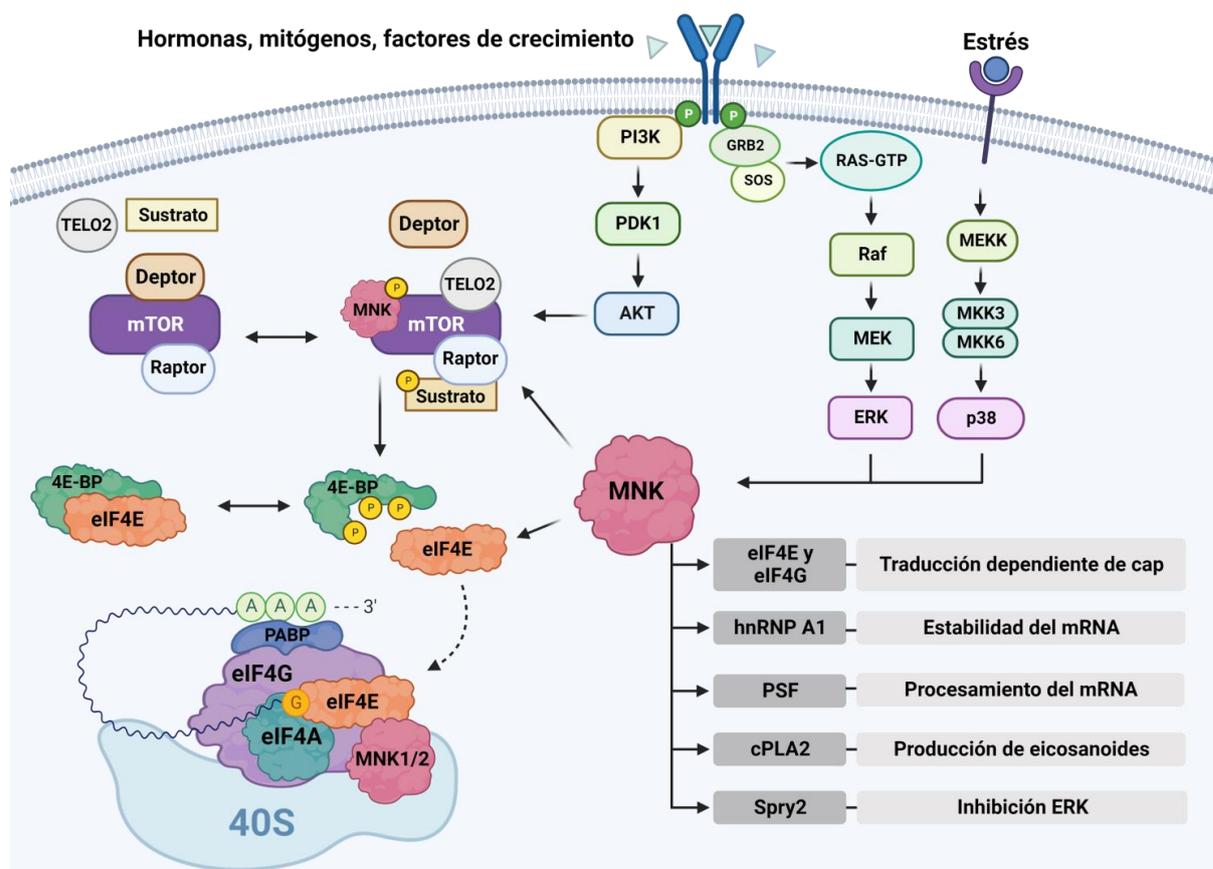
Wendel y colaboradores (Wendel *et al.* 2007) demostraron que la expresión del mutante no fosforilable (eIF4E<sup>S209A</sup>) impedía la formación de tumores en un modelo de ratón de linfoma, mientras que el mutante de MNK1 constitutivamente activo disminuía la apoptosis mediante la regulación de la proteína antiapoptótica MCL-1, lo que aceleraba la aparición de tumores. Además, los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) doble knockout para MNK1/2 experimentan más fácilmente apoptosis tras la retirada de suero, que los MEFs WT (wild type) o los MEFs knockout para MNK1 o MNK2 por separado. La reintroducción de MNK1 en los MEFs doble knockout disminuyó la sensibilidad a la apoptosis (Chrestensen, Eschenroeder, *et al.* 2007). Otro estudio ha observado que la inhibición de MNK con CGP57380 aumenta la apoptosis en células de NSCLC debido a una disminución en la proteína antiapoptótica MCL-1 (Wen *et al.* 2016), proteína cuya sobreexpresión se correlaciona con un peor pronóstico en pacientes de NSCLC (Wen *et al.* 2019). Estos resultados sugieren que las MNKs intervienen en rutas de señalización antiapoptóticas.

También se ha observado la implicación de MNK-eIF4E en la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en leucemia mieloide crónica (CML). El aumento de eIF4E fosforilado produce un

aumento en la síntesis de  $\beta$ -catenina, facilitando su translocación al núcleo y, en consecuencia, su activación (Lim *et al.* 2013). El tratamiento con CGP57380 previno la implantación de células madre de leucemia mieloide crónica en modelos de ratón.

La regulación de la actividad del eIF4E converge con dos vías de señalización: la vía de Ras/Raf/MAPK y la de PI3K/AKT/mTOR (**Figura 4**). La vía de Ras/Raf/MAPK está implicada en la supervivencia celular en cáncer. La ruta se activa por factores de crecimiento y mitógenos y Ras-GTP se une a Raf-1 que activa a MEK (MAP quinasa de ERK), también denominada MAPKK (MAP quinasa quinasa). Las diferentes variantes de MEK fosforilan a ERK1/2 y a p38  $\alpha/\beta$ , que a su vez fosforilan a MNK1/2. La vía de ERK suele estar activada en muchos cánceres, como consecuencia de mutaciones que conducen a la expresión de Ras constitutivamente activo (ocurre en el 30% de los cánceres humanos) (Asati *et al.* 2016) o por la pérdida de la neurofibromina 1 (NF1), la cual hidroliza el GTP y Ras pasa a su estado inactivo, Ras-GDP (Hou *et al.* 2012).

La vía de PI3K/AKT/mTOR es muy importante en el metabolismo de las células cancerosas ya que regula el inicio de la traducción y la síntesis de proteínas. La desregulación en esta vía está asociada con tumorigénesis, se encuentra activada en el 70% de los cánceres humanos y está relacionada con la resistencia a terapias antitumorales (Lineham *et al.* 2017; Batool *et al.* 2019). La proteína fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) es activada por factores de crecimiento, mitógenos y citoquinas, iniciando así la cascada. La quinasa dependiente de 3' fosfoinositol 1 (PDK1) activa a AKT, que en consecuencia se fosforila. AKT fosforilado, inactiva al complejo supresor de tumores 1 y 2 (TSC1 y TSC2), lo que resulta en la activación de mTORC1 mediante Rheb-GTP. La activación de PDK1 y AKT por PI3K está regulada negativamente por PTEN (Chappell *et al.* 2011), el cual es un gen supresor de tumores que suele estar mutado o silenciado en cánceres humanos (Chen *et al.* 2018). Su pérdida produce la activación de AKT y del resto de la cascada de señalización. mTORC1 regula la formación del complejo eIF4F a través de la fosforilación e inactivación de las 4E-BPs, que se disocian del eIF4E. Esto permite la interacción del eIF4E con el eIF4G y, en consecuencia, el ensamblaje del complejo de iniciación de la traducción eIF4F. mTORC1 también activa a la proteína quinasa S6K, la cual fosforila a la proteína ribosomal S6 y otros sustratos como eIF4B (Shahbazian *et al.* 2006). La señalización de mTORC1 es inhibida por la rapamicina y sus análogos (rapálogos). Dada la importancia de la ruta PI3K/AKT/mTOR en la regulación de la traducción de proteínas pro-oncogénicas, y la activación de esta vía en numerosos tipos de cáncer, las quinasas de esta ruta se han utilizado como dianas terapéuticas, y se han identificado numerosos inhibidores de las mismas (Noorolyai *et al.* 2019).



**Figura 4. Mecanismo de acción de MNK.** La activación de las MNKs se produce a través de la activación previa de las rutas Ras/Raf/ERK y de las p38 MAP quininas. Además, la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR en respuesta a factores de crecimiento, entre otros, estimulan la unión de MNK a mTORC1, facilitando la unión a su sustrato. Figura creada con Biorender.

Sin embargo, se ha observado que el tratamiento prolongado con inhibidores de mTOR produce un aumento en la fosforilación de eIF4E por las MNKs, a través de PI3K, lo que promueve la supervivencia de las células cancerígenas y limita los efectos antitumorales de los tratamientos (Wang *et al.* 2007). De hecho, la combinación de inhibidores de mTORC1 y MNK1/2 es mucho más potente que el uso de cada uno por separado en la inhibición del crecimiento celular en cáncer de próstata y glioblastoma (Bianchini *et al.* 2008; Grzmil *et al.* 2011). En células de NSCLC, la inhibición de MNK con CGP57380 disminuye la fosforilación del eIF4E inducida por everolimus, inhibidor de mTORC1. Esta combinación de inhibidores produce un incremento de la respuesta antitumoral a través de la inducción de apoptosis y de la inhibición de la proliferación celular (Wen *et al.* 2016). Este doble tratamiento también disminuyó la fosforilación de los sustratos de mTORC1 insensibles a rapamicina, ULK1 (quinasa 1 activadora de la autofagia tipo Unc-51) y 4E-BP1, en MEFs WT, pero no en MEFs doble knockout para MNK1/2, lo que indica que la inhibición de mTORC1 se produce por efecto de la inhibición de MNK (Brown *et al.* 2017a). Todos estos datos demuestran que las MNKs contribuyen a la resistencia a la rapamicina en las células tumorales.

MNK actúa como punto de convergencia entre las rutas de PI3K/AKT/mTOR y de MAP quininas. Recientemente se ha observado que las MNKs estimulan la señalización de mTORC1 (**Figura 4**), ya que desplazan a DEPTOR de mTORC1 facilitando la unión de TELO2 al complejo, lo que mejora la unión de mTORC1 a su sustrato (Brown *et al.* 2017a, 2017b). A su vez, mTORC1 fosforila a MNK2a en la serina 74, inhibiendo su actividad e impidiendo su unión a eIF4G. Esto proporciona un mecanismo de retroalimentación que puede inhibir la señalización de MNK. Sin embargo, la mutación de la serina 74 a alanina en MNK2 mejora la fosforilación del eIF4E y aumenta la actividad de mTORC1, lo que está asociado con un aumento de las capacidades transformadoras e invasivas de las células de cáncer de próstata. Estos datos indican que la fosforilación de MNK2 en la serina 74 está inversamente relacionada con la progresión tumoral en cáncer de próstata (Xie *et al.* 2020), y además explicaría el incremento de la actividad de MNK2a y la fosforilación del eIF4E tras el tratamiento con rapamicina en células de cáncer de próstata (Stead *et al.* 2013).

#### 2.4. MNKs en otras patologías

La traducción cap-independiente está mediada por los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), localizados en la región 5'UTR de los mRNAs (Jang *et al.* 1988; Pelletier *et al.* 1988). Los IRES facilitan la traducción de los mRNAs cuando la traducción cap-dependiente no se puede llevar a cabo, lo que ocurre en situaciones como infecciones virales (Hanson *et al.* 2012), entre otras. Además, la traducción de oncogenes mediada por IRES está regulada por las rutas de ERK y p38 MAPK (Shi *et al.* 2005), lo que sugiere que las MNKs tienen un papel importante en la traducción cap-independiente. Es más, se ha observado que la inhibición de mTOR con rapamicina hace que el crecimiento de las células tumorales dependa de la traducción cap-independiente mediada por IRES y que, además, produzca una activación de MNK en células de mieloma múltiple (MM). Por el contrario, la inhibición de MNK impide la traducción de c-Myc dependiente de IRES (Shi *et al.* 2013). Otros estudios han descrito también el papel de las MNKs en la regulación de la traducción viral mediada por IRES (Goetz *et al.* 2010; Brown *et al.* 2014). También se ha demostrado la implicación de MNK en la infección por el virus Chikungunya, en la cual se produce una inhibición de mTORC1, que induce la hiperfosforilación de eIF4E y, en consecuencia, una síntesis de proteínas virales elevada vía cap-dependiente (Joubert *et al.* 2015). Recientemente, se ha demostrado que el SARS-CoV-2 aprovecha la vía de ERK/MNK1/eIF4E para su replicación en las células y que, además, la inhibición de la interacción del eIF4E con el mRNA viral podría ser una estrategia para impedir su replicación (Kumar *et al.* 2021). MNK1 y MNK2 también regulan la señalización del interferón tipo I y II (Joshi *et al.* 2009; Joshi *et al.* 2011). Asimismo, están implicadas en las enfermedades relacionadas con las citoquinas como por ejemplo enfermedades

autoinmunes (Bao *et al.* 2017), inflamatorias (Seidel *et al.* 2016) o neurodegenerativas (Shiers *et al.* 2020), al igual que en la sensación del dolor (Moy *et al.* 2017).

Las MNKs no solo están implicadas en el desarrollo del cáncer o de otras enfermedades, sino también en la resistencia a tratamientos antitumorales usados en cáncer de páncreas (Adesso *et al.* 2013), glioblastoma (Grzmil *et al.* 2016) o cáncer de mama (Geter *et al.* 2017), así como la resistencia a fármacos usados en infecciones virales (Kumar *et al.* 2018).

## 2.5. Inhibidores de MNK

La desregulación de la síntesis de proteínas es un marcador distintivo en el cáncer (Diab *et al.* 2014). Las MNKs han demostrado ser unas dianas potencialmente atractivas en la búsqueda de tratamientos frente al cáncer. Se han identificado numerosos inhibidores de MNK (**Tabla I**), aunque muchos no son específicos e inhiben otras quinasas (Xu *et al.* 2022).

Los primeros inhibidores identificados y más usados de MNK son CGP57380 (Tschopp *et al.* 2000) y cercosporamida (Konicek *et al.* 2011). CGP57380 es un potente inhibidor con valores en el rango micromolar, aunque también inhibe a la caseína quinasa 1 (CK1) o la MAP quinasa quinasa 1 (MKK1) de una forma similar a las MNKs. Inhibe la proliferación celular induciendo una parada del ciclo celular en la fase G1 (Bain *et al.* 2007; Xu *et al.* 2022). La cercosporamida, un antifúngico natural, es un potente inhibidor de las MNKs con valores en el rango nanomolar, capaz de inducir apoptosis e impedir la migración y la angiogénesis en células de carcinoma hepatocelular (Liu *et al.* 2016), aunque es más potente frente a otras quinasas que frente a las MNKs (Beggs *et al.* 2015).

Más recientemente, se ha identificado el compuesto MNK-I1, un derivado de piridina, como un potente inhibidor de las MNKs, que bloquea la fosforilación del eIF4E e impide la migración de las células tumorales sin producir efectos en las vías de señalización estudiadas, con valores en el rango micromolar bajo, y una especificidad mayor que el CGP57380 y la cercosporamida (Beggs *et al.* 2015). Otros derivados de piridina han sido sintetizados también como potentes inhibidores de MNK en cáncer de mama, de colon, de próstata, etc. (Teo *et al.* 2015; Yu *et al.* 2015); derivados del ácido retinoico, que inducen la degradación de MNK en cáncer de mama y de próstata (Ramalingam *et al.* 2019), derivados de benzofurano (Wang, Li, *et al.* 2018) o compuestos que se unen a la forma inactiva de las MNKs (Kannan *et al.* 2017), entre otros (**Tabla I**). Referente a estos últimos, cabe destacar el reciente hallazgo del compuesto EB1, capaz de unirse al motivo DFD, característica única de las MNKs. Así, se une a la forma inactiva de MNK1 e inhibe la proliferación en células tumorales de mama, pero no en normales (Bou-Petit *et al.* 2022).

**Tabla I. Inhibidores de MNK. Modificada de (Pinto-Díez et al. 2020)**

COMPUESTO	APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
BAY1143269	NSCLC, leucemia	Inhibidor de MNK en ensayos clínicos
CGP57380	NSCLC, leucemia, linfoma, mieloma, glioma, PCNSL, meduloblastoma, carcinoma nasofaríngeo, PDAC, cáncer de mama y de ovario	Inhibidor de MNK
Cercosporamida	NSCLC, cáncer de colon, hígado, mama, leucemia, linfoma	Inhibidor de MNK
Merestinib	NSCLC, leucemia, glioma	Inhibidor multi-quinasa en ensayos clínicos
Derivados de benzofurano	Cáncer de colon, leucemia	Degradador de MNK
Derivados del ácido retinoico	Cáncer de próstata y mama	Degradador de MNK
Galeterona y análogos	Cáncer de próstata y páncreas	Degradador de MNK en ensayos clínicos
Derivados de piridinas	Cáncer de cérvix, mama, colon, ovario, páncreas, próstata, meduloblastoma, leucemia, mieloma y carcinoma nasofaríngeo	Inhibidor MNK
SEL201	Cáncer de mama, leucemia, melanoma	Inhibidor MNK
NUCC-54139	Leucemia	Inhibidor MNK
Niclosamidas	Leucemia	Afecta la ruta ERK/MNK/eIF4E
eFT508	Linfoma	Inhibidor MNK en ensayos clínicos
QL-X-138	Leucemia, linfoma	Inhibidor BTK/MNK
FL3 (flavaglina sintética)	Linfoma	
Derivados de ciclopropano carboxamida	Leucemia	Inhibidor MNK
Cabozantinib	MPNSTs	Inhibidor multi-quinasa
apMNK2F, apMNK3R (aptámeros)	Cáncer de mama	Inhibidor de MNK
EB1	Cáncer de mama	Inhibidor de MNK

NSCLC – Cáncer de pulmón de célula no pequeña; PCNSL – Linfoma primario del sistema nervioso central; PDAC – Adenocarcinoma pancreático ductal; MPNSTs – Tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos.

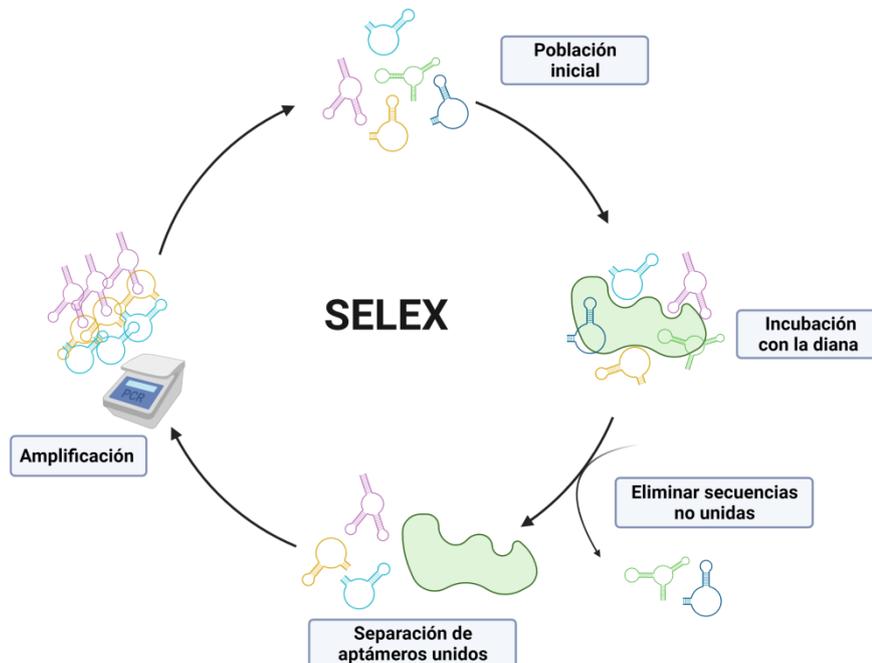
Hasta la fecha, no hay fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) que actúen de forma específica sobre las MNKs, pero existen algunos compuestos que están siendo evaluados en estudios clínicos. Recientemente se ha identificado un inhibidor de MNK1 con efecto anti-tumoral, BAY1143269 de Bayer, que disminuye la fosforilación del eIF4E, produce una parada del ciclo celular en fase G0/G1, disminuye la expresión de las ciclinas B1, A2, D3 y H, así como de proteínas implicadas en invasión, e induce apoptosis en células de NSCLC y de leucemia mieloide aguda. Además, disminuye la resistencia al tratamiento con docetaxel en modelos experimentales de ratón de NSCLC (Santag *et al.* 2017) y ha sido evaluado en fase I de ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados (NCT02439346; ClinicalTrials.gov). Por otra parte, eFT508 (tomivosertib), es un nuevo y potente inhibidor oral de MNK1 y MNK2 capaz de reducir la fosforilación del eIF4E y la producción de citoquinas proinflamatorias en diferentes líneas celulares tumorales. Además, es un potente inhibidor de la actividad tumoral en modelos de linfoma difuso de células B grandes. Actualmente se encuentra en fase II en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos y linfomas en combinación con los inhibidores de PD-1/PD-L1 (Reich *et al.* 2018). ETC-206, un compuesto generado por el Centro Experimental de Terapias de Singapur, inhibe la actividad de MNK1 y MNK2 y en combinación con el inhibidor tirosina quinasa dasatinib, inhibe el crecimiento tumoral en modelos de leucemia mieloide crónica. Aunque completó la fase I de ensayos clínicos para el tratamiento de tumores hematológicos en combinación con dasatinib, fue cancelado posteriormente por falta de pacientes (Jin *et al.* 2021; Xu *et al.* 2022). El inhibidor multi-quinasa merestinib actúa frente a las MNKs, entre otras quinazinas, impidiendo el crecimiento tumoral y la metástasis en modelos de NSCLC. Este inhibidor se encuentra actualmente en fase II en ensayos clínicos para NSCLC, AML, cáncer de vías biliares y de colon. Por otro lado, la galeterona promueve la degradación de MNK y está siendo evaluada en fase II de ensayos clínicos en pacientes con cáncer de páncreas y de próstata (Pinto-Díez *et al.* 2020).

### 3. APTÁMEROS COMO HERRAMIENTAS TERAPEUTICAS

Los aptámeros son oligonucleótidos de RNA o DNA de cadena sencilla (ssDNA) capaces de reconocer a una molécula diana con alta especificidad y afinidad, gracias a su capacidad para formar estructuras terciarias bajo determinadas condiciones de temperatura, salinidad y pH. Fueron descubiertos en 1990 por dos grupos de investigación independientes (Ellington *et al.* 1990; Tuerk *et al.* 1990) que, juntos, introdujeron un nuevo método para la generación de aptámeros de alta afinidad que sigue siendo de uso común en la actualidad.

Este proceso, mediante el cual los aptámeros son seleccionados, se denomina SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) y consiste en la realización de

varias rondas de selección. Tanto para seleccionar aptámeros de DNA como de RNA, el proceso comienza con una población inicial de aproximadamente  $10^{14}$ - $10^{15}$  oligonucleótidos de DNA cadena sencilla obtenidos por síntesis química y formados por una secuencia central y variable de 20-80 nucleótidos, flanqueada por dos regiones de secuencia conocida, de 18-20 nucleótidos, a las que se unirán los cebadores durante la PCR (Zhuo *et al.* 2017). Los aptámeros que forman esta población inicial adoptarán distintas estructuras terciarias según su secuencia, lo que les permitirá interactuar con la molécula diana. Esta librería inicial es incubada con la diana bajo unas condiciones determinadas. Las moléculas no unidas son eliminadas, mientras que las unidas son amplificadas mediante PCR, enriqueciendo la población obtenida y finalizando así una ronda de selección (**Figura 5**). En el caso de los aptámeros de RNA, la población inicial de DNA se transcribe previamente a RNA, se expone a la diana, y los aptámeros unidos son amplificados mediante RT-PCR (Darmostuk *et al.* 2015).



**Figura 5. Esquema del método SELEX.** Proceso de selección de aptámeros *in vitro* que parte de una población inicial de oligonucleótidos de ssDNA o RNA con secuencias aleatorias. El proceso SELEX se caracteriza por la repetición de las etapas sucesivas de incubación, amplificación y pasos intermedios que conforman la ronda. Los aptámeros seleccionados en una ronda sirven de población en la siguiente, con una media general de 6-20 rondas de selección. La ronda final terminará tras la amplificación. Figura creada con Biorender.

El producto de PCR obtenido al final de cada ronda de selección es de doble cadena, por lo que hay que separar las cadenas complementarias para obtener aptámeros de cadena sencilla que sean enfrentados de nuevo a la diana en el siguiente ciclo de selección.

Para ello, se llevan a cabo diferentes técnicas como desnaturalización a 90°C y posterior renaturalización a 4°C para que el aptámero se estructure, electroforesis y posterior elución de la banda correspondiente, digestión enzimática con exonucleasa, PCR asimétrica o marcaje de una de las cadenas con biotina para separarlas con esferas magnéticas conjugadas con estreptavidina (Svobodová *et al.* 2012).

Para mejorar la especificidad de la técnica, se llevan a cabo procesos de contraselección o selección negativa, donde las secuencias seleccionadas se incuban con una molécula diana inespecífica, o con el soporte con el que se realiza la selección (por ejemplo, una resina). Los aptámeros que se unan serán descartados, eliminando así los aptámeros no específicos (Ellington *et al.* 1992). Esta técnica puede incrementar la especificidad de los aptámeros hasta 10 veces, por lo que es muy conveniente cuando se quieren obtener aptámeros que sean capaces de distinguir dianas muy similares como por ejemplo, células de un tipo de cáncer específico o mutaciones puntuales de una proteína (Ospina 2020).

Las diferentes variables que se manejan en el entorno de una selección dependen de la naturaleza de la diana (punto isoeléctrico, tamaño, etc.) y del uso final del producto (diagnóstico o terapia). Para optimizar una selección se debe hacer un estudio previo de estas características ya que, dependiendo de ellas se elegirá el tampón, la temperatura, el tiempo de incubación, el soporte con el que se realiza la selección y el ratio aptámero-proteína (Zhou *et al.* 2017). Además, se pueden utilizar condiciones de selección más restrictivas con la finalidad de aumentar la afinidad de los aptámeros obtenidos, mediante, por ejemplo, la disminución de la cantidad de aptámero empleada en cada ronda (Moreno *et al.* 2003) o la reducción en el tiempo de incubación (de Arriba *et al.* 2022).

Desde su descubrimiento en 1990, se han desarrollado diferentes modificaciones sobre el método SELEX tradicional mediante el uso de técnicas como electroforesis capilar, citometría de flujo, resonancia de plasmón de superficie, selección en células (cell-SELEX) o en animales (*in vivo* SELEX), oro coloidal, etc. (Moreno *et al.* 2003; Mendonsa *et al.* 2004; Raddatz *et al.* 2008; Mi *et al.* 2010; Polonschii *et al.* 2010; Zhuo *et al.* 2017; de Arriba *et al.* 2022), con la finalidad de mejorar el rendimiento de la selección. Junto con los parámetros anteriores bien establecidos, se conseguirá que el proceso SELEX sea más eficaz y el número de rondas de selección se optimice.

Para comprobar si está habiendo enriquecimiento de la población se realizan pruebas cada cierto número de rondas como ensayos enzimáticos en placa con aptámeros (ELONA), western blot, slot blot u otras (Frezza *et al.* 2020; Carrión-Marchante *et al.* 2021). Una vez se comprueba que es así, el proceso SELEX se da por finalizado y se identifican aptámeros

individuales mediante clonaje y secuenciación Sanger o NGS (Next-gene sequencing) para caracterizarlos (Ruiz Ciancio *et al.* 2018).

### 3.1. Estructura de los aptámeros

Los aptámeros son capaces de formar estructuras secundarias complejas como tallos, bucles, horquillas, pseudonudos, G-quadruplex, etc., que a su vez forman estructuras tridimensionales que determinan su unión a la diana. Estas estructuras se producen como resultado de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, complementariedad de bases y son esenciales para la afinidad y la especificidad de unión del aptámero (Keefe *et al.* 2010). Existen programas informáticos que permiten predecir las posibles estructuras secundarias de los aptámeros en función de su secuencia, y además detectar la posibilidad de que formen estructuras G-quadruplex, como mFold y QGRS Mapper, entre otros (Chen *et al.* 2021).

### 3.2. Ventajas y limitaciones de los aptámeros

Los aptámeros son comparados con frecuencia con los anticuerpos, ya que, al igual que los anticuerpos monoclonales, los aptámeros reconocen su diana de forma específica y con gran afinidad, aunque con notables diferencias (Ospina 2020). Las características de los aptámeros les confieren diversas ventajas con respecto a los anticuerpos como se resume en la **Tabla II**. Los aptámeros presentan características útiles en clínica, ya que son muy estables a cambios de temperatura, pH y a las condiciones iónicas de su entorno (Mayer 2009). Además, muestran una baja inmunogenicidad y toxicidad, lo que amplía enormemente sus potenciales usos, y son fácilmente sintetizados y modificados en grandes cantidades sin variaciones de lote a lote (Pereira *et al.* 2018), con un bajo coste (Zhang *et al.* 2019). Su pequeño tamaño y estructura flexible les permite unirse a moléculas más pequeñas, a dominios que resultarían inaccesibles para los anticuerpos, ya que estos son más grandes y, además, penetrar con mayor facilidad en los tumores (Zhou *et al.* 2017). Se pueden seleccionar frente a numerosas dianas como iones, moléculas orgánicas e inorgánicas, ácidos nucleicos, proteínas, toxinas, péptidos, partículas virales, bacterias y parásitos entre otros (Ruiz Ciancio *et al.* 2018). Los aptámeros se pueden unir a fármacos, a RNAs no codificantes, proteínas y nanopartículas, lo que les convierte en prometedoras herramientas tanto para el diagnóstico como para el tratamiento en cáncer (Nimjee *et al.* 2017; Pereira *et al.* 2018; Ruiz Ciancio *et al.* 2018; Shigdar *et al.* 2021).

Tabla II. Principales ventajas de los aptámeros respecto a los anticuerpos.

APTÁMEROS	ANTICUERPOS
No requieren el uso de animales y se seleccionan frente a todo tipo de moléculas incluyendo proteínas no inmunogénicas y toxinas	Requieren el uso de animales y solo pueden ser frente a proteínas inmunogénicas
Se producen por síntesis química con muy baja o nula variación entre lotes	Suelen sufrir variaciones entre lotes
Pequeño tamaño (5-30 KDa) que permite una entrada más eficiente en la célula	Mayor tamaño (150-180 KDa) que limita el acceso a compartimentos celulares
Pueden renaturalizarse en minutos, transportarse a temperatura ambiente y almacenarse durante tiempos prolongados	Su vida media es limitada, son sensibles a las variaciones de temperatura sin posibilidad de renaturalización
Condiciones de selección modificables según necesidad	Obtención solo bajo condiciones fisiológicas
Pueden ser modificados para aumentar su estabilidad, conjugarse con marcadores, etc.	Solo pueden marcarse, lo que puede provocar pérdida de afinidad
No suelen ser inmunogénicos	Suelen ser inmunogénicos

Algunas limitaciones de los aptámeros son su sensibilidad a nucleasas, o que su tamaño pequeño les hace susceptibles a la filtración renal. Sin embargo, pueden realizarse modificaciones químicas que mejoren su rendimiento, como por ejemplo, acoplado polietilenglicol (PEG) o biotina en los extremos para incrementar su peso molecular e impedir su filtración (Haruta *et al.* 2017). También se pueden realizar modificaciones en el anillo de azúcar para evitar la degradación por nucleasas (Ni *et al.* 2017).

### 3.3. Aptámeros en biomedicina

Los usos de los aptámeros son tan variados como las dianas que pueden reconocer. Gracias a su alta afinidad, los aptámeros se han desarrollado como herramientas diagnósticas (Ruiz Ciancio *et al.* 2018). Por ejemplo, aptámeros específicos frente a EGFR pueden ser usados para detectar células tumorales y para una detección temprana de metástasis (Wan *et al.* 2010). Los aptámeros también pueden utilizarse como transportadores de fármacos, ya que son fácilmente modificables y pueden conjugarse con moléculas pequeñas, nanopartículas o RNAs de interferencia (siRNAs), dirigiendo así los distintos compuestos a un lugar concreto (Zhuo *et al.* 2017). Se han utilizado también en la marcación para imágenes biológicas (Tan *et al.* 2013) y en la inspección de alimentos (Dong *et al.* 2014).

Una de las aplicaciones más importantes de los aptámeros es su uso como agentes terapéuticos. Generalmente, los aptámeros pueden ejercer su efecto en terapia de dos maneras distintas, produciendo un efecto antagonista al unirse a su diana impidiendo otras interacciones, o como agonista al incrementar la función de su proteína diana. Entre 2012 y 2013 el número de artículos sobre aptámeros era inferior a 100, mientras que entre 2019 y 2021 fue superior a 300. De hecho, más del 22% de los artículos tratan sobre el uso de aptámeros en cáncer (Cruz-Hernández *et al.* 2022). Existen numerosos aptámeros que se han probado en líneas celulares y tejidos tumorales con buenos resultados. El aptámero A30 se une al dominio extracelular del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3) y reduce la proliferación celular en cáncer de mama (Cruz-Hernández *et al.* 2022). También se han desarrollado aptámeros de DNA que se unen al dominio extracelular de PD-1, impidiendo la interacción PD-1/PD-L1 e inhibiendo el crecimiento de células en un modelo murino de cáncer de colon (Fu *et al.* 2020). Los aptámeros se han usado también para evitar la resistencia a los tratamientos con TKIs en cáncer de pulmón. Así, el aptámero E0727 inhibe la excesiva proliferación de las células cancerígenas e induce apoptosis en aquellas células con un EGFR mutado. Además, el aptámero AX102 ha mostrado efectos anti-angiogénicos en cáncer de pulmón tanto *in vitro* como *in vivo* (Wieleba *et al.* 2020).

Hasta la fecha, solo un aptámero (Pegabtanib o Macugen®), ha sido aprobado por la FDA para su uso en clínica en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (AMD). Es un aptámero de RNA que inhibe la isoforma del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) causante de la angiogénesis exacerbada de esta enfermedad (Ng *et al.* 2006). Se ha utilizado desde 2004 para el tratamiento de la AMD, aunque en los últimos años el uso de este aptámero ha sido relegado debido a la aparición de anticuerpos más efectivos (Zhou *et al.* 2017). No obstante, existen muchos más aptámeros en distintas fases de ensayos clínicos (**Tabla III**). AS1411 es el primer aptámero en estudio clínico para el tratamiento del cáncer. Es un aptámero de DNA que se une a la nucleolina, proteína implicada en supervivencia celular, crecimiento y proliferación, sobreexpresada en la superficie de las células tumorales. Tras la unión a la nucleolina, el aptámero se internaliza y desestabiliza el mRNA de Bcl-2, induciendo apoptosis (Nimjee *et al.* 2017; Kaur *et al.* 2018; Fu *et al.* 2020). Ha sido evaluado en fases I y II de ensayos clínicos en carcinoma renal y leucemia mieloide aguda (Clinicaltrials.gov). NOX-A12 es un aptámero de RNA conocido como Spiegelmer® que reconoce el ligando 12 de la quimioquina CXC (CXCL-12), el cual juega un papel importante en la proliferación tumoral, angiogénesis y metástasis. Tras la unión del aptámero, NOX-A12 interrumpe la actividad de CXCL-12 y modula el microambiente tumoral impidiendo la proliferación del tumor y la metástasis. Ha sido evaluado en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica

(CLL) y mieloma múltiple y actualmente ha comenzado un estudio en fase I/II para evaluar su eficacia en pacientes con cáncer de páncreas y con cáncer de colon (Clinicaltrials.gov) (Poolsup *et al.* 2017; Kaur *et al.* 2018; Kumar Kulabhusan *et al.* 2020).

**Tabla III. Aptámeros terapéuticos en ensayos clínicos. Basada en (Zhang *et al.* 2021).**

APTÁMERO	DIANA	APLICACIÓN	FASE CLÍNICA
ARC1905	C5	Degeneración macular asociada a la edad	Fase I, completada
		Enfermedad de Stargardt	Fase II, completada
Zimura	C5	Vasculopatía coroidea polipoidea	Fase II, completada
		Degeneración macular asociada a la edad	Fase II, completada
Fovista	PDGF BB	Degeneración macular asociada a la edad	Fase I, terminada
E100300	PDGF	Degeneración macular asociada a la edad	Fase II, completada
EYE001	VEGF	Enfermedad de Von Hippel-Lindau	Fase II, completada
		Degeneración macular	Fase II, completada
		Neovascularización coroidea	Fase III, completada
NU172	Trombina	Enfermedad cardíaca	Fase II, en reclutamiento
ARC1779	vWF	Enfermedad de Von Willebrand tipo 2b	Fase II, completada
BT200	vWF	Enfermedad de Von Willebrand Hemofilia A	Fase II, completada
ApTOLL	TLR4	Ictus	Fase IIa, completada
NOX-H94	Hepcidina	Anemia	Fase II, completada
		Enfermedad renal en etapa terminal	
NOX-E36	CCL2	Enfermedad inflamatoria crónica	
		Diabetes mellitus tipo 2	Fase I, completada
		Lupus eritematoso sistémico	
NOX-A12	CXCL12	Leucemia linfocítica crónica	Fase II, completada
		Mieloma múltiple	Fase II, completada
ARC 19499	TFPI	Hemofilia	Fase I, completada
AS1411	Nucleolina	Carcinoma renal	Fase II, terminada
		Leucemia mieloide aguda	
RBM-007	FGF2	Degeneración macular asociada a la edad exudativa	Fase II, completada
BC-007	GPCRAAb	Cardiomiopatía dilatada	Fase II, en reclutamiento
REG1	Factor de coagulación IXa	Enfermedad de la arteria coronaria	Fase II, completada

En nuestro laboratorio, en 2015, se caracterizó el aptámero apMNK2F frente a MNK1b, capaz de inhibir la proliferación, migración y la formación de colonias en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama (García-Recio *et al.* 2016). Con el objetivo de optimizar el aptámero, se llevó a cabo un análisis *in silico* de la estructura de apMNK2F utilizando los programas informáticos mFold y QGRS Mapper. El análisis mostró regiones que, a priori, no participan en la estructura secundaria del aptámero, por lo que estas secuencias fueron eliminadas del aptámero parental apMNK2F de 75 nucleótidos, para sintetizar el aptámero truncado apMNK2FT de 48 nucleótidos. Los ensayos mostraron que apMNK2FT conserva las características estructurales del aptámero precursor y que, además, mantiene la capacidad para unirse a MNK1, pero es menos efectivo en la inhibición de la proliferación y migración de las células tumorales de mama, por lo que se siguieron otras estrategias en la optimización del aptámero.

A través de un análisis más detallado del programa QGRS Mapper, se obtuvieron cuatro secuencias distintas a partir de apMNK2FT en base a la formación de G-quadruplex, entre las que destacó la secuencia denominada apMNKQ2 por ser la más eficaz inhibiendo la actividad MTT en las líneas celulares de cáncer de mama, por lo que se eligió este aptámero para continuar con su caracterización funcional. El aptámero apMNKQ2 posee una alta estabilidad y especificidad hacia su diana, siendo capaz de reconocer ambas isoformas de MNK1, aunque muestra más afinidad por MNK1b que por MNK1a. Además, es capaz de producir apoptosis e inhibir la proliferación, formación de colonias y procesos metastásicos en células tumorales de cáncer de mama, y de reducir el crecimiento tumoral y número de metástasis en modelos *in vivo* (Pinto-Díez *et al.* 2022).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de pulmón es una de las enfermedades con más malignidad y mortalidad a nivel mundial (Sung *et al.* 2021). La alta mortalidad se debe principalmente a que la mayoría de los casos de cáncer de pulmón son diagnosticados en estadios avanzados. De hecho, a pesar de las mejoras en las estrategias terapéuticas desarrolladas en los últimos años (Alexander *et al.* 2020), el pronóstico para estos pacientes sigue siendo malo.

El aptámero apMKNKQ2 frente a la proteína MNK1 ha sido desarrollado en nuestro laboratorio demostrando un gran potencial como agente antitumoral mediante la inhibición de procesos moleculares característicos de células tumorales de mama, tanto *in vitro* como *in vivo* (Pinto-Díez *et al.* 2022). Por ello, pensamos que apMKNKQ2 podría tener también un efecto inhibitorio de los procesos tumorigénicos inducidos por MNK1 en cáncer de pulmón no microcítico, en el cual la sobreexpresión de MNK1 está asociada con una peor supervivencia para estos pacientes (Wen *et al.* 2016). En este trabajo nos hemos propuesto estudiar el efecto de apMKNKQ2 en cáncer de pulmón no microcítico para poder establecer su uso como agente antitumoral en un futuro.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos principales:

1. Caracterizar el efecto de apMKNKQ2 en la progresión tumoral y la metástasis en cultivos celulares de líneas tumorales de pulmón.
2. Estudiar la eficacia de apMKNKQ2 en un modelo murino de cáncer de pulmón.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES

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

**Análisis de imagen:** Image Lab Software Versión 6.1 (BioRad, EEUU), ImageJ Java 1.8.0\_172 (National Institutes of Health, EEUU).

**Adquisición de imagen:** ChemiDoc MP Imaging Systems (BioRad, EEUU), cámara Nikon DS-Fi3 (Nikon, Japón) integrada en el microscopio Olympus.

**Anticuerpos:** los anticuerpos empleados y su título aparecen detallados en las **Tablas V y VI**.

**Aptámeros:** los aptámeros utilizados en este trabajo y sus secuencias se detallan en la **Tabla VII**.

**Centrífugas:** B4i/BR4i Jouan de DJB (Labcare, Reino Unido), Beckman J2-HS (Beckman Coulter, Alemania), microfuga Mini-Spin<sup>®</sup> (Eppendorf, Alemania), centrífuga Compact Tabletop 2100 (Kubota, Japón).

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

**Espectrofotómetros:** Nanofotómetro GmbH (Implen, Alemania), Infinite<sup>®</sup> F200 e Infinite<sup>®</sup> 200PRO (TECAN, Suiza).

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

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

**Método de revelado:** ECL<sup>™</sup> y ECL-Advance<sup>™</sup> (GE Healthcare, Reino Unido), ECL Select<sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagent (ThermoFisher Scientific, EEUU), Clarity<sup>™</sup> Western ECL Substrate (BioRad, EEUU), sustratos BCIP y NBT (BioRad, EEUU).

**Microscopio:** microscopio de luz transmitida Leica DM 1000 (Leica Microsystems S.L.U., Alemania), Olympus IX70 (Olympus, Japón).

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

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

**Sistemas de electroforesis y transferencia:** equipo Mini-Protean II y III para electroforesis y sistema de transferencia húmeda (BioRad, EEUU). El marcador de peso molecular es de

ThermoFisher Scientific (EEUU), y la acrilamida, la bisacrilamida y el resto de reactivos para electroforesis fueron suministrados por GE Healthcare (Reino Unido).

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

**Termocicladores:** StepOne Plus Real Time PCR (Applied Biosystem, EEUU), iQ5 Multicolor Real-Time PCR detection System (Bio-Rad, EEUU), Applied Biosystems™ SimpliAmp™ (ThermoFisher Scientific, EEUU).

**Otros productos:** el suero de ternera fetal, el piruvato sódico, la glutamina, y el antibiótico/antimicótico fueron suministrados por Gibco (ThermoFisher Scientific, EEUU). La lipofectamina 2000 fue suministrada por Invitrogen (EEUU). Los transwell fueron suministrados por Corning (EEUU). Las sales, ácidos y bases inorgánicas, solventes orgánicos, detergentes, giemsa, etc., fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Panreac (España), Sigma (EEUU), GE Healthcare (Reino Unido), Merck (Alemania), ThermoFisher Scientific (EEUU) y BioRad (EEUU).

**Tabla IV. Relación de oligonucleótidos empleados en qPCR**

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA</b>
5' MNK1a/b	AGCATCCAGGAAGGCAAGTA
3' MNK1a	GTCCCTTTTCTGGAGCTTGC
3' MNK1b	CTGCTGTTCCCCTGCACCC
5' MNK2a/b	TCCGTGACGCCAAGCAG
3' MNK2a	GGTCTTTGGCACAGCTG
3' MNK2b	GAGGAAGTGA CTGTCCCAC
5 $\beta$ -actina	TGGACTTCGAGCAAGAGATG
3 $\beta$ -actina	GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG
QR short	ACACCAGTCTTCATCCGCTCGTATTTAGACCAGTCTTCATCCGCACCACCCC CACCCCC
QF	TGGGGTGGGCGGGC
R3	GTTGCTCGTATTTAGGGC

Tabla V. Relación de anticuerpos primarios empleados

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	PM (kDa)	TIPO	TÍTULO
$\beta$ -actina	Sigma-Aldrich, EEUU	45	Monoclonal ratón	1/10000
Cleaved PARP (Asp <sup>214</sup> )	Cell Signaling, EEUU	89	Policlonal conejo	1/1000
MCL-1	Cell Signaling EEUU	40	Monoclonal conejo	1/1000
XIAP	BD Biosciences, EEUU	57	Monoclonal ratón	1/1000
MNK1	Cell Signaling, EEUU	50	Policlonal conejo	1/1000
MNK1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	38	Policlonal cabra	1/1000
eIF4E (Ser <sup>209</sup> P)	Abcam, EEUU	25	Monoclonal conejo	1/2000
eIF4E	BD Biosciences, EEUU	25	Monoclonal ratón	1/2000
ZEB-1	Genetex	124	Policlonal conejo	1/1000
E-cadherina	Cell Signaling, EEUU	135	Monoclonal conejo	1/1000
N-Cadherina	Cell Signaling, EEUU	140	Monoclonal conejo	1/1000
Ocludina	Genetex	59	Policlonal conejo	1/1000
Snail	Cell Signaling, EEUU	29	Monoclonal conejo	1/1000

Tabla VI. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.

ANTICUERPO/ESPECIFICIDAD	CASA COMERCIAL	TÍTULO
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 ratón conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000

**Tabla VII. Relación de aptámeros utilizados**

<b>APTÁMERO</b>	<b>SECUENCIA</b>
apM NKQ1	TGGGGTGGGCGGGCGGGG
apM NKQ2	TGGGGTGGGCGGGCGGGGGTGGGGTGGT
apM NKQ3	GGGTGGGGTGGT
apM NKQ4	GGGTGGTATGGCGCGTTGGCCC
P29	GCGGTCGACTTAAATGTCCATCTCAA ACT

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

## MÉTODOS

### 1. CULTIVOS CELULARES

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

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

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

**H460 (ATCC® HTB-177™)**: línea celular epitelial derivada de carcinoma de célula grande de pulmón humano. Verificadas en septiembre de 2022 utilizando el Sistema GenePrint® 10 System.

Las células A549 se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio DMEM (Biowest SAS, Francia) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de piruvato, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina, en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>.

Las células SW900 y H460 se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio RPMI (Lonza, Suiza) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina, en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>.

Las células se sembraron a diferentes densidades según el ensayo a realizar, la placa y la línea celular. Así, se sembraron 1x10<sup>4</sup> células/pocillo o 6x10<sup>3</sup> células/pocillo en las placas de 96 pocillos (p96), 5x10<sup>4</sup> células/pocillo en las placas de 24 pocillos (p24), y 2.5x10<sup>5</sup> células/pocillo o 5x10<sup>5</sup> células/pocillo en las placas de 6 pocillos (p6). Para los ensayos de migración, en los que se utilizaron transwell, la densidad fue de 4x10<sup>4</sup> células/transwell. En los ensayos de formación de colonias, la densidad fue de 1x10<sup>3</sup> células/pocillo en placas de 6 pocillos.

Las células se levantaron de forma química empleando tripsina 1x (Gibco, Reino Unido) lavando previamente con PBS (tampón fosfato salino: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 137 mM y cloruro de potasio 2.7 mM, pH 7.4) (BioMerieux, Francia) para eliminar

restos de suero que pudieran interferir en la actividad de la tripsina. Las células se recogieron resuspendidas en su medio correspondiente, y para su conteo se mezcló una alícuota de 90  $\mu$ l de las células con 10  $\mu$ l de azul tripán (Sigma-Aldrich, EEUU). Aquellas células que excluyeron el colorante se consideraron vivas y los resultados se expresaron como número de células vivas/ml.

Las células se almacenaron a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido, o a  $-80^{\circ}\text{C}$  en congelador, a una densidad entre  $3-5 \times 10^6$  células/ml en suero de ternera fetal con un 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EEUU). Su descongelación se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente, los viales fueron centrifugados durante 5 minutos a 400 g. Las células se resuspendieron en 8 ml de medio correspondiente y se sembraron en frascos de 25  $\text{cm}^2$ .

## **2. TRANSFECCIÓN Y PROCESAMIENTO CELULAR**

### **2.1. Transfección de células**

El tratamiento de las células con los aptámeros y con los siRNAs utilizados en este trabajo se ha realizado con el sistema de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, EEUU). La transfección se llevó a cabo 16-24 horas después de que las células fueran sembradas, y habiendo alcanzado una confluencia del 70-80%, y de un 30-40% para las transfecciones con siRNA.

Los aptámeros se estructuraron previamente a la transfección, disolviéndolos en tampón de aptámeros (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y KCl 5 mM) y calentándolos durante 10 minutos a  $90^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se renaturalizaron en hielo durante 10 minutos.

En la transfección, la lipofectamina se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante ajustando los reactivos según el tipo de placa y la densidad de las células. Primeramente, se diluyeron los aptámeros o los siRNAs y la lipofectamina por separado en opti-MEM (Gibco, EEUU) y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se mezclaron para formar el complejo aptámero-lipofectamina o siRNA-lipofectamina y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se añadieron los complejos sobre las células lavadas previamente dos veces con medio sin antibiótico para evitar las interferencias de éste con la lipofectamina. Las células se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, y tras este tiempo, se retiró el reactivo para añadir medio completo.

## **2.2. Procesamiento celular**

### **2.2.1. Obtención de lisados celulares**

Las células se recogieron mecánicamente en frío en tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, ditioneitol (DTT) 1 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, benzamidina 1mM, molibdato sódico 10 mM,  $\beta$ -glicerofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, cloruro potásico 120 mM, 10  $\mu$ g/ml de antipaina y 1  $\mu$ g/ml de pepstatina A y leupeptina) y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos realizando un lavado para retirar las células muertas. Posteriormente, las células se lisaron con tampón A en presencia de 1% tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EEUU) en proporción 1:2 en volumen, donde el volumen de las células es el que ocupa el sedimento tras la centrifugación. Se centrifugaron 10 minutos a 12000 g y se recogió el sobrenadante (lisado celular) para determinar la concentración de proteínas de la muestra mediante el kit BCA (Pierce™ ThermoFisher Scientific, EEUU), se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **2.2.2. Obtención de RNA**

Para la extracción de RNA total, las células se levantaron químicamente como se ha descrito en el apartado 1 y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 500  $\mu$ l de reactivo NucleoZOL (Macherey-Nagel, Alemania) y se continuó el protocolo siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA total obtenido fue cuantificado en el nanodrop y las muestras se almacenaron a -80°C.

## **3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

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

Se usó el sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas Mini-Protean II y III (BioRad, EEUU) utilizando geles de poliacrilamida del porcentaje correspondiente para cada experimento en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). Los agentes polimerizantes que se usaron fueron N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED) al 0.86% y persulfato amónico a una concentración final de 0.45 mg/ml. La electroforesis se llevó a cabo en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0.1%, y tampón de electroforesis (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, Glicina 192 mM y SDS al 0.1%). Para la preparación de las muestras se utilizó tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 180 mM pH 6.8, 6% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 15% de glicerol, 9% de SDS y 0.025% de azul de bromofenol) y se resolvieron a 200 V durante 1 hora, junto con el marcador de peso molecular (PageRuler

Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, EEUU). Posteriormente, el gel fue transferido a una membrana para detectar las proteínas por inmunodetección (western blot).

### **3.2. Transferencia de proteínas e inmunodetección**

Las proteínas resueltas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Para la transferencia se utilizó un sistema continuo y húmedo en Tris-Glicina/Metanol (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, metanol al 20% y Glicina 192 mM). Las membranas de PDVF se activaron previo uso sumergiéndolas 1 minuto en metanol y, posteriormente, 3 minutos en agua. Sobre el soporte del cátodo se colocó una esponja humedecida, 4 papeles humedecidos, el gel, la membrana activada, 4 papeles humedecidos, otra esponja y el soporte del ánodo hacia donde se desplazan las proteínas. La transferencia de proteínas se realizó a 100 V durante 1 hora.

Cuando terminó la transferencia, la membrana se bloqueó con PBS-Blotto (leche desnatada) al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con Tween 20 (Sigma-Aldrich, EEUU) al 0.05% en PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-Tween 0.1% a 4°C durante toda la noche en agitación.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos PBS-Tween 0.05% y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano y diluidos en PBS-Blotto al 1%, o con fosfatasa alcalina y diluidos en PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se volvieron a realizar lavados en las membranas y se revelaron de dos maneras diferentes en función del anticuerpo utilizado:

- Con fosfatasa alcalina: se añadió azul de nitrotetrazolio/x-fosfato (NBT) 30 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 15 mg/ml, diluidos 1/100 en tampón AP (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100 mM).
- Quimioluminiscencia para los anticuerpos conjugados con peroxidasa. Se utilizaron los kits de revelado ECL™, ECL-Advance™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent y Clarity™ Western ECL Substrate, siguiendo el protocolo del fabricante, y se revelaron con el sistema de adquisición de imagen.

Los tipos de anticuerpos primarios y secundarios, y las diluciones utilizadas se detallan en la **Tabla V** y **Tabla VI**. Para la cuantificación de las bandas se utilizó el software Image Lab (Bio-Rad, EEUU) y los datos se obtuvieron en unidades de densidad óptica/mm<sup>2</sup>.

La membrana se reutilizó para detectar dos proteínas que se encontraban a alturas parecidas 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 llevar a cabo la segunda inmunodetección. Para ello, la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en solución Re-Blot Plus Strong Solution (Millipore, EEUU) según las especificaciones del fabricante.

#### **4. ENSAYOS**

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

Con el fin de medir la viabilidad celular, se determinó la actividad de las enzimas oxidoreductasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H de las células, analizando su capacidad para reducir las sales de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, EEUU) a un producto azul formazán (Denizot *et al.* 1986) bajo diferentes variables experimentales. Las células se sembraron en placas p96 y se transfectaron y/o trataron a las 16-24 horas después de la siembra. Transcurridas 48 horas postransfección, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl/pocillo de MTT a 1 mg/ml en medio de cultivo. Dependiendo de la línea celular, las placas se incubaron 1.5 o 3 horas en incubador a 37°C con ambiente saturado de humedad y 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. Posteriormente, para disolver los cristales, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de lisis (10% SDS y HCl 10mM). Transcurridas 16-24 horas, se determinó la reducción de MTT por espectrofotometría a 540 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad con respecto al control.

##### **4.2. Determinación de la citotoxicidad celular por LDH**

Para medir la muerte celular por necrosis de las células, se realizaron ensayos de citotoxicidad midiendo la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Esta enzima, que se encuentra en el citoplasma de las células, cataliza la reacción de NAD<sup>+</sup> a NADH en presencia de L-lactato, y se libera al medio de cultivo celular cuando se permeabiliza la membrana de las células muertas afectadas por algún agente tóxico. De esta manera, el incremento de la actividad de la enzima en el sobrenadante es proporcional al número de células lisadas.

Las células fueron sembradas en p96 y transfectadas 16-24 horas después. Pasadas 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 indicaciones del fabricante. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y oscuridad, se detuvo la

reacción con HCl 1M y se leyó la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro. Para la cuantificación de la muerte celular por necrosis, también se necesita calcular la actividad de la LDH máxima liberada al medio (LDH<sub>high</sub>), obtenida mediante la lisis de las células con Tritón X-100 al 0.2%; y la actividad LDH liberada al medio por la actividad celular normal (LDH<sub>low</sub>). Estos parámetros, junto con la actividad de la LDH liberada al medio después del tratamiento (LDH<sub>m</sub>), permiten calcular el porcentaje de citotoxicidad celular, expresado como % citotoxicidad =  $((LDH_m - LDH_{low}) / (LDH_{high} - LDH_{low}) \times 100)$ , de cada punto experimental con respecto al control.

### **4.3. Ensayos de formación de colonias**

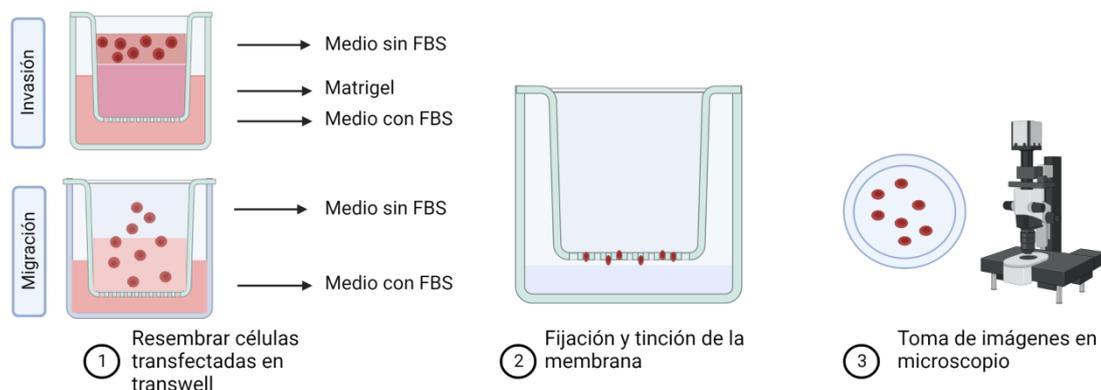
Para realizar estos ensayos, las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo en placas p24, usando 2 pocillos por punto experimental, y transcurridas 16-24 horas, se transfectaron. A las 16-24 horas postransfección, las células fueron recogidas y contadas, y tras realizar las diluciones adecuadas, se resembraron por duplicado en placas p6 a una concentración de  $1 \times 10^3$  células/pocillo. Las placas se dejaron en el incubador con ambiente saturado de humedad a 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> y 37°C durante 5-8 días. Posteriormente, se retiró el medio y las colonias se fijaron 10 minutos a temperatura ambiente con 1 ml/pocillo de metanol (Merck, Alemania), se tiñeron con giemsa (Sigma-Aldrich, EEUU) al 0.02% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con agua para eliminar los restos del colorante. Por último, se dejaron secar a temperatura ambiente y se escanearon con el sistema de adquisición de imagen ChemiDoc<sup>MP</sup> Imaging Systems (BioRad, EEUU). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ y los resultados se expresaron como porcentaje del número de colonias con respecto al control.

### **4.4. Ensayos de migración celular por hendidura o herida (*Wound healing assay*)**

Para la realización de estos ensayos, se sembraron  $5 \times 10^5$  células/pocillo en placas p6 y a las 16-24 horas se transfectaron. A las 24 horas postransfección y con una confluencia entre 90-100%, las células fueron tratadas durante 2 horas con mitomicina C (ThermoFisher Scientific, EEUU) 1 µM con el objetivo de detener su replicación. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de los pocillos y se realizó una herida en cruz con una punta de pipeta estéril. Se lavaron dos veces con PBS para eliminar las células muertas y/o levantadas y, antes de cambiar el PBS por medio de cultivo e incubarlas a 37°C, se tomaron fotografías a tiempo 0 horas en el microscopio (Olympus IX70). Este proceso se repitió a tiempos 24 horas y 48 horas. El área de la herida en los distintos tiempos fue analizada con el software ImageJ. Los resultados se expresaron como incremento de herida abierta con respecto al control.

#### 4.5. Ensayos de migración e invasión por transwells

Estos ensayos se realizaron empleando transwells (Corning, EEUU), que son dispositivos de soporte permeable diseñados para generar un entorno para el cultivo celular lo más parecido posible al estado *in vivo*. Así, los pocillos de la placa quedan separados en compartimentos superior e inferior (**Figura 6**). En los ensayos de migración, las células se sembraron en placas p24 a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y fueron transfectadas tras 16-24 horas. Posteriormente, se privaron de suero durante 18 horas y, transcurrido este tiempo, se recogieron y se contaron. Tras realizar las diluciones adecuadas, se resembraron  $4 \times 10^4$  células/pocillo en el interior del transwell, en 300  $\mu$ l de medio completo sin suero. Los transwell fueron introducidos en pocillos de una placa p24 con 500  $\mu$ l/pocillo de medio completo con FBS al 10%. De esta manera, se tienen las células cuya migración va a ser estudiada en el compartimento superior, y una solución quimio-atrayente en el compartimento inferior (**Figura 6**). Tras 24 horas, se retiraron ambos medios y la membrana del transwell, que contendrá las células que hayan migrado, se fijó sumergiéndolo durante 2 minutos en paraformaldehído al 4%, seguido de 20 minutos en metanol, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se tiñeron 15 minutos con Hoechst 30  $\mu$ M en oscuridad. Por último, los transwell fueron lavados dos veces con PBS y se captaron 5 fotografías de cada membrana del transwell en el microscopio de fluorescencia (Olympus IX70). El número de células se cuantificó con el software ImageJ y los resultados se expresaron como porcentaje del número de células que han migrado con respecto al control.



**Figura 6. Esquema del ensayo de migración/invasión en transwell.** Creada con Biorender.

Para los ensayos de invasión, las células transfectadas con los aptámeros se dejaron 18 horas en medio sin suero. Posteriormente, se recogieron y contaron, para sembrar  $5 \times 10^4$  células en 250  $\mu$ l de medio sin suero, en el transwell en el que previamente se había polimerizado una capa de 100  $\mu$ l de matrigel (Corning, EEUU) a 2.5 mg/ml en medio sin suero. Tras 48 horas de incubación a 37°C, las células que no invadieron junto con el matrigel, se eliminaron con un hisopo estéril humedecido en agua. Las células que sí habían

invadido se fijaron, tiñeron y analizaron como se ha descrito anteriormente para la migración.

#### **4.6. Ensayos de adhesión celular**

En los ensayos de adhesión se sembraron  $5 \times 10^5$  células/pocillo en una placa p6 y tras 16-24 horas fueron transfectadas. Transcurridas 16-24 horas postransfección, las células fueron recogidas, contadas y resembradas en placas p96, previamente tratadas durante 1 hora a 37°C con 10 µg/ml de colágeno de cola de rata tipo I (Sigma-Aldrich, EEUU) en ácido acético 10 mM o BSA 1% en PBS como control negativo, y posteriormente lavadas 2 veces con PBS. Las células se resembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo en un volumen final de 200 µl de medio sin suero, se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente para que se depositaran en el fondo del pocillo y se metieron 1 hora en el incubador a 37°C y con un ambiente saturado de humedad a 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. Después, se retiró el medio, se hicieron 2 lavados con PBS para retirar las células no adheridas y las células adheridas se cuantificaron mediante ensayos de actividad MTT, realizados como se detalla en el apartado 4.1, dejando en este caso 1 hora de incubación entre la adición de MTT y la solución de lisis. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células adheridas con respecto al control.

#### **4.7. Zimograma**

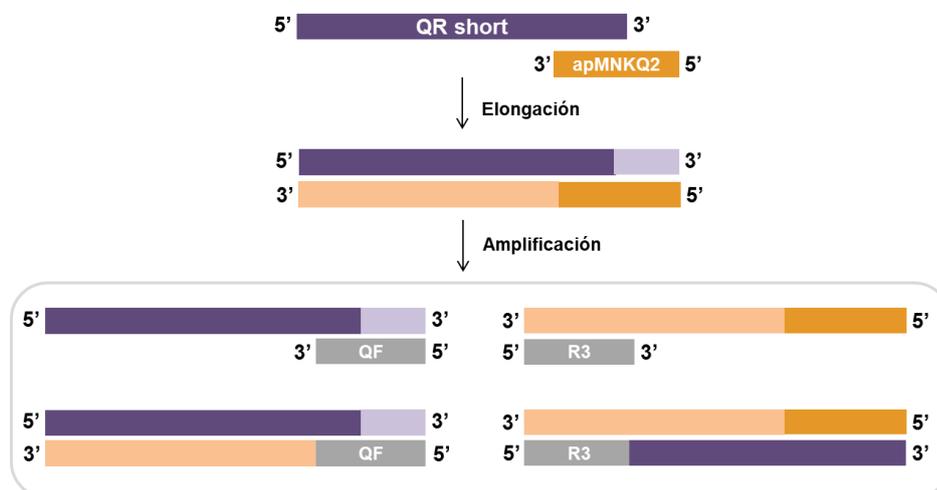
El zimograma se realiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida como se describe en el apartado 3.1, pero en este caso, en condiciones no reductoras y donde el gel separador polimeriza en presencia de gelatina al 10%. Esta técnica permite observar la actividad de proteinasas presentes en la muestra, ya que éstas serán capaces de degradar la gelatina del gel.

Para estos ensayos, las células fueron transfectadas, y tras 4 horas, se retiró el suero del medio de cultivo. A las 18 horas, se recogió el medio y se concentró utilizando filtros para centrifugación EMD Amicon™ Ultra de 3 KDa (Merck, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se prepararon en tampón de carga de electroforesis sin β-mercaptoetanol (Tris-HCl 180 mM pH 6.8, 15% de glicerol, 9% de SDS y 0.025% de azul de bromofenol) y se resolvieron durante 1 hora a 200 V. Después, el gel se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con Tritón X-100 al 2.5% en agua. Transcurrido este tiempo, se retiró el Tritón X-100 y se incubó con tampón de revelado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 200 mM y Tween 0.02%) durante 30 minutos, tras los cuales, se retiró y se volvió a añadir el mismo tampón de revelado para incubarlo a 37°C durante 16 horas. Por último, el gel fue teñido con azul de Coomassie (Sigma-Aldrich,

EEUU) 0.2%, ácido acético 10% y metanol 40% durante 30 minutos a 37°C y posteriormente desteñido con una solución de ácido acético al 7% y etanol al 20%. Se capturó una imagen para cuantificar las bandas con el software Image Lab (Bio-Rad, EEUU). La ausencia de colorante azul indica la degradación de la gelatina por la proteinasa.

#### 4.8. Cuantificación intracelular de apMNKQ2

Con el fin de detectar el aptámero, de tan solo 29 nucleótidos de longitud, dentro de las células, se diseñó un método que utiliza el aptámero como cebador sobre un oligonucleótido molde denominado QR short, de 59 nucleótidos de longitud. El producto de esta reacción genera un molde de 76 nucleótidos que es amplificado posteriormente con los cebadores adecuados (R3 y QF) (**Figura 7**). En ausencia de apMNKQ2 no se produce amplificación, por lo que la cantidad de producto es proporcional a la cantidad de apMNKQ2 presente en la muestra.



**Figura 7.** Esquema del método de cuantificación de apMNKQ2.

Para ello, las células fueron transfectadas con apMNKQ2 y tras 4, 24 y 48 horas, se lavaron con PBS y se lisaron en 1 ml de agua durante 5 minutos. Posteriormente, se calentaron 10 minutos a 90°C y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió para realizar la PCR a tiempo real y el sedimento celular se resuspendió en 10 µl de NaOH 0.1 M para determinar la concentración de proteínas mediante BCA. La qPCR se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus™ con el kit AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix – Vazyme (Quimigen, España). Los oligonucleótidos utilizados para cuantificar apMNKQ2 fueron QR short, QF y R3 (**Tabla IV**). El volumen final de la reacción fue de 10 µl, y contiene: Mix FastGene® IC Green, los oligonucleótidos a una concentración final de 1 pmol para QR short y 100 nM para QF y R3, 1 µl de molde, Rox dye I y agua hasta completar el volumen final de reacción. El protocolo de PCR utilizado se muestra en la **Tabla VIII**.

**Tabla VIII. Programa de PCR a tiempo real utilizado en la cuantificación intracelular de apMKNQ2.**

95°C	5 minutos	1 ciclo
60°C	1 minuto	1 ciclo
95°C	10 segundos	35 ciclos
60°C	30 segundos	
60°C	1 minuto	Desnaturalización
95°C	15 segundos	

Para cuantificar las cantidades de aptámero intracelular, se hizo una recta patrón con cantidades conocidas de aptámero entre 100 fmol y 100 amol. Los resultados se expresaron en fmoles por µg de proteína.

#### 4.9. Análisis de los niveles de RNA mensajero

La cuantificación de los niveles de mRNAs se llevó a cabo usando los RNAs obtenidos como se detalla en el apartado 2.2.2. Primero, se obtuvieron los DNA copia (cDNAs) con el kit SensiFAST™ cDNA synthesis kit (Bioline, Reino Unido) siguiendo las indicaciones del fabricante. Después, se realizó una PCR a tiempo real en un termociclador StepOnePlus™ con el kit AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix – Vazyme (Quimigen, España). Los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla IV**. Como control se midieron los niveles de mRNA de la β-actina. El volumen final de la reacción fue de 10 µl, y contiene: Mix FastGene® IC Green, 1 µl de cDNA, las parejas de oligonucleótidos a una concentración final de 0.2 µM, Rox dye I y agua hasta completar el volumen final. El protocolo de PCR utilizado se muestra en la **Tabla IX**.

**Tabla IX. Programa de PCR a tiempo real utilizado en el análisis de los niveles de mRNA**

95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	10 segundos	40 ciclos
60°C	30 segundos	
95°C	15 segundos	Desnaturalización
60°C	1 minuto	
95°C	15 segundos	

Para cuantificar los niveles de los mRNA de las MNKs tras la transfección con los aptámeros, se calculó el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  siguiendo la siguiente fórmula, utilizando como gen de referencia  $\beta$ -actina:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{en células transfectadas con apMNKQ2/aptámero control (p29)}} - \Delta Ct_{\text{en células control}}$$

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

Para comparar los niveles de mRNA de las MNKs entre líneas celulares, se calculó el valor de  $2^{-\Delta Ct}$ .

## 5. MODELOS ANIMALES

### 5.1. Ensayos de eficacia en ratones con xenoinjertos de células tumorales de pulmón

Para los ensayos *in vivo*, ratones hembra desnudos ATHYM-Foxn1<sup>nu/nu\*</sup> (Janvier Labs, Francia) de 9 semanas de vida se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales, y todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales para el bienestar de los animales de experimentación aprobadas por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI 60-1057-A068 y CEI 103-1958-A337) y de la Comunidad de Madrid (PROEX 294/19) y de acuerdo con las directrices de Conducta Ética en el Cuidado y Uso de los Animales, tal y como se recoge en los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales, elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS). Los ratones fueron alojados de acuerdo con las siguientes directrices: ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, sin acceso durante el ciclo de oscuridad; temperaturas de 18-23°C con una humedad del 40-60%; una dieta estándar con un contenido de grasa que oscilaba entre el 4-11%; el agua esterilizada era accesible en todo momento; para el manejo, los ratones fueron manipulados cuidadosamente, y lo menos posible; se minimizaron los ruidos, las vibraciones y los olores para evitar el estrés y la disminución de la cría; y el enriquecimiento se utilizó siempre según las directrices de la instalación para ayudar a aliviar el estrés.

En estos ensayos,  $8 \times 10^6$  de células A549 (libres de Micoplasma, comprobadas mediante el kit Mycoplasma Gel Detection de Biotools, España) resuspendidas en 100  $\mu$ l de Matrigel (Corning®, EEUU) se inyectaron por vía subcutánea en los flancos dorsales de los animales. El crecimiento de los xenoinjertos fue monitorizado con un calibre manual hasta alcanzar un tamaño aproximado de 4 x 4 mm, momento en el que fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de 5 animales: un grupo control, al que se le administró tampón de aptámeros, y dos grupos a los que se les administró apMNKQ2 a 10 mg/kg y 25 mg/kg. El aptámero se

administró en inyecciones intraperitoneales diariamente. El tamaño de los tumores se midió con un calibre manual cada 3 días durante 25 días. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó siguiendo la siguiente fórmula:  $\% \text{ TGI} = [1 - (Tt/T0 / Ct/C0)] \times 100$ , donde Tt y T0 corresponden al volumen del tumor del grupo tratado a tiempo final e inicial del tratamiento, respectivamente; y Ct y C0, corresponden al volumen del tumor del grupo control a tiempo final e inicial del tratamiento, respectivamente.

El sacrificio de los animales se realizó 24 horas después de la última inyección, y se llevó a cabo mediante la liberación paulatina de CO<sub>2</sub> en cámara. Transcurrido este proceso, los tumores fueron pesados y congelados hasta su uso. Para la extracción de RNA, fracción en la que se encuentran los aptámeros, los tumores se cortaron y pesaron para obtener muestras de entre 50-80 mg. Posteriormente, se homogeneizaron en 500 µl de reactivo NucleoZOL (Macherey-Nagel, Alemania) y se siguieron las indicaciones del fabricante. El RNA total obtenido fue cuantificado en el nanodrop y las muestras se almacenaron a -80°C. Para la obtención de proteína, los tumores se cortaron, pesaron, y se homogeneizaron en tampón A en presencia de 1% tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EEUU) en proporción 1:2 peso:volumen. Se centrifugaron 10 minutos a 12000 g y se procedió como se detalla en el apartado 2.2.1.

## **5.2. Cuantificación de apMNKQ2 en tumores**

Para determinar la presencia de apMNKQ2 en los tumores, una alícuota de 10 µl del RNA obtenido se trató con 2 mg/ml RNAsa I (Invitrogen, EEUU) durante 30 minutos a 37°C y seguidamente se incubó a 65°C durante 10 minutos para parar la reacción de la enzima. Posteriormente, se utilizó 1 µl de esta alícuota como molde en la PCR a tiempo real que se realizó como se detalla en el apartado 4.8. Los resultados se expresaron en pmol de apMNKQ2 por µg de tejido.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos analizados están calculados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas entre la media de los grupos experimentales con respecto a la media de los grupos control se han determinado mediante el análisis estadístico de la “t” de Student para el análisis de dos grupos, y el análisis de la varianza (ANOVA) para más de dos grupos. Cuando este último resultó significativo, se realizó posteriormente el Test de Tukey’s. La significación estadística se ha expresado como: \*,  $p < 0.05$  (significativo); \*\*,  $p < 0.01$  (muy significativo) o \*\*\*,  $p < 0.001$  (altamente significativo). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático GraphPad Prism® versión 8.0.

# **RESULTADOS**



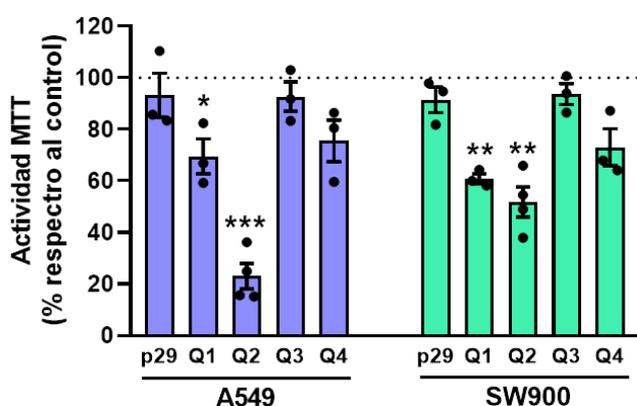
## RESULTADOS

### 1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL APTÁMERO EN LA TUMORIGÉNESIS EN LÍNEAS CELULARES

#### 1.1. Efecto de los aptámeros sobre la proliferación de líneas tumorales de pulmón

Como se ha descrito anteriormente, a partir del aptámero apMNK2FT seleccionado en nuestro laboratorio frente a la proteína MNK1, se obtuvieron cuatro secuencias distintas en base a la formación de G-quadruplex. De estos cuatro aptámeros, apMNKQ2 fue el que mayor efecto tuvo sobre la actividad MTT en líneas tumorales de mama, por lo que posteriormente se realizó su caracterización funcional mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* en cáncer de mama, obteniendo resultados prometedores (Pinto-Díez *et al.* 2022).

Con el objetivo de estudiar el efecto de estos cuatro aptámeros en cáncer de pulmón, se utilizaron las líneas celulares A549 y SW900, que representan adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de célula escamosa, respectivamente. Las células fueron transfectadas con los aptámeros apMNKQ1, apMNKQ2, apMNKQ3 y apMNKQ4 a 250 nM, y se midió su actividad MTT a las 48 horas. En paralelo se utilizó el aptámero inespecífico p29 como control, que se transfectó a la misma concentración. Como se puede observar en la **Figura 8**, apMNKQ2 es el que produce un mayor efecto sobre la actividad MTT en ambas líneas, reduciendo la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa un 77% para A549 y un 51% para SW900.



**Figura 8. Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT de las líneas A549 y SW900.** Las células se sembraron en p96 a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/pocillo para las A549 y  $10^4$  células/pocillo para las SW900. Tras 16-24 horas se transfectaron con los aptámeros p29, apMNKQ1, apMNKQ2, apMNKQ3 y apMNKQ4 a 250 nM. Transcurridas 48 horas, se realizaron los ensayos de actividad MTT. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  respecto al control).

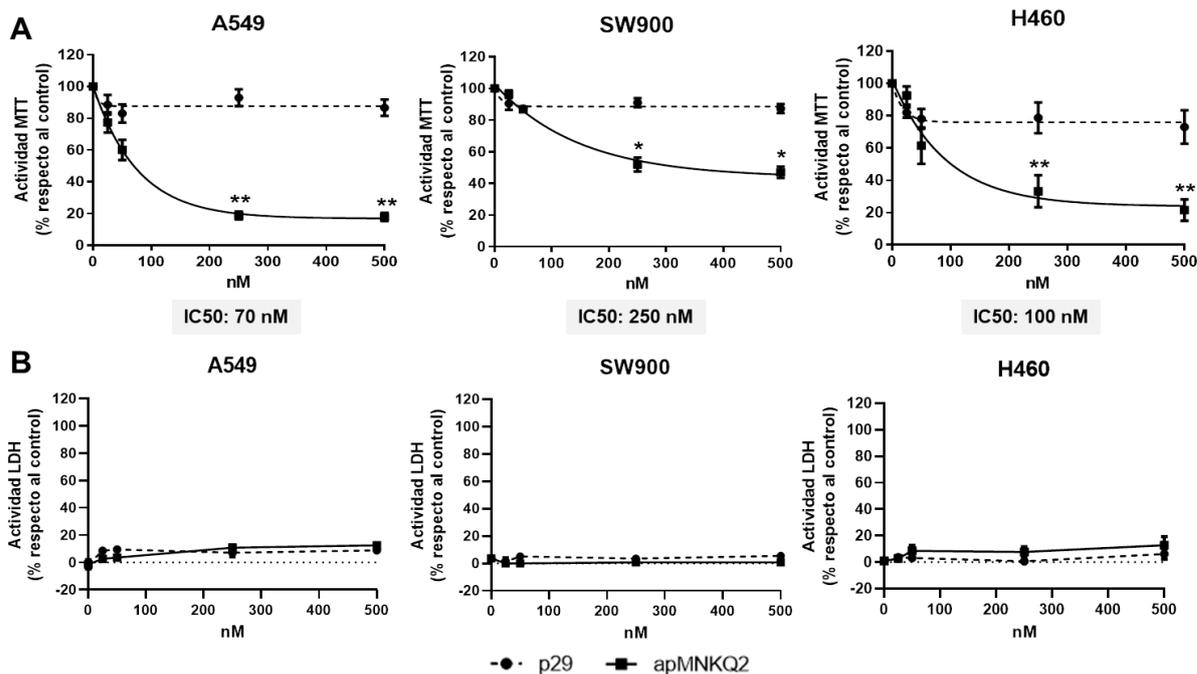
En ambas líneas, apMKNKQ1 disminuye la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa (30% en las células A549 y 40% en las células SW900) aunque su efecto es menor que el producido por apMKNKQ2. Por otra parte, apMKNKQ4 disminuye la viabilidad, aunque no de forma significativa, y apMKNKQ3 tiene un efecto similar al obtenido con el aptámero control inespecífico. A la vista de estos resultados, elegimos el aptámero apMKNKQ2 para su caracterización funcional en líneas tumorales de pulmón.

### **1.2. Efecto de apMKNKQ2 sobre la proliferación y la necrosis en células tumorales de pulmón**

Para determinar el potencial uso terapéutico de apMKNKQ2 en cáncer de pulmón, se seleccionaron como modelos tres líneas tumorales de pulmón: A549, SW900 y H460, representativas de los tres subtipos de NSCLC: adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa y carcinoma de célula grande, respectivamente.

En primer lugar, para analizar con más detalle el efecto del aptámero apMKNKQ2 sobre la viabilidad celular, las células fueron transfectadas con concentraciones crecientes de aptámero, desde 0 hasta 500 nM, y se midió la actividad MTT a las 48 horas. Asimismo, el aptámero inespecífico p29 se transfectó en paralelo a las mismas concentraciones. Con la finalidad de estudiar la posible muerte celular por necrosis, simultáneamente se midió la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de las células transfectadas, antes de añadir el reactivo MTT.

Como se puede observar en la **Figura 9A**, el aptámero apMKNKQ2 disminuyó la actividad MTT en las tres líneas, de forma dependiente de la concentración, permitiendo calcular la IC50, siendo las células A549 las más sensibles. El aptámero control p29 produjo un ligero efecto, aunque significativamente menor que la disminución producida por apMKNKQ2. Como se muestra en la **Figura 9B**, la disminución de la viabilidad celular no parece estar ocasionada por necrosis, ya que la citotoxicidad fue nula o prácticamente nula a todas las concentraciones estudiadas.

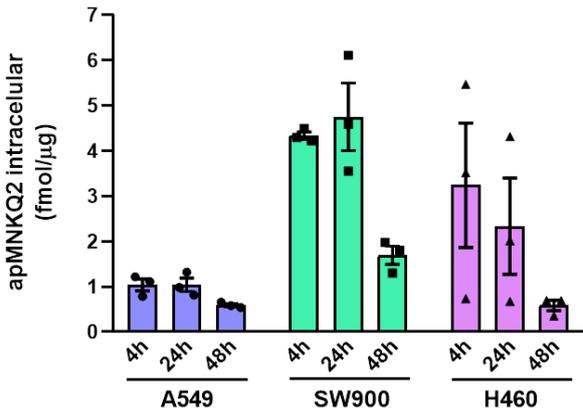


**Figura 9. Efecto del aptámero apMKNKQ2 sobre la actividad MTT y LDH de las líneas celulares de pulmón.** Las tres líneas se sembraron en una p96 a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/pocillo para las A549 y las H460, y de  $1 \times 10^4$  células/pocillo para las SW900. Tras 16-24 horas se transfectaron con apMKNKQ2 y p29 a 0, 25, 50, 250 y 500 nM, y a las 48 horas se realizaron los ensayos de actividad MTT (**A**), con el cálculo de la concentración inhibitoria del 50% indicada en el margen inferior de las gráficas MTT, y (**B**) LDH. Las gráficas representan las medias  $\pm$  SEM de 6 y 3 experimentos independientes (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto al aptámero control p29).

A partir de este punto, se fijó una concentración de trabajo para el resto de los experimentos que fue la IC50 de cada línea, es decir, 70 nM para las A549, 250 nM para SW900, y 100 nM para las H460.

### 1.3. Análisis de la vida media de apMKNKQ2 en las líneas tumorales de pulmón

Una de las características más importantes a la hora de utilizar aptámeros frente a dianas intracelulares, es conocer su vida media en el interior de la célula, que puede estar afectada por su naturaleza molecular (DNA o RNA) o por su estructura. Para estudiar la estabilidad intracelular de apMKNKQ2, las células fueron transfectadas con la IC50 de apMKNKQ2 correspondiente a cada línea celular. Después de 4, 24 y 48 horas, las células fueron procesadas para cuantificar los niveles de aptámero intracelular mediante qPCR, como se indica en el apartado 4.8 de Materiales y Métodos. Los resultados se expresaron en fmol de aptámero por  $\mu\text{g}$  de proteína, para corregir la cantidad de aptámero con respecto a la cantidad de células procesadas. La **Figura 10** muestra que apMKNKQ2 entra a las células de forma eficiente a la concentración de trabajo establecida y que, además, es estable en éstas al menos durante 48 horas.

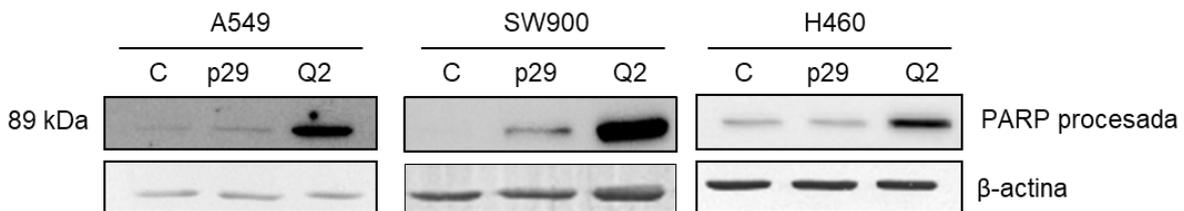


**Figura 10. Estudio de la vida media de apMNKQ2 en líneas tumorales de pulmón.** Las células se sembraron en p6 a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo y a las 16-24 horas se transfectaron con 70 nM, 250 nM y 100 nM para las células A549, SW900 y H460, respectivamente. Transcurridas 4, 24 y 48 horas, las células fueron lisadas y apMNKQ2 cuantificado por qPCR, cuyos valores fueron interpolados en la recta patrón del aptámero. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

#### 1.4. Efecto de apMNKQ2 sobre la apoptosis celular en células tumorales de pulmón

Para determinar si la disminución en la viabilidad celular es consecuencia de que apMNKQ2 promueve la apoptosis celular, se analizó la actividad de la caspasa 3, una proteasa que se activa en apoptosis. Para ello, se realizó la inmunodetección de la enzima Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP), la cual es procesada por la caspasa 3 en etapas tardías de la apoptosis, produciéndose un fragmento específico de 89 kDa.

En la **Figura 11** se observa la detección por western blot del fragmento producido por la proteólisis de PARP en las células A549, SW900 y H460, 24 horas después de haber sido transfectadas con los aptámeros apMNKQ2 y p29. Los resultados mostraron un aumento en la intensidad de la banda correspondiente a PARP procesada, evidenciando el efecto apoptótico de apMNKQ2 sobre las tres líneas celulares.

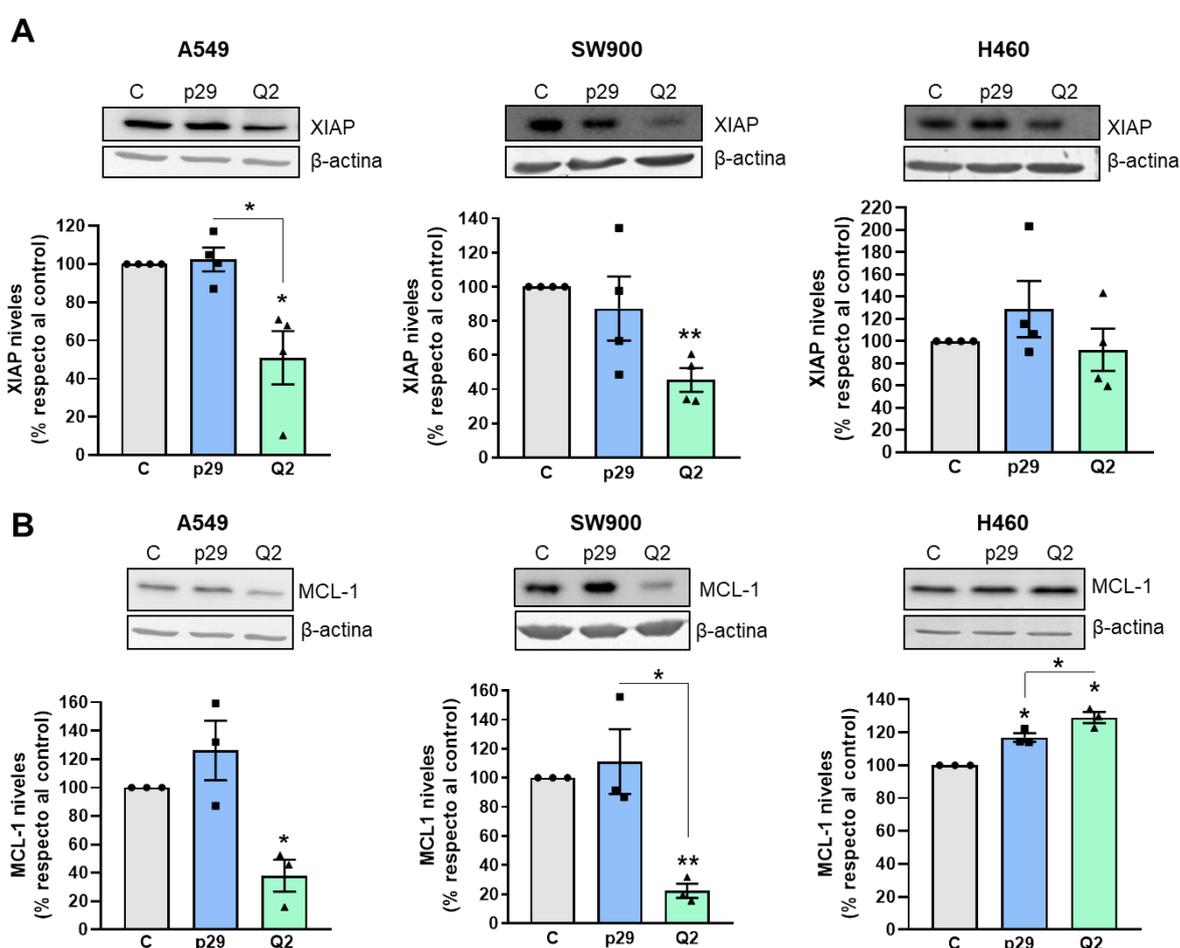


**Figura 11. Efecto de apMNKQ2 sobre la actividad de la caspasa 3 a través del sustrato PARP en líneas tumorales de pulmón.** Inmunodetección (SDS-PAGE 7.5%) de PARP procesada para detectar la actividad proteolítica de la caspasa 3 tras la transfección de las líneas A549, SW900 y H460 con apMNKQ2 y el aptámero control p29. La actividad de la caspasa 3 genera un fragmento específico de 89 kDa. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Además, para confirmar que apMNKQ2 es capaz de inducir apoptosis en las líneas celulares, se analizaron los niveles de las proteínas antiapoptóticas XIAP y MCL-1. XIAP inhibe la apoptosis uniéndose a la caspasa iniciadora 9 y a las caspasas ejecutoras 3 y 7,

promoviendo la supervivencia celular durante la progresión tumoral (Holcik *et al.* 2001). MCL-1 pertenece a la familia de proteínas Bcl-2, y sus altos niveles están relacionados con la resistencia a terapias que inducen apoptosis (Mohammad *et al.* 2015). Ambas proteínas están reguladas por MNK1 (Wendel *et al.* 2007; Evans *et al.* 2018; Pinto-Díez *et al.* 2018).

En la **Figura 12** se muestran los niveles de XIAP (**Figura 12A**) y MCL-1 (**Figura 12B**) de las células A549, SW900 y H460, 24 horas después de haber sido transfectadas con los aptámeros. Como se puede observar, apMNKQ2 redujo de forma significativa los niveles tanto de XIAP como de MCL-1 en las células A549 y SW900. Estos resultados confirmarían el efecto proapoptótico del aptámero. En cambio, en la línea H460, apMNKQ2 no produce efecto sobre la expresión de XIAP, y, además, aumenta los niveles de MCL-1 de forma significativa.

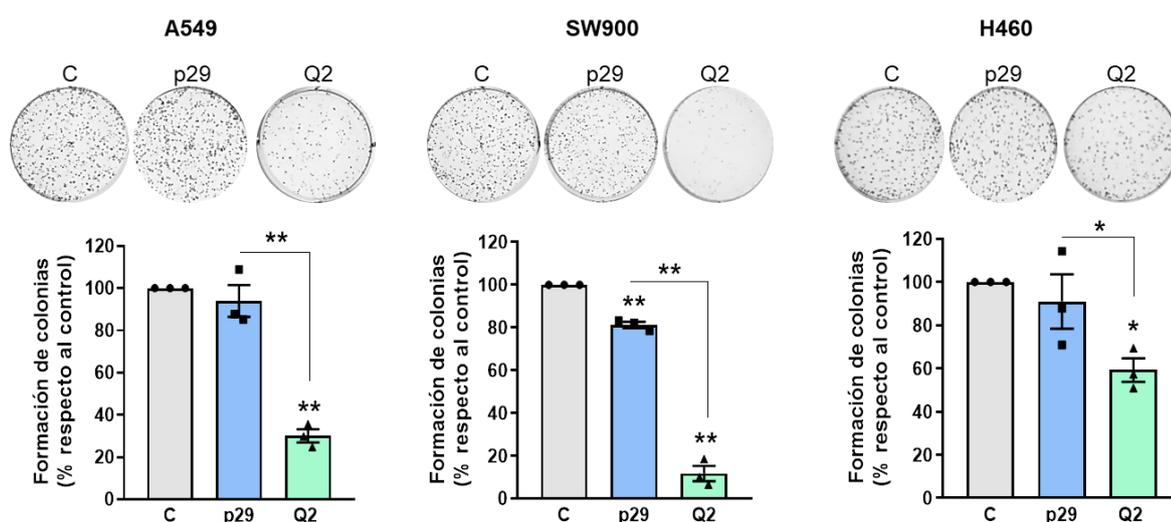


**Figura 12. Efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de XIAP y MCL-1.** Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) a las 24 horas tras la transfección de las células con los aptámeros de **(A)** XIAP y **(B)** MCL-1 en células A549, SW900 y H460. Los valores obtenidos se han normalizado con respecto a los de  $\beta$ -actina, utilizada como control de carga. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ).

### 1.5. Actividad anticlonogénica de apMKNKQ2 en células tumorales de pulmón

Los ensayos clonogénicos miden la capacidad de una sola célula para dividirse y formar una colonia de al menos 50 células (Puck *et al.* 1956). Aunque ésta sea una cualidad necesaria para la integridad y el funcionamiento de los tejidos normales, se intenta erradicar en las células tumorales para evitar recidivas (Franken *et al.* 2006). Esta característica se produce debido a la pérdida de la inhibición por contacto, y es utilizada en este tipo de ensayos para estudiar los efectos de agentes citotóxicos o de terapias antitumorales (Rafehi *et al.* 2011). Así, se podría analizar el efecto del aptámero apMKNKQ2 estudiando si la célula conserva su capacidad de dividirse de forma ilimitada tras el tratamiento.

Las células fueron transfectadas con apMKNKQ2 y el aptámero control p29, y recogidas a las 24 horas para ser resembradas a una densidad de 1000 células/pocillo, tal y como se detalla en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. Las colonias se dejaron crecer durante 6 días en el caso de las A549, 8 días en las SW900, y 5 días en las H460.



**Figura 13. Efecto de apMKNKQ2 sobre la capacidad de formación de colonias de las células.** Las líneas A549, SW900 y H460 se sembraron a densidad  $5 \times 10^4$  células/pocillo en p24 y a las 24 horas se transfectaron con las concentraciones de trabajo establecidas previamente. Tras 24 horas, se recogieron y se resembraron en p6 a una densidad de 1000 células/pocillo para las tres líneas. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ).

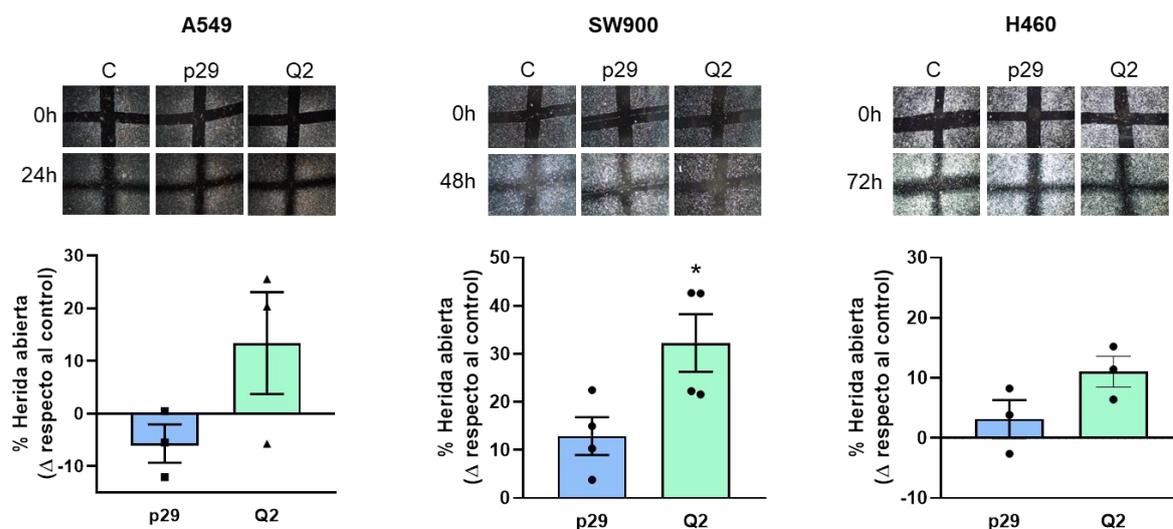
Como muestra la **Figura 13**, el aptámero apMKNKQ2 disminuye la capacidad clonogénica de las tres líneas celulares. Esta disminución fue estadísticamente significativa para las tres líneas con respecto al control sin tratar y con respecto al aptámero control, y con distinta eficacia según la línea celular. El aptámero control produce un ligero efecto, aunque significativamente menor que la disminución producida por apMKNKQ2.

## 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMKNKQ2 SOBRE LA ACTIVIDAD METASTÁSICA DE LAS CÉLULAS DE PULMÓN

### 2.1. Efecto de apMKNKQ2 en la migración, invasión y adhesión de las células tumorales de pulmón

El efecto de apMKNKQ2 sobre la migración de las células se estudió primero mediante el ensayo de cierre de herida o *Wound healing* como se detalla en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos. Las células fueron transfectadas con los aptámeros y, tras 24 horas, tratadas con mitomicina 1  $\mu$ M durante 2 horas, tras las cuales se realizó una hendidura. La evolución de los cultivos se realizó a los tiempos 0 y 24 horas para las A549, 0 y 48 horas para las SW900 y 0 y 72 horas para las H460.

Como se observa en la **Figura 14**, apMKNKQ2 retrasa el cierre de la herida en las tres líneas, aumentando de forma significativa el porcentaje de herida abierta en las células SW900.

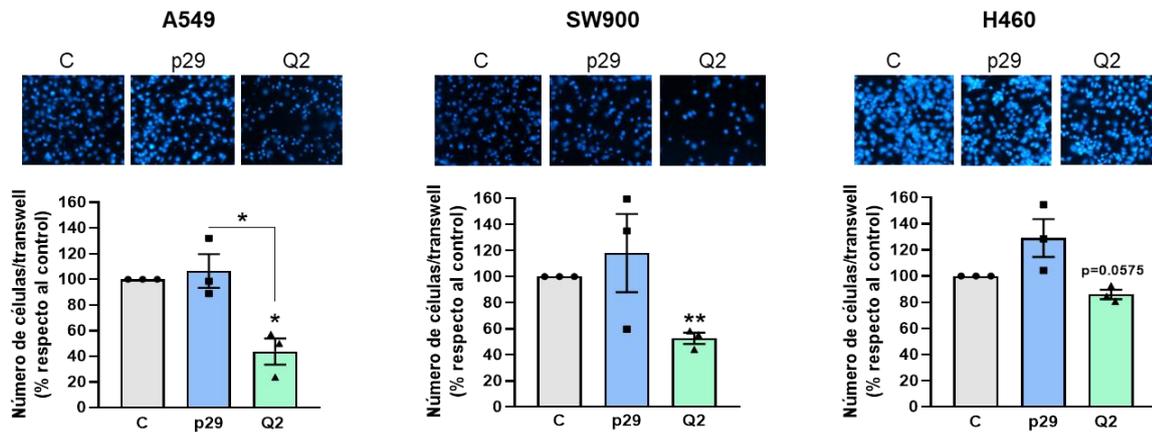


**Figura 14. Efecto del aptámero apMKNKQ2 en la migración de las líneas celulares tumorales de pulmón mediante ensayos *Wound healing*.** Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo en p6 y se transfectaron con los aptámeros a las 24 horas. Transcurridas 16-24 horas se trataron con mitomicina 1  $\mu$ M durante 2 horas, tras las cuales se les realizó una herida. Se tomaron fotografías a los tiempos 0, 24, 48 o 72 horas en función de la línea celular. El área de la herida se cuantificó con ImageJ y los datos fueron expresados como el incremento de herida abierta respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$ ).

Debido a la dificultad para obtener una herida casi cerrada en las líneas A549 y H460 sin tratar, se estudió la migración utilizando transwells, tal y como se detalla en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos. Tras 16-24 horas de haber sido transfectadas con los aptámeros y privadas de suero, las células son recogidas y sembradas en los transwells en medio sin suero. El transwell se sumerge en medio completo con suero, previamente añadido al pocillo

de la placa, de manera que las células migren del transwell al pocillo por quimioatracción, atravesando la membrana del transwell. Después de 24 horas, las células que hayan atravesado dicha membrana se fijan y se tiñen con Hoechst para su posterior cuantificación por microscopía de fluorescencia (**Figura 6**).

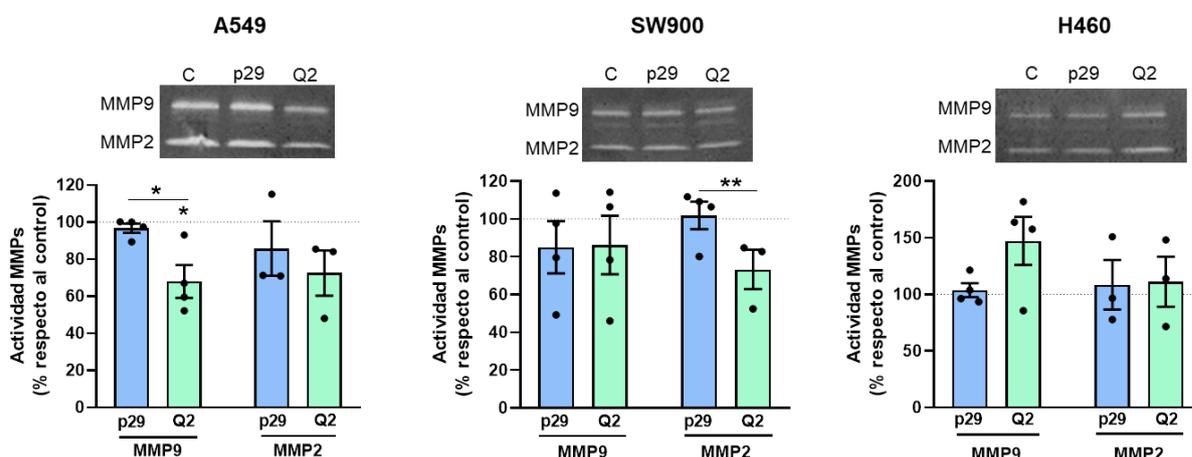
Como se muestra en la **Figura 15**, el aptámero apMKNKQ2 reduce la migración en las tres líneas celulares, aunque de forma estadísticamente significativa para las células A549 y SW900. Asimismo, también se realizaron ensayos de invasión con transwell, a los que previamente se añadió matrigel, una preparación de membrana basal solubilizada extraída de sarcoma de ratón. Las células se sembraron sobre el matrigel con la intención de que migren hacia el medio con suero, degradando la matriz. No se pudieron detectar células al teñir la membrana de los transwells, lo que sugiere que ninguna de las tres líneas tiene capacidad de invasión o, al menos, no es detectada mediante esta técnica.



**Figura 15. Estudio del efecto de apMKNKQ2 sobre la migración de las líneas tumorales de pulmón mediante ensayos con transwell.** Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo en placas p24 y se transfectoraron con los aptámeros a las 24 horas. A las 6 horas, se privaron de suero, y tras 24 horas se recogieron y resembraron en transwells a  $4 \times 10^4$  células/pocillo en medio sin suero. A las 24 horas, las células que atravesaron la membrana se tiñeron con Hoechst para ser cuantificadas por microscopía de fluorescencia. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ )

Las metaloproteinasas (MMPs) son proteínas encargadas de degradar la matriz extracelular favoreciendo el proceso de migración e invasión celular. El estudio del efecto de apMKNKQ2 en la actividad de las MMPs, se realizó mediante zimogramas, técnica en la cual se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con gelatina en condiciones no desnaturizantes, para impedir la pérdida de actividad enzimática. De esta manera, se pone de manifiesto la actividad de las metaloproteinasas, analizando la degradación de la gelatina, que actúa de sustrato para las enzimas.

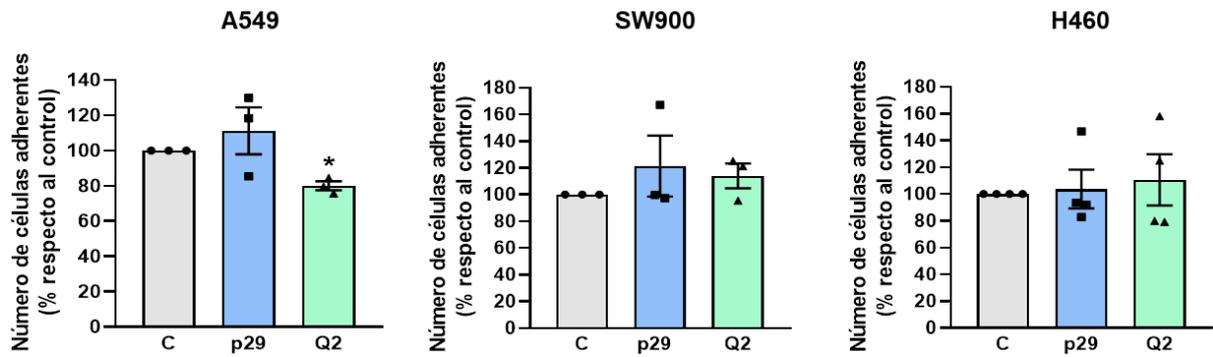
Como se muestra en la **Figura 16**, apMNKQ2 es capaz de disminuir la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 en las A549 y SW900, siendo estadísticamente significativa la disminución que se observa en la actividad de la MMP9 en la línea A549, y en la de la MMP2 en la línea SW900. Sin embargo, en las células H460, apMNKQ2 parece aumentar la actividad de la MMP9 y no tener efecto sobre la MMP2.



**Figura 16. Efecto de apMNKQ2 sobre la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9.** Los sobrenadantes de las células A549, SW900 y H460 previamente transfectadas con los aptámeros, se recogieron a las 24 horas postransfección y se estudiaron en un gel de poliácridamida con gelatina, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ).

El proceso de adhesión a la matriz extracelular es un paso clave cuando las células tumorales migran y se adhieren en otras localizaciones durante la metástasis. Uno de los componentes de la matriz extracelular es el colágeno, el cual ha sido utilizado en estos ensayos para estudiar si apMNKQ2 afecta a la capacidad de adhesión celular.

Para ello, 24 horas después de haber sido transfectadas, las células se recogieron y resembraron en placas p96 incubadas previamente con 10  $\mu\text{g/ml}$  de colágeno tipo I, tal y como se detalla en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. Posteriormente, se realizaron ensayos MTT (apartado 4.1 de Materiales y Métodos) para cuantificar el número de células adheridas. Como muestra la **Figura 17**, apMNKQ2 disminuyó la capacidad de adhesión de forma estadísticamente significativa en las células A549, mientras que no se observó efecto en las líneas SW900 y H460.

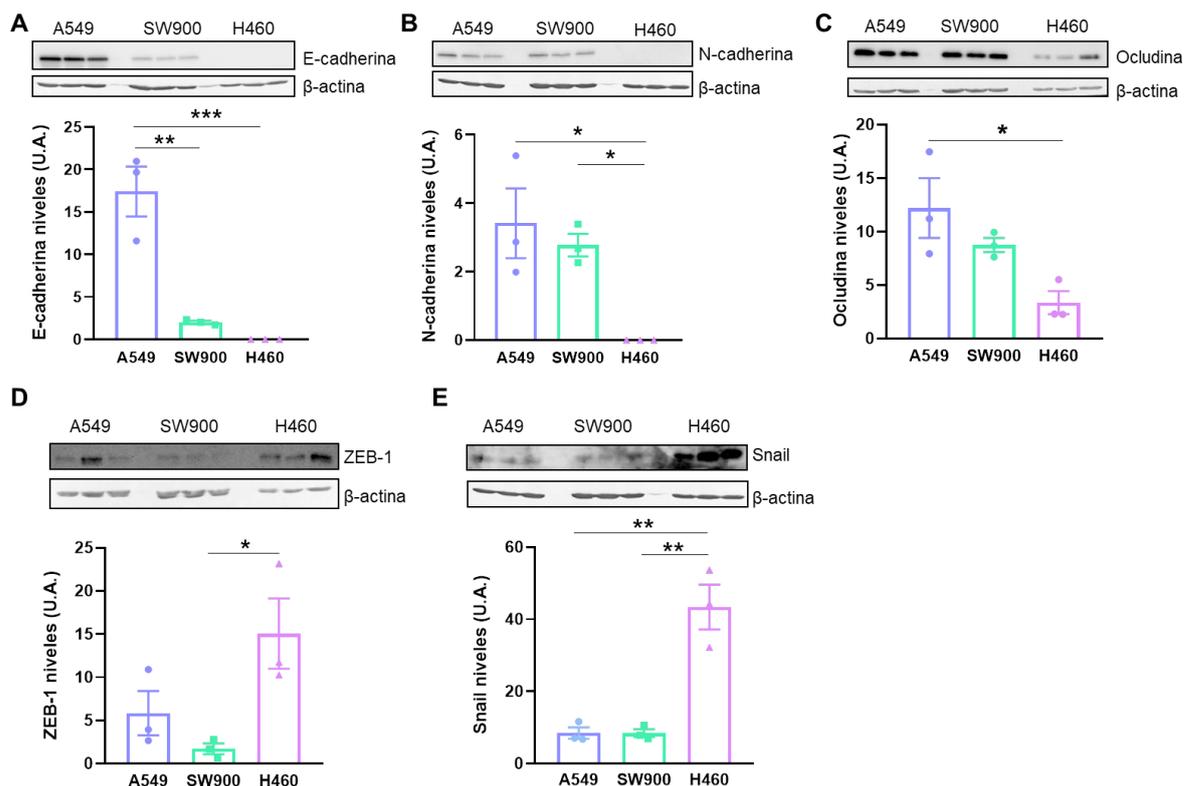


**Figura 17. Efecto de apMNKQ2 sobre la adhesión celular en líneas tumorales de pulmón.** Transcurridas 24 horas después de la transfección, las células fueron recogidas y sembradas a  $3 \times 10^4$  células/pocillo en p96 tratadas previamente con colágeno tipo I a  $10 \mu\text{g/ml}$ . Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos MTT para cuantificar las células adheridas. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$ , respecto al control).

## 2.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la transición epitelio-mesénquima (TEM)

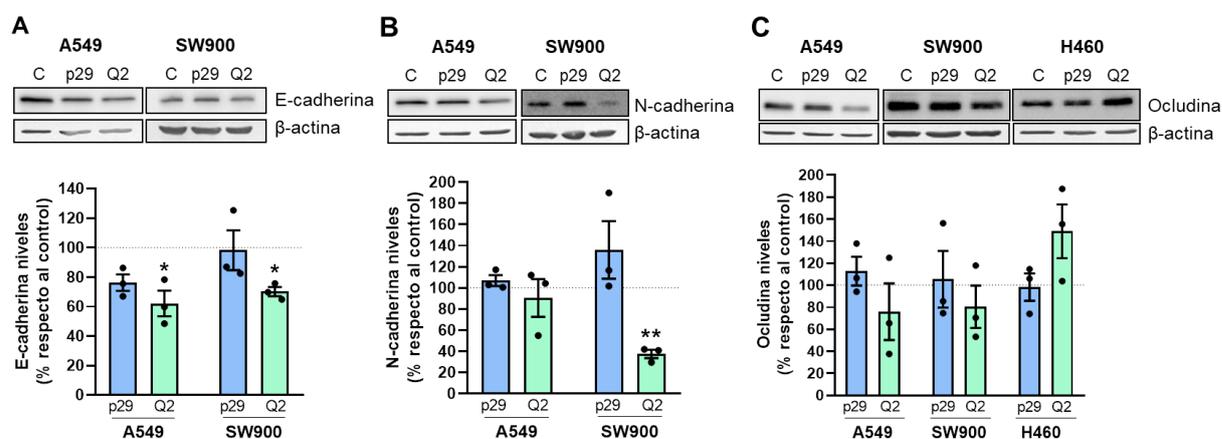
La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso en el cual las células tumorales pierden los marcadores epiteliales y se facilita su migración a órganos distales. En este trabajo se ha analizado la expresión de marcadores de distintos estadios y de factores de transcripción implicados en el proceso. Como marcadores epiteliales se estudiaron la E-cadherina, proteína de adhesión de células epiteliales supresora de tumores, cuya pérdida de expresión ocurre durante la metástasis (Na *et al.* 2020); y la ocludina, proteína implicada en las uniones estrechas entre células, cuya expresión disminuye en las etapas iniciales de la TEM (Nowak *et al.* 2021). Como marcador mesenquimal se analizó la N-cadherina, proteína transmembrana implicada en adhesión celular y que promueve la migración e invasión de las células (Nowak *et al.* 2021). En la TEM también están implicados diversos factores de transcripción que favorecen que las células adquieran capacidad metastásica. Algunos de ellos, como ZEB-1 o Snail, fueron analizados en este trabajo.

En la **Figura 18**, se puede observar que solo se pudieron detectar niveles de E-cadherina y N-cadherina en las líneas A549 y SW900, siendo las células A549 las que presentan de forma significativa niveles mayores de E-cadherina, sin embargo, no se observan diferencias de expresión de N-cadherina entre ambas líneas. Asimismo, las tres líneas expresan ocludina, aunque las células H460 en menor medida. En cuanto a los factores de transcripción (**Figuras 18D y E**) las células H460 presentan de forma significativa niveles mayores de ambos, indicando un fenotipo mesenquimal.



**Figura 18. Expresión de marcadores y factores de transcripción de TEM en líneas tumorales de pulmón.** Inmunodetección de (A) E-cadherina, (B) N-cadherina, (C) Occludina, (D) ZEB-1 y (E) Snail. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a los de  $\beta$ -actina. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

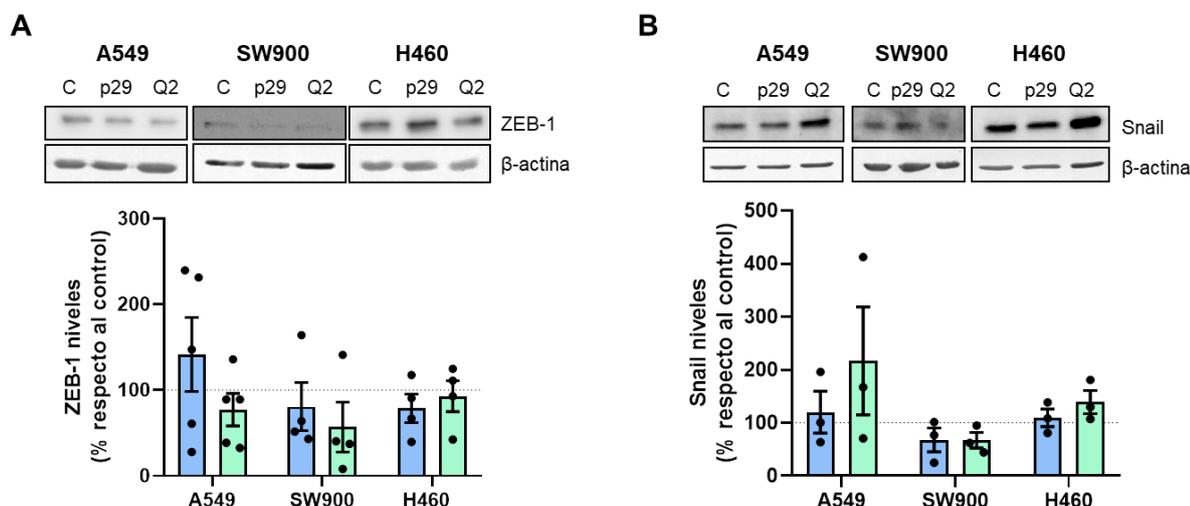
Una vez caracterizada la expresión de estos marcadores de TEM en las líneas celulares utilizadas, se quiso ver si apMNKQ2 era capaz de revertir el estado mesenquimal al estado epitelial. Como muestra la **Figura 19**, apMNKQ2 es capaz de disminuir de forma estadísticamente significativa los niveles de N-cadherina en las células SW900 y de aumentar los niveles de ocludina en la línea H460. Sin embargo, el aptámero disminuyó los niveles del marcador epitelial E-cadherina en las células A549 y SW900.



**Figura 19. Efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de expresión de marcadores de TEM en las líneas tumorales de pulmón.** Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) de (A) E-cadherina, (B) N-cadherina y (C) ocludina en células A549 y SW900 a las 24 horas postransfección de las células con

los aptámeros. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , respecto al control).

En cuanto al efecto de apMNKQ2 sobre los factores de transcripción, la expresión de ZEB-1 tiende a disminuir en las células A549 y SW900 (**Figura 20A**) tras la transfección con el aptámero, aunque no es una diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, apMNKQ2 no parece afectar la expresión de ZEB-1 en las células H460. Como se observa en la **Figura 20B**, el aptámero no produce efecto sobre Snail en las líneas A549 y H460, pero sí es capaz de disminuir los niveles en las células SW900, aunque de la misma manera que el aptámero control p29 y no de una forma estadísticamente significativa.



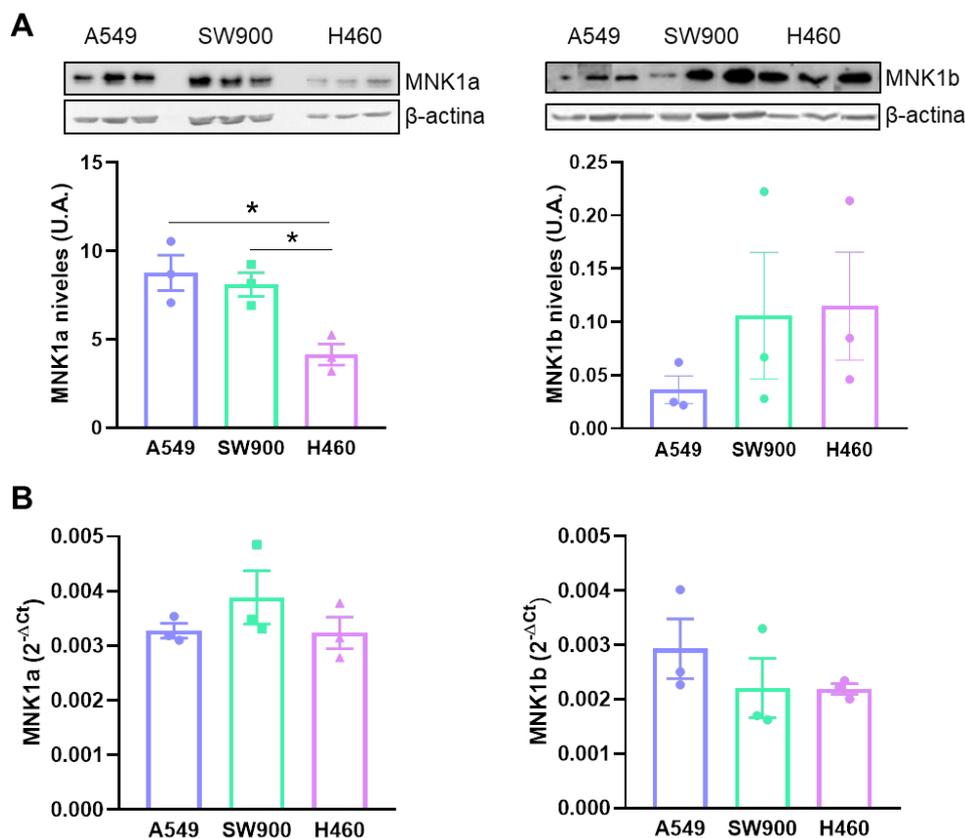
**Figura 20. Efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de expresión de factores de transcripción de TEM en las líneas tumorales de pulmón. (A)** Inmunodetección (SDS-PAGE 7.5%) de ZEB-1 en las líneas A549, SW900 y H460 tras 24 horas después de la transfección con los aptámeros. **(B)** Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) de Snail en las líneas A549, SW900 y H460, 24 horas posttransfección de las células con los aptámeros. Los valores se normalizaron con respecto a los de  $\beta$ -actina. Los datos se han normalizado con respecto al control. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes.

### 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE apMNKQ2 SOBRE LAS MNKs

#### 3.1. Expresión de MNK1a, MNK1b y eIF4E en líneas tumorales de pulmón

Primero, se determinaron los niveles de proteína y mRNA de MNK1a y MNK1b, así como los niveles y el estado de fosforilación de su sustrato eIF4E en las líneas utilizadas en este trabajo. Para ello, se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por western blot usando anticuerpos específicos, tal y como se detalla en los apartados 2.2.1 y 3 de Materiales y Métodos.

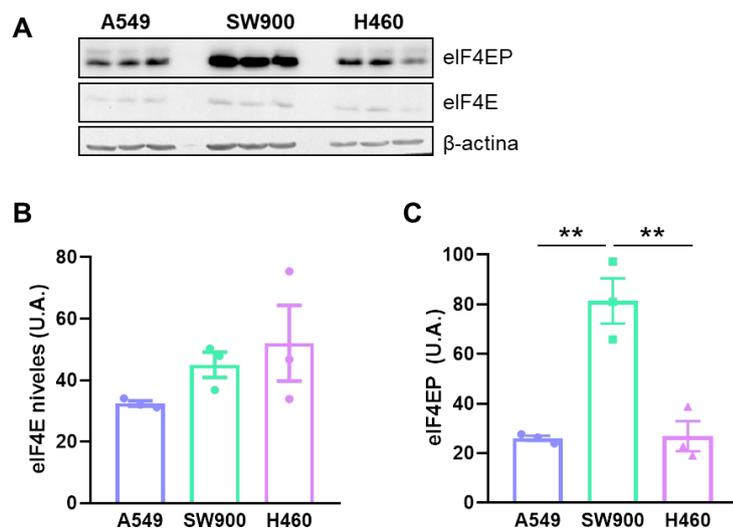
Los resultados obtenidos tras la cuantificación de las bandas, muestran que las células A549 y SW900 presentan niveles de MNK1a significativamente más altos que las células H460, mientras que las células A549 son las que presentan menores niveles de MNK1b (Figura 21A).



**Figura 21. Niveles de las MNKs en líneas tumorales de pulmón. (A)** Inmunodetección mediante SDS-PAGE al 12% de los niveles de MNK1a y MNK1b en las líneas A549, SW900 y H460. Los valores obtenidos tras la cuantificación fueron corregidos con los de  $\beta$ -actina. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. **(B)** Cuantificación de los niveles de mRNA de MNK1a/b mediante qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se representan como  $2^{-\Delta Ct}$  y representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ).

Para determinar si los cambios en la expresión de las proteínas se deben a diferencias en los niveles de mRNA, se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de dichos RNAs mensajeros mediante qPCR como se describe en el apartado 4.9 de Materiales y Métodos. Como se puede observar en la **Figura 21B**, las diferencias en la expresión de MNK1a y MNK1b no se deben a cambios en los niveles de mRNA.

Posteriormente, se estudiaron en las tres líneas los niveles y el estado de fosforilación de eIF4E, el sustrato mejor caracterizado de las MNKs (**Figura 22**). Los resultados mostraron que las células A549 son las que presentan menores niveles de eIF4E. Por otro lado, las células SW900 presentan una fosforilación de eIF4E significativamente más alta, que no parece mostrar correlación con los niveles de las MNKs.



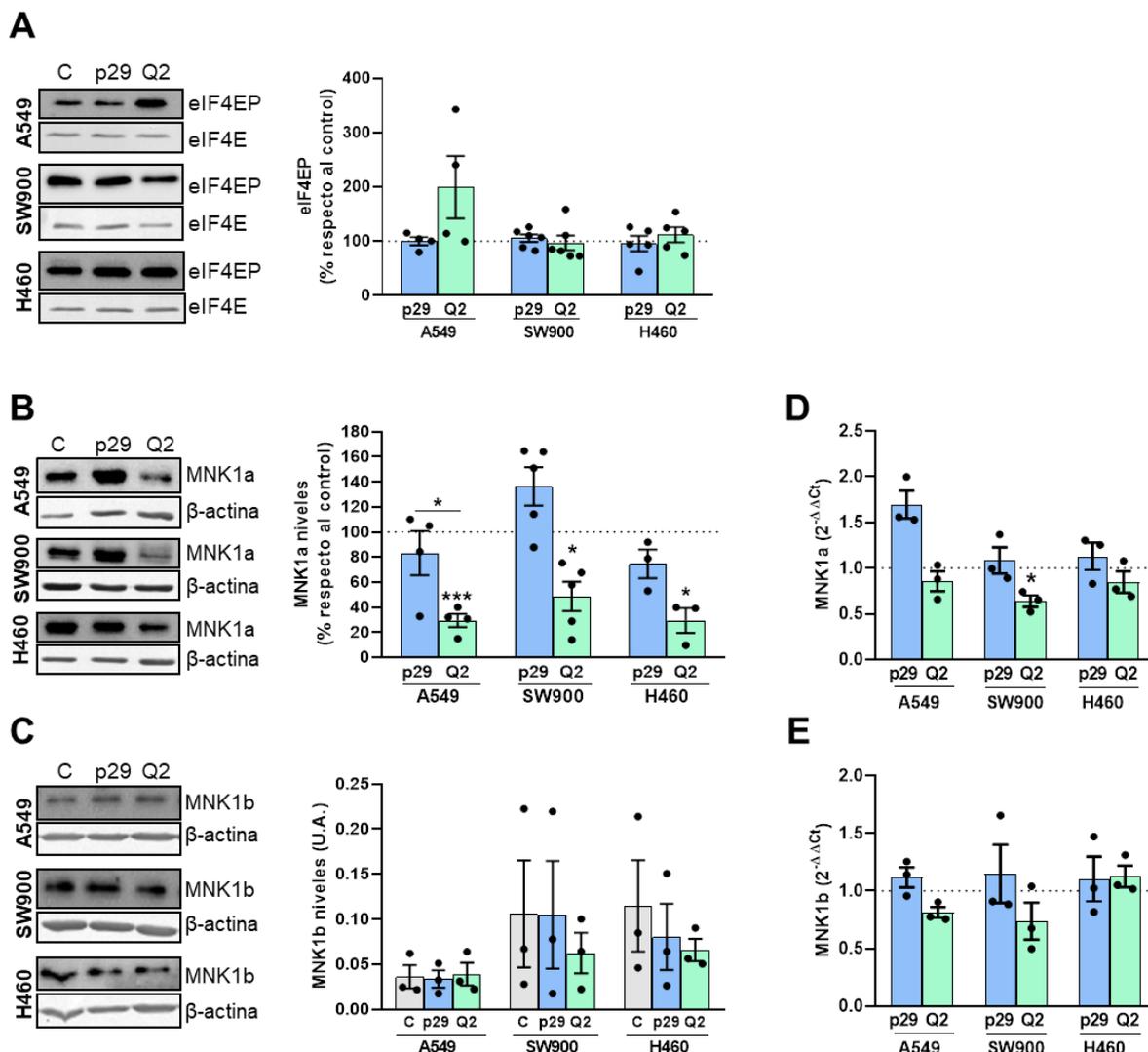
**Figura 22. Fosforilación de eIF4E en las líneas celulares de cáncer de pulmón.** Se emplearon lisados celulares de las líneas A549, SW900 y H460. **(A)** Niveles de eIF4EP y eIF4E detectados mediante SDS-PAGE al 12% e inmunodetección. **(B)** Cuantificación de los niveles de eIF4E respecto a los de la β-actina. **(C)** Cuantificación de los niveles de eIF4EP respecto a los de eIF4E. Las gráficas representa la media ± SEM de 3 experimentos independientes (\*\*p<0.01).

### 3.2. Efecto de apMNKQ2 sobre las isoformas de MNK1 y la fosforilación de eIF4E

Dado que apMNKQ2 es capaz de reducir la fosforilación de eIF4E y la expresión de MNK1a/b en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Pinto-Díez *et al.* 2022), se analizaron los niveles de ambas isoformas y la fosforilación de eIF4E tras el tratamiento con el aptámero en las líneas tumorales de pulmón.

Como se puede observar en la **Figura 23A**, apMNKQ2 produce un aumento en la fosforilación de eIF4E en las células A549. Además, el aptámero es capaz de disminuir de forma significativa los niveles de MNK1a en las tres líneas celulares (**Figura 23B**), mientras que no parece afectar los niveles de MNK1b, aunque parece que se observa una tendencia a la baja en las células SW900 y H460 (**Figura 23C**).

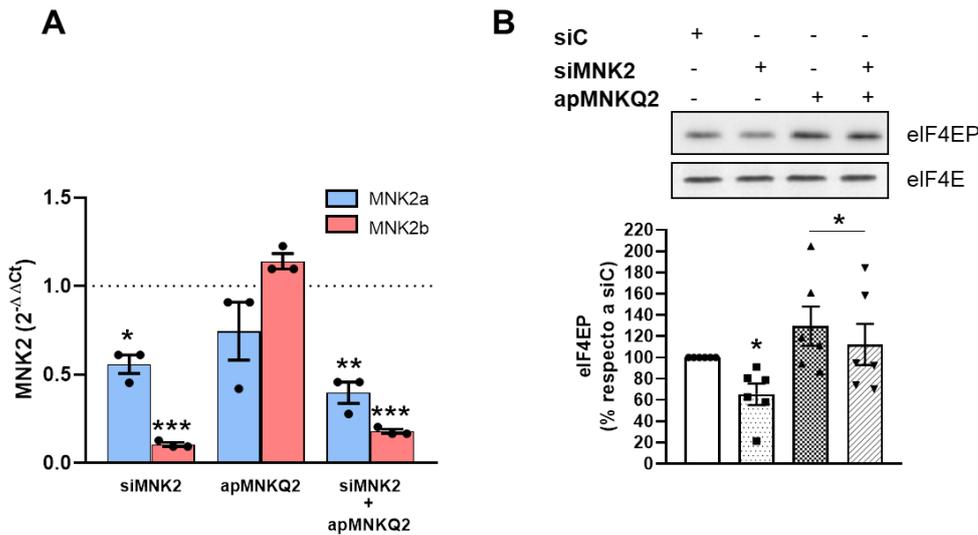
ApMNKQ2 no parece afectar a los niveles de mRNA de ambas isoformas de MNK1, salvo en el caso de las células SW900, donde la reducción en los niveles de MNK1a producida por el aptámero, podría estar relacionada con una bajada en sus niveles de mRNA (**Figura 23D**).



**Figura 23. Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de 4E y las isoformas de MNK1 en líneas tumorales de pulmón.** Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) de **(A)** eIF4EP, **(B)** MNK1a y **(C)** MNK1b tras 24 horas postransfección con los aptámeros en las células A549, SW900 y H460. Cuantificación de los niveles de mRNA de **(D)** MNK1a y **(E)** MNK1b 24 horas tras la transfección de las células A549, SW900 y H460 con los aptámeros. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-5 experimentos independientes (\* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

Con el objetivo de conocer si MNK2 es la responsable del aumento en la fosforilación de eIF4E que se produce en las células A549 tras el tratamiento con apMNKQ2, se utilizó un siRNA para silenciar MNK2 y analizar el papel de esta quinasa en la fosforilación de eIF4E. Para ello, las células fueron transfectadas con el siRNA de MNK2 (siMNK2) o un siRNA inespecífico como control (siC), y tras 24 horas, se transfectaron con apMNKQ2. Después de 24 horas, las células se recogieron y se obtuvieron los lisados celulares, que fueron analizados por western blot, tal y como se detalla en el apartado 3 de Materiales y Métodos, para estudiar el estado de fosforilación de eIF4E.

El silenciamiento de MNK2 se confirmó mediante qPCR, donde se observó que se silencian ambas isoformas de la proteína, aunque en mayor medida la isoforma MNK2b (**Figura 24A**). Cuando se analizan los niveles de fosforilación de eIF4E en las células transfectadas con siMNK2, se observa que disminuyen de forma estadísticamente significativa con respecto al control (35%). Además, la fosforilación de eIF4E es parcialmente revertida cuando las células son co-transfectadas con siMNK2 y apMNKQ2 (**Figura 24B**). Estos resultados indican que MNK2 podría estar implicada en la fosforilación de eIF4E en las células A549.

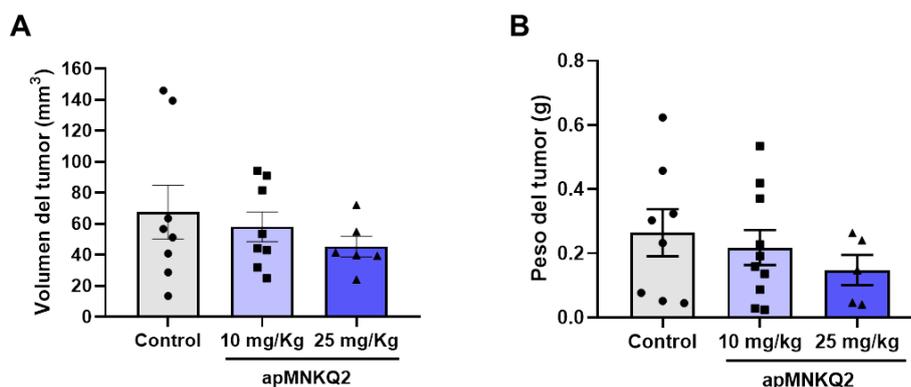


**Figura 24. Efecto del silenciamiento de MNK2 sobre la fosforilación de eIF4E en las células A549.** Las células se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/pocillo en placas p6 y tras 16-24 horas se transfectaron con 75 pmol/pocillo de siC y siMNK2. Tras 24 horas, se transfectaron con apMNKQ2 a 70 nM y, pasadas 24 horas, las células se recogieron para obtener RNA y proteína, que se utilizaron en qPCR y western blot. **(A)** Cuantificación de los niveles de mRNA de MNK2 tras su silenciamiento con un siRNA. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a los de siC. **(B)** Cuantificación de eIF4EP tras el silenciamiento de MNK2 con un siRNA. Los valores obtenidos se normalizaron con los de eIF4E. Los resultados se expresan normalizados con respecto a siC. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3-6 experimentos independientes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4. ESTUDIO DE LA EFICACIA IN VIVO DE apMNKQ2 EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA PULMONAR

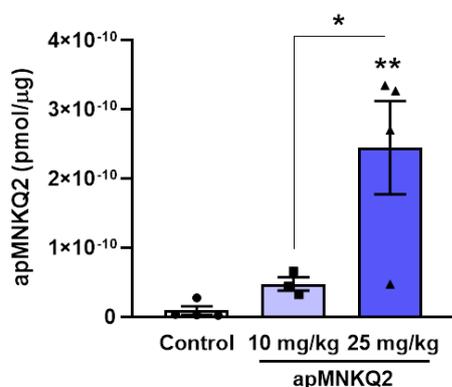
Los ensayos de eficacia *in vivo* se llevaron a cabo en ratones inmunodeprimidos Foxn1<sup>nu/nu</sup> a los que se inoculó en los flancos dorsales por vía subcutánea la línea celular A549 para generar los tumores, a una concentración de  $8 \times 10^6$  células/flanco. Los ratones se repartieron de forma aleatoria en tres grupos de 5 animales. A dos de los grupos se les administró por vía intraperitoneal apMNKQ2 a 10 mg/kg y a 25 mg/kg en tampón de aptámeros, cinco veces por semana. Al grupo control se le inyectó el mismo volumen de

tampón de aptámeros. Como parámetros de seguimiento se midieron el peso de los animales y el volumen del tumor cada tres días, y el peso tumoral tras el sacrificio de los animales a los 25 días del inicio del tratamiento. Los resultados indican que apMNKQ2 disminuye tanto el volumen del tumor, con una inhibición del crecimiento tumoral del 18.2% y del 28.5% para las dosis de 10 mg/kg y 25 mg/kg, respectivamente (**Figura 25A**), como el peso (**Figura 25B**) de los tumores de los ratones tratados, de una manera dependiente de la dosis, aunque no de forma estadísticamente significativa.



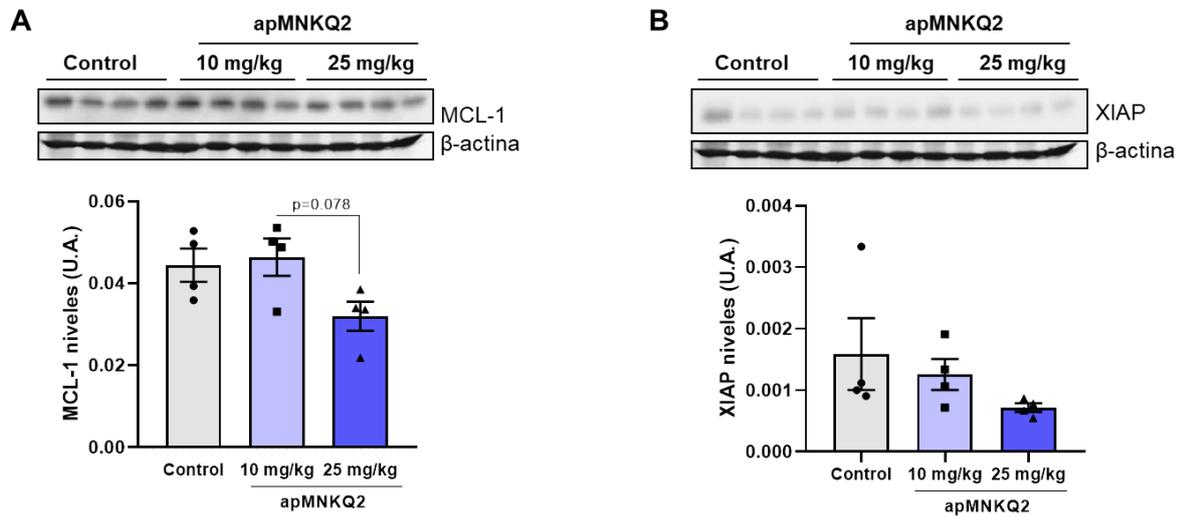
**Figura 25. Eficacia *in vivo* de apMNKQ2 en un modelo de ratón con xenoinjerto subcutáneo de células A549. (A)** Volumen de los tumores en la última medida antes del sacrificio de los animales. **(B)** Peso de los tumores de células A549 tratadas con apMNKQ2 respecto al control tras el sacrificio de los animales. Las gráficas representan la media  $\pm$  el máximo y el mínimo de 4-10 tumores.

Para comprobar la presencia del aptámero en los tumores, se llevó a cabo una PCR a tiempo real para cuantificar apMNKQ2, como se detalla en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. La **Figura 26** muestra la presencia de apMNKQ2 en los tumores de ratones tratados a ambas dosis, lo que confirma por una parte que el aptámero ha alcanzado el tumor tras su administración a través de la vía intraperitoneal y, por otra, que apMNKQ2 sigue manteniendo su integridad en los tumores al menos 24 horas después del sacrificio de los animales.



**Figura 26. Cantidad de apMNKQ2 detectada en los tumores de células A549.** La fracción de RNA, que contiene el aptámero, se trató con RNAsa y se utilizó como molde para la cuantificación de apMNKQ2 mediante qPCR. La gráfica representa la media  $\pm$  el máximo y el mínimo de 4-5 tumores (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ).

Por último, se analizaron los niveles de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y XIAP en los tumores procedentes de los animales controles y tratados con las dos dosis de apMKNKQ2. Como se puede observar en la **Figura 27**, el aptámero es capaz de reducir la expresión de MCL-1 cuando se administra a 25 mg/kg, y de reducir los niveles de XIAP, aunque no de forma estadísticamente significativa.



**Figura 27. Efecto de apMKNKQ2 en la expresión de proteínas antiapoptóticas de xenoinjertos tumorales de células A549.** Inmunodetección de **(A)** MCL-1 y **(B)** XIAP. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los de  $\beta$ -actina. Las gráficas representan la media  $\pm$  el máximo y el mínimo de 4 tumores.

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón, considerado uno de los más invasivos y uno de los más rápidos en producir metástasis, es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Según la Sociedad Española de Oncología Médica, el cáncer de pulmón se mantiene como el tercer tumor más frecuentemente diagnosticado en 2022, por detrás del cáncer colorrectal y de mama, y es el que más mortalidad genera (18% del total de muertes por cáncer), por lo que la tasa de supervivencia a los 5 años sigue siendo muy baja (Li *et al.* 2022). Hasta la fecha, se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas como quimioterapia, terapia molecular dirigida o inmunoterapia (Alexander *et al.* 2020), que han ayudado a mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. A pesar de estas mejoras en los tratamientos, el pronóstico para estos pacientes sigue siendo malo, por lo que los nuevos enfoques terapéuticos son necesarios para mejorar el pronóstico de esta enfermedad.

Como se ha descrito anteriormente, las MNKs están implicadas en diferentes tipos de cáncer (Pinto-Díez *et al.* 2020). Estudios recientes han demostrado una asociación significativa entre la sobreexpresión de MNK1 y una supervivencia global reducida para los pacientes de NSCLC (Wen *et al.* 2016). Es más, esta sobreexpresión de MNK1 serviría como biomarcador de mal pronóstico para estos pacientes, lo que sugiere que bloquear la vía MNK/eIF4E mediante la inhibición de MNK y la fosforilación de eIF4E es una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de los pacientes con NSCLC. De hecho, la degradación de MNK1 impide la fosforilación de eIF4E y en consecuencia inhibe el crecimiento celular, colonización, invasión y migración e induce apoptosis en células de cáncer de mama (Ramalingam *et al.* 2014).

En este trabajo se ha pretendido estudiar el potencial antitumoral del aptámero apMNKQ2, previamente seleccionado en nuestro laboratorio frente a la proteína MNK1 (García-Recio *et al.* 2016), y posteriormente validado como agente antitumoral en cáncer de mama (Pinto-Díez *et al.* 2022), como herramienta terapéutica en cáncer de pulmón. Para ello, se han llevado a cabo ensayos funcionales en líneas tumorales de pulmón, en los que se han evaluado los efectos antitumorigénicos y antimetastásicos del aptámero; y ensayos de eficacia en un modelo de cáncer de pulmón en ratones.

Las líneas celulares utilizadas en este estudio son A549, SW900 y H460, representativas de los 3 tipos de cáncer de pulmón no microcítico: adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa y carcinoma de célula grande, respectivamente. Las tres líneas presentan una

mutación activadora del gen *KRAS*. Además, las células A549 tienen mutado el gen de la serina/treonina quinasa 11 (*STK11*), las células SW900 poseen una mutación que inactiva el gen supresor de tumores *TP53*, y las células H460 presentan mutaciones en *STK11* y *PIK3CA*, gen de la proteína p110 $\alpha$ , subunidad catalítica de la proteína PI3K (Blanco *et al.* 2009; Korrodi-Gregório *et al.* 2016).

De las cuatro secuencias obtenidas a partir del aptámero apMNK2FT, apMNKQ2 fue la que produjo mayor disminución en la actividad MTT de las dos líneas celulares empleadas (**Figura 8**), al igual que ocurre con las líneas celulares de mama (Pinto-Díez *et al.* 2022), por ello fue seleccionado para continuar con el estudio. Sin embargo, el aptámero apMNKQ1 también redujo de forma significativa la viabilidad celular en ambas líneas tumorales de pulmón, por lo que sería interesante evaluar su posible uso como agente antitumoral en estudios futuros.

Las dianas intracelulares son difíciles de alcanzar en células vivas, por lo que uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es la entrada del aptámero en las células, así como su estabilidad y vida media en el interior celular. En este trabajo, la internalización del aptámero en las células se ha llevado a cabo mediante el uso de liposomas. La cuantificación intracelular del aptámero (**Figura 10**) se realizó a diferentes tiempos: cuando se retira el aptámero tras la transfección (4 horas), cuando se realizan los ensayos (24 horas), y cuando se determina la viabilidad y toxicidad celular (48 horas). El ensayo se realizó con las concentraciones de trabajo empleadas durante todo el estudio, por lo que no se puede obtener una comparativa de la entrada del aptámero entre las líneas celulares. Aun así, los resultados muestran la entrada eficiente de apMNKQ2 en las tres líneas celulares a la concentración de trabajo empleada y, además, demuestran que el aptámero permanece en el interior de las células en el momento de los ensayos. El hecho de que apMNKQ2 sea estable al menos durante 48 horas en el interior de las células, se podría considerar una ventaja de cara a su aplicación en clínica a la hora de espaciar las dosis en el tiempo, disminuyendo el número de inyecciones, y facilitando la comodidad del paciente (Zhang *et al.* 2022).

Una de las características que se buscan a la hora de encontrar nuevos fármacos antitumorales es la capacidad de estos para inhibir los procesos relacionados con el desarrollo del tumor, como la proliferación celular, la actividad clonogénica y la evasión de la apoptosis. En este aspecto, en este trabajo se demuestra que apMNKQ2 es capaz de reducir la viabilidad en las tres líneas celulares de cáncer de pulmón estudiadas (**Figura 9**). Las células no muestran señales de toxicidad tras el tratamiento con apMNKQ2, por lo que queda descartado como causa en la disminución de la viabilidad celular. Según los

resultados obtenidos, se puede concluir que la viabilidad de las células se reduce debido a la inducción de apoptosis mediada por caspasa 3 (**Figura 11**), aunque no podemos descartar que esta reducción también se deba a un bloqueo en la proliferación celular, dato que por ahora desconocemos, y que sería interesante analizar en el futuro, ya que en células de cáncer de mama, apMNKQ2 produce una parada del ciclo en la fase S (Pinto-Díez *et al.* 2022). Algunos inhibidores de MNK como CGP57380 y los derivados de pirimidinas producen una parada del ciclo en células de cáncer de mama (Wheater *et al.* 2010; Abdelaziz *et al.* 2019). Además, el inhibidor de MNK1, BAY1143269, produce una parada en la fase G0/G1 del ciclo celular en células de NSCLC, entre otras (Santag *et al.* 2017).

XIAP es una proteína antiapoptótica cuya expresión se encuentra elevada en diferentes cánceres (Holcik *et al.* 2001). Su sobreexpresión correlaciona con tumores de mama de alto grado, y su expresión está regulada por MNK (Evans *et al.* 2018). Por otra parte, la sobreexpresión de MCL-1 induce la transformación oncogénica, y además, el aumento en la expresión de esta proteína se encuentra en la mayoría de los cánceres humanos, incluyendo NSCLC (Zhang *et al.* 2011). Es más, el aumento en la expresión de MCL-1 se correlaciona con un alto índice de proliferación y un bajo índice de apoptosis en tejidos de NSCLC, lo que sugiere que la sobreexpresión de MCL-1 está implicada en la inhibición de la apoptosis y en promover la supervivencia celular en cáncer de pulmón. Por otra parte, Wendel y colaboradores demostraron que una expresión constitutiva de MNK1 promueve la expresión de MCL-1, disminuyendo la apoptosis y acelerando el desarrollo del tumor (Wendel *et al.* 2007). De la misma manera, en nuestro laboratorio se observó que la sobreexpresión de MNK1b induce un aumento en la expresión de MCL-1 (Pinto-Díez *et al.* 2018). El hecho de que apMNKQ2 reduzca los niveles de estas dos proteínas antiapoptóticas tanto *in vitro*, en las líneas A549 y SW900, como *in vivo*, demuestra que el aptámero ejerce su efecto a través de MNK1. La inhibición de MNK1 mediante CGP57380 o BAY1143269 produce una disminución en los niveles de la proteína antiapoptótica survivina en leucemia y NSCLC, concretamente en las células A549 y H460 (Santag *et al.* 2017; Huang *et al.* 2018). Según esto, cabría la posibilidad de que apMNKQ2 esté induciendo la apoptosis en las células H460 por otro mecanismo independiente de XIAP o MCL-1 que sería interesante estudiar en ensayos futuros.

Otra de las propiedades implicadas en la formación de tumores es la actividad clonogénica de las células cancerígenas. El hecho de que apMNKQ2 sea capaz de inhibir este proceso en las tres líneas celulares estudiadas indica que, tras el tratamiento con el aptámero, se reduce la capacidad de estas células de dividirse de forma ilimitada, característica distintiva de las células cancerígenas (Hanahan *et al.* 2000).

La metástasis es un proceso complejo que requiere múltiples pasos, entre los que destaca la transición epitelio-mesénquima, proceso en el cual se van perdiendo las características epiteliales de las células, que acaban convirtiéndose en células mesenquimales migratorias, capaces de colonizar órganos distales. Es un proceso que puede ser revertido por la transición mesénquimo-epitelial (TME), que afecta a las células tumorales circulantes cuando alcanzan un nicho metastásico en el que se asientan para proliferar y desarrollar tumores secundarios (Nowak *et al.* 2021). Las MNKs están implicadas en la metástasis tumoral (Robichaud *et al.* 2015), y muchos de los inhibidores de MNK desarrollados hasta ahora son capaces de reducir estos procesos de migración e invasión de células tumorales (Ramalingam *et al.* 2014; Beggs *et al.* 2015; Kwegyir-Afful *et al.* 2016; Santag *et al.* 2017; Zhan *et al.* 2017). En este trabajo hemos demostrado que apMNKQ2 es capaz de reducir la capacidad migratoria e invasiva de tres líneas tumorales de pulmón.

En el proceso de metástasis, las células migran y se adhieren a otras localizaciones mediante su capacidad de adhesión a componentes de la matriz extracelular. En este sentido, este trabajo muestra que apMNKQ2 es capaz de disminuir la capacidad de adhesión a colágeno tipo I de las células A549. La integrina  $\beta 1$  es una proteína implicada en la interacción de las células tumorales con componentes de la matriz extracelular (Brakebusch *et al.* 2005), y está sobreexpresada en las células A549 (Guo *et al.* 2009). Su inhibición disminuye la capacidad de adhesión de las células A549 a través de la inhibición de la vía de ERK1/2 (Wang *et al.* 2013), por lo que apMNKQ2 podría estar reduciendo la capacidad adhesiva de estas células a través de la inhibición de MNK1. En cambio, apMNKQ2 no parece tener efecto sobre la adhesión de las células SW900 y H460. Se ha visto que las células A549 tienen una mayor expresión en comparación con las células SW900 de la proteína oncogénica SLC3A2, cuya interacción con la integrina  $\beta 1$  tiene un papel importante en la transformación celular (Korrodi-Gregório *et al.* 2016). Quizás esta diferencia de expresión proteica entre ambas líneas sea la causa de no ver efecto del aptámero en la adhesión celular de la línea SW900. Por otra parte, p110 $\alpha$  media la activación de AKT inducida por la integrina  $\beta 1$ , lo que podría contribuir a las propiedades tumorigénicas de las células que expresan p110 $\alpha$  de manera constitutivamente activa (Zeller *et al.* 2010), como es el caso de la línea celular H460 (Blanco *et al.* 2009), y explicar la ausencia de efecto del aptámero sobre la capacidad de adhesión de estas células.

Las células A549 y SW900 presentan un fenotipo intermedio de TEM, ya que expresan tanto marcadores epiteliales como mesenquimales. Por el contrario, la poca o nula expresión de marcadores epiteliales, y la alta expresión de factores de transcripción que inducen TEM, en las células H460, indican su fenotipo mesenquimal (**Figura 18**).

El inhibidor de MNK, VNLG-152, es capaz de revertir la TEM reduciendo los niveles de N-cadherina en cáncer de próstata (Ramamurthy *et al.* 2018). En este sentido, apMNKQ2 disminuye la expresión del marcador mesenquimal N-cadherina en las células SW900 y además, aumenta la expresión del marcador epitelial ocludina en las células H460, recuperando parte de los rasgos epiteliales. La inhibición de MNK reduce la expresión de ZEB-1 y aumenta los niveles de E-cadherina, revirtiendo la TEM en células de cáncer de páncreas (Kumar *et al.* 2016). Además, la inhibición de MNK1 produce una reducción en la expresión de Snail y ZEB-1 en las células A549 y H460 (Santag *et al.* 2017). En este trabajo se muestra que tras el tratamiento con apMNKQ2 hay una tendencia a la disminución en los niveles de ZEB-1 en las células A549 y SW900, aunque la dificultad de encontrar un buen anticuerpo para su detección, añadido a la complicación de transferir a la membrana una proteína de elevado peso molecular, han dificultado el análisis de su expresión, obteniendo resultados poco concluyentes. Por otra parte, Snail es un represor directo de E-cadherina (Puisieux *et al.* 2014), lo que podría justificar la reducción en la expresión de E-cadherina tras el tratamiento con apMNKQ2 en las células A549. Sin embargo, esta reducción de E-cadherina también se observa en las SW900, donde los niveles de Snail también se ven reducidos tras la transfección con el aptámero, por lo que este mecanismo no parece ser el responsable de la bajada observada en los niveles de E-cadherina.

Hay estudios que evidencian que no todas las células adquieren un estado mesenquimal durante la transición (Nowak *et al.* 2021) y que, además, hay carcinomas que adoptan rasgos mesenquimales conservando características de células epiteliales bien diferenciadas (Christiansen *et al.* 2006). Por tanto, el amplio uso del término TEM no es siempre apropiado para describir los diferentes procesos asociados con invasión y metástasis. Un proceso tan complejo como éste dificulta el estudio del efecto del aptámero sobre la transición epitelio-mesenquima.

El aptámero apMNKQ2 parece producir más efectos antitumorales en las células A549 y SW900, que en las células H460. Una mayor actividad de la vía de PI3K en estas últimas podría compensar los efectos que produce apMNKQ2, por lo que sería interesante estudiar el tratamiento combinado con inhibidores de la vía de PI3K, para aumentar la sensibilidad de las células a apMNKQ2.

Muchos inhibidores de MNK desarrollados hasta ahora como MNK-I1, BAY1143269, MNK-7g, eFT508 o derivados del ácido retinoico (Beggs *et al.* 2015; Santag *et al.* 2017; Ramalingam *et al.* 2019; Jin *et al.* 2019; Suarez *et al.* 2021), ejercen su efecto a través de la inhibición de la fosforilación de eIF4E, al igual que ocurre con el aptámero apMNKQ2 en células de cáncer de mama (Pinto-Díez *et al.* 2022). Como se muestra en el apartado de

resultados, apMNKQ2 no parece afectar a la fosforilación de eIF4E en las líneas de cáncer de pulmón estudiadas, y es que, no siempre se ve efecto sobre eIF4E tras la inhibición de MNK: los aptámeros apMNK2F y apMNK3R, que disminuyen la viabilidad celular, migración y formación de colonias en células MDA-MB-231 (García-Recio *et al.* 2016); y los análogos de ferroceno, que inhiben la viabilidad celular y el crecimiento de esferoides, no producen ningún efecto sobre la fosforilación de eIF4E (Sansook *et al.* 2018). Una posible hipótesis es que MNK2 sea la principal quinasa responsable de la fosforilación de eIF4E. Este trabajo muestra que el silenciamiento de MNK2 en las células A549 produce una bajada en la fosforilación de eIF4E, sin embargo, este silenciamiento no es suficiente para revertir la subida en la fosforilación de eIF4E que se produce en estas células tras el tratamiento con apMNKQ2. Se ha demostrado que MNK2b actúa como protooncogén aumentando la fosforilación de eIF4E (Maimon *et al.* 2014). Además, la fosforilación de eIF4E en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 está mediada principalmente por MNK2 (García-Recio *et al.* 2016) y hay estudios que indican que MNK2 está implicada en la tumorigénesis de NSCLC a través de la fosforilación de eIF4E (Guo *et al.* 2017). Todos estos datos, en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo, apuntan a que MNK2 podría estar implicada en la fosforilación de eIF4E en las células A549. No obstante, el silenciamiento de MNK2 con los siRNAs utilizados no es del 100%, por lo que la mejor estrategia para poder analizar en profundidad este efecto sería mediante un sistema de CRISPR/Cas o un modelo knockout para estudiar por separado el papel de MNK1 y MNK2 en la fosforilación de eIF4E. Una posible teoría para explicar el efecto de apMNKQ2 sobre MNK1, de forma independiente de la fosforilación de eIF4E, es que el aptámero impida la fosforilación de otros sustratos de MNK1 como PSF, hnRNP A1 o Spry2.

En este trabajo se ha demostrado que apMNKQ2 ejerce su efecto antitumoral a través de proteínas reguladas por MNK1 como XIAP y MCL-1, pero en los últimos años se han descrito otras como NODAL, una proteína implicada en invasión y metástasis, cuyos niveles disminuyen con la pérdida de MNK1 (Guo *et al.* 2019); *NDRG1* (*N-myc downregulated gene 1*), supresor de metástasis cuya fosforilación está regulada por MNK1, pero no por MNK2 (Tian *et al.* 2017) o la proteína similar a la angiopoyetina 4 (ANGPTL-4), cuya sobreexpresión en melanoma promueve la invasión y la metástasis mediante el aumento de la expresión de las metaloproteinasas (Yang, Khoury, *et al.* 2020). Quizás la inhibición de MNK1 por apMNKQ2 pueda estar afectando a la capacidad migratoria e invasiva de las células mediante alguno de estos mecanismos.

El siguiente paso durante el desarrollo de un fármaco es validar su actividad en modelos animales. La vía de administración del fármaco es un factor importante a tener en cuenta, por lo que en nuestro laboratorio se ha estudiado la eficacia de diferentes formas de

administración de apMNKQ2 en ensayos preliminares con ratones. El aptámero se administró por vía oral, intravenosa e intraperitoneal, siendo ésta última la más eficaz en modelos de cáncer de mama y cáncer de páncreas. A la vista de estos resultados, se eligió la vía intraperitoneal como forma de administración del aptámero en este trabajo. Cabe destacar, que en los ensayos de eficacia *in vivo* en cáncer de mama el aptámero se administró usando transfectante (Pinto-Díez *et al.* 2022), mientras que en este trabajo se ha administrado el aptámero sin vehiculizar, lo que supone una ventaja ya que permite aumentar la dosis de aptámero administrada. La línea celular A549 es una de las más utilizadas habitualmente en modelos *in vivo* de adenocarcinoma por su gran capacidad para desarrollar tumores (Kellar *et al.* 2015), por lo que fue la línea de elección en los ensayos de eficacia de este trabajo. Hay que tener en cuenta que el crecimiento de los tumores fue más lento de lo esperado, por lo que los resultados han podido verse afectados por este factor. Aun así, se trata de un ensayo piloto en el que se han obtenido resultados prometedores para apMNKQ2 como agente terapéutico.

Los modelos de xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (PDX) se han establecido con éxito en diferentes tipos de cáncer ya que reflejan con mayor precisión los aspectos fisiológicos del tumor primario del paciente. En los modelos PDX, las células cancerígenas crecen en el microambiente tumoral, y, además, el tumor implantado mantiene las anomalías genéticas y epigenéticas encontradas en el paciente (Jung *et al.* 2018). Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo de eficacia de apMNKQ2 en un modelo PDX de adenocarcinoma, lo que mostrará en un futuro, el potencial terapéutico del aptámero en un tumor primario de pulmón.

Uno de los aspectos importantes a tener en cuenta es la toxicidad que muestran los fármacos antitumorales y es que, para muchos tipos de cáncer, incluyendo NSCLC, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento estándar en determinados casos, a pesar de los efectos secundarios documentados y el desarrollo de quimiorresistencia (Landi *et al.* 2015). Los tratamientos basados en platino, como el carboplatino y el cisplatino, suelen producir náuseas, vómitos, neuropatías, ototoxicidad, hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, entre otros (Rossi *et al.* 2016). Otras estrategias terapéuticas como la inmunoterapia o la terapia molecular dirigida, han sido mejor toleradas por los pacientes, mostrando además resultados satisfactorios. A pesar de ello, muchos fármacos basados en la inmunoterapia generan toxicidad hepática, diarrea, colitis, prurito o neumonitis (Barquín-García *et al.* 2019). Erlotinib, gefitinib o afatinib, utilizados en terapia dirigida en NSCLC con mutación en EGFR, producen diarrea, erupciones cutáneas, estomatitis o erosiones en la córnea (Hsu *et al.* 2018). En línea con esto, cabe destacar que en general, los aptámeros se consideran seguros debido a la baja toxicidad que muestran como herramientas terapéuticas. De hecho,

el aptámero AS1411 fue administrado a ratas y a perros en ensayos preclínicos sin mostrar signos de toxicidad. Además, fue evaluado en una primera fase de ensayos clínicos, mostrando una ausencia de toxicidad grave en estos pacientes (Bates *et al.* 2009). El aptámero NOX-A12 fue administrado a pacientes, en los que no se observó ningún signo de toxicidad que pudiera delimitar la dosis (Steurer *et al.* 2019). Al igual ocurre con el aptámero ApTOLL, el cual ejerce un efecto protector contra las enfermedades isquémicas (Fernández *et al.* 2018), y ha sido llevado a ensayos clínicos, donde no se han notificado efectos adversos, ni se han descrito parámetros o signos vitales alterados asociados a su administración (Hernández-Jiménez *et al.* 2022). La administración de apMNKQ2 en un modelo *in vivo* de cáncer de mama no produjo cambios en el peso de los animales, además, estudios de tolerabilidad de nuestro laboratorio indican que la máxima dosis tolerada de apMNKQ2 en ratones es de 400 mg/kg, por lo que los datos obtenidos hasta ahora podrían indicar la baja toxicidad del aptámero.

En este trabajo se demuestra como el aptámero frente a MNK1 desarrollado previamente en nuestro laboratorio, apMNKQ2, es capaz de inhibir ciertos procesos relacionados con el desarrollo y la metástasis tumoral en células de cáncer de pulmón, así como de reducir el crecimiento del tumor e inducir apoptosis en un ensayo preliminar empleando un modelo *in vivo* de adenocarcinoma. A partir de este punto, habría que seguir investigando para conocer la dosis óptima efectiva del aptámero, así como estudiar su seguridad farmacológica y su farmacocinética. Cabe destacar, que algunos de estos aspectos están siendo estudiados actualmente en nuestro laboratorio con la finalidad de poder conocer el potencial antitumoral de apMNKQ2 y su prometedora aplicación como herramienta terapéutica en los diferentes tipos de cáncer en los que MNK1 tiene un papel relevante.

## **CONCLUSIONES**



1. De los cuatro aptámeros diseñados a partir del aptámero parental apMNK2F obtenido frente a la proteína MNK1, el aptámero apMNKQ2 es el que muestra mayor eficacia en líneas celulares tumorales de pulmón.
2. El aptámero apMNKQ2 inhibe procesos relacionados tanto con la actividad tumorigénica (viabilidad celular, formación de colonias y evasión de apoptosis); como metastásica (migración, invasión y adhesión) en las líneas tumorales de pulmón A549, SW900 y H460, representativas de los tres subtipos de cáncer de pulmón de célula no pequeña: adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa y carcinoma de célula grande.
3. El mecanismo por el que el aptámero apMNKQ2 regula la apoptosis en células representativas de adenocarcinoma y carcinoma escamoso podría estar mediado por la reducción en la expresión de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y XIAP, lo cual difiere del mecanismo que podría estar implicado en las células de carcinoma de célula grande.
4. Resultados preliminares en un modelo murino de adenocarcinoma pulmonar muestran que el aptámero apMNKQ2 produce un efecto antitumoral (reducción del tamaño del tumor e inhibición de la actividad de proteínas antiapoptóticas), dependiente de dosis, lo que permite concluir que apMNKQ2 alcanza su diana en el tumor cuando se administra intraperitonealmente y sin necesidad de ser vehiculizado.
5. Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el aptámero apMNKQ2 podría ser un buen candidato como potencial agente antitumoral para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de pulmón.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdelaziz, A. M., S. K. C. Basnet, S. Islam, M. Li, S. Tadesse, H. Albrecht, C. Gerber, M. Yu, and S. Wang. 2019. 'Synthesis and evaluation of 2'H-spiro[cyclohexane-1,3'-imidazo[1,5-a]pyridine]-1',5'-dione derivatives as Mnk inhibitors', *Bioorg Med Chem Lett*, 29: 2650-54.
- Adesso, L., S. Calabretta, F. Barbagallo, G. Capurso, E. Pillozzi, R. Geremia, G. Delle Fave, and C. Sette. 2013. 'Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway', *Oncogene*, 32: 2848-57.
- Alexander, M., S. Y. Kim, and H. Cheng. 2020. 'Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer', *Lung*, 198: 897-907.
- Altmayer, S., N. Verma, M. Z. Francisco, R. F. Almeida, T. L. Mohammed, and B. Hochegger. 2020. 'Classification and Imaging Findings of Lung Neoplasms', *Semin Roentgenol*, 55: 41-50.
- Araz, M., and M. Karakurt Eryilmaz. 2021. 'Immunotherapy era in the treatment of small cell lung cancer', *Med Oncol*, 38: 86.
- Asati, V., D. K. Mahapatra, and S. K. Bharti. 2016. 'PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives', *Eur J Med Chem*, 109: 314-41.
- Bade, B. C., and C. S. Dela Cruz. 2020. 'Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention', *Clin Chest Med*, 41: 1-24.
- Bain, J., L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C. J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J. S. Arthur, D. R. Alessi, and P. Cohen. 2007. 'The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update', *Biochem J*, 408: 297-315.
- Bao, Y., X. Wu, J. Chen, X. Hu, F. Zeng, J. Cheng, H. Jin, X. Lin, and L. F. Chen. 2017. 'Brd4 modulates the innate immune response through Mnk2-eIF4E pathway-dependent translational control of IκBα', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E3993-e4001.
- Barquín-García, A., J. Molina-Cerrillo, P. Garrido, D. Garcia-Palos, A. Carrato, and T. Alonso-Gordoa. 2019. 'New oncologic emergencies: What is there to know about immunotherapy and its potential side effects?', *Eur J Intern Med*, 66: 1-8.
- Bates, P. J., D. A. Laber, D. M. Miller, S. D. Thomas, and J. O. Trent. 2009. 'Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer', *Exp Mol Pathol*, 86: 151-64.
- Batool, A., S. Aashaq, and K. I. Andrabi. 2019. 'Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E): A recap of the cap-binding protein', *J Cell Biochem*, 120: 14201-12.
- Beggs, J. E., S. Tian, G. G. Jones, J. Xie, V. Iadevaia, V. Jenei, G. Thomas, and C. G. Proud. 2015. 'The MAP kinase-interacting kinases regulate cell migration, vimentin expression and eIF4E/CYFIP1 binding', *Biochem J*, 467: 63-76.

- Bianchini, A., M. Loiarro, P. Bielli, R. Busà, M. P. Paronetto, F. Loreni, R. Geremia, and C. Sette. 2008. 'Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells', *Carcinogenesis*, 29: 2279-88.
- Blanco, R., R. Iwakawa, M. Tang, T. Kohno, B. Angulo, R. Pio, L. M. Montuenga, J. D. Minna, J. Yokota, and M. Sanchez-Cespedes. 2009. 'A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines', *Hum Mutat*, 30: 1199-206.
- Bou-Petit, E., S. Hümmer, H. Alarcon, K. Slobodnyuk, M. Cano-Galietero, P. Fuentes, P. J. Guijarro, M. J. Muñoz, L. Suarez-Cabrera, A. Santamaria, R. Estrada-Tejedor, J. I. Borrell, and Y. Cajal S. Ramón. 2022. 'Overcoming Paradoxical Kinase Priming by a Novel MNK1 Inhibitor', *J Med Chem*, 65: 6070-87.
- Brakebusch, C., and R. Fässler. 2005. 'beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more', *Cancer Metastasis Rev*, 24: 403-11.
- Brown, M. C., J. D. Bryant, E. Y. Dobrikova, M. Shveygert, S. S. Bradrick, V. Chandramohan, D. D. Bigner, and M. Gromeier. 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: 13135-48.
- Brown, M. C., and M. Gromeier. 2017a. 'MNK Controls mTORC1:Substrate Association through Regulation of TELO2 Binding with mTORC1', *Cell Rep*, 18: 1444-57.
- Brown, M. C., and M. Gromeier. 2017b. 'MNK inversely regulates TELO2 vs. DEPTOR to control mTORC1 signaling', *Mol Cell Oncol*, 4: e1306010.
- Bundschu, K., U. Walter, and K. Schuh. 2006. 'The VASP-Spred-Sprouty domain puzzle', *J Biol Chem*, 281: 36477-81.
- Buxadé, M., N. Morrice, D. L. Krebs, and C. G. Proud. 2008. 'The PSF.p54nrb complex is a novel Mnk substrate that binds the mRNA for tumor necrosis factor alpha', *J Biol Chem*, 283: 57-65.
- Buxade, M., J. L. Parra-Palau, and C. G. Proud. 2008. 'The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases)', *Front Biosci*, 13: 5359-73.
- Buxade, M., J. L. Parra, S. Rousseau, N. Shpiro, R. Marquez, N. Morrice, J. Bain, E. Espel, and C. G. Proud. 2005. 'The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1', *Immunity*, 23: 177-89.
- 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: 50-83.
- Carrión-Marchante, R., V. Frezza, A. Salgado-Figueroa, M. I. Pérez-Morgado, M. E. Martín, and V. M. González. 2021. 'DNA Aptamers against Vaccinia-Related Kinase (VRK) 1 Block Proliferation in MCF7 Breast Cancer Cells', *Pharmaceuticals (Basel)*, 14.

- Chappell, W. H., L. S. Steelman, J. M. Long, R. C. Kempf, S. L. Abrams, R. A. Franklin, J. Bäsecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, M. C. Mazzarino, F. Nicoletti, M. Libra, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, G. Montalto, M. Cervello, P. Laidler, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, C. Evangelisti, L. Cocco, A. M. Martelli, and J. A. McCubrey. 2011. 'Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health', *Oncotarget*, 2: 135-64.
- Chen, C. Y., J. Chen, L. He, and B. L. Stiles. 2018. 'PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 338.
- Chen, Z., L. Hu, B. T. Zhang, A. Lu, Y. Wang, Y. Yu, and G. Zhang. 2021. 'Artificial Intelligence in Aptamer-Target Binding Prediction', *Int J Mol Sci*, 22.
- Chrestensen, C. A., A. Eschenroeder, W. G. Ross, T. Ueda, R. Watanabe-Fukunaga, R. Fukunaga, and T. W. Sturgill. 2007. 'Loss of MNK function sensitizes fibroblasts to serum-withdrawal induced apoptosis', *Genes Cells*, 12: 1133-40.
- Chrestensen, C. A., J. K. Shuman, A. Eschenroeder, M. Worthington, H. Gram, and T. W. Sturgill. 2007. 'MNK1 and MNK2 regulation in HER2-overexpressing breast cancer lines', *J Biol Chem*, 282: 4243-52.
- Christiansen, J. J., and A. K. Rajasekaran. 2006. 'Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis', *Cancer Res*, 66: 8319-26.
- Corbett, V., S. Arnold, L. Anthony, and A. Chauhan. 2021. 'Management of Large Cell Neuroendocrine Carcinoma', *Front Oncol*, 11: 653162.
- Cruz-Hernández, C. D., G. Rodríguez-Martínez, S. A. Cortés-Ramírez, M. Morales-Pacheco, M. Cruz-Burgos, A. Losada-García, J. P. Reyes-Grajeda, I. González-Ramírez, V. González-Covarrubias, I. Camacho-Arroyo, M. Cerbón, and M. Rodríguez-Dorantes. 2022. 'Aptamers as Theragnostic Tools in Prostate Cancer', *Biomolecules*, 12.
- 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: 65-9.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, L. Skrabanek, M. Ruiz-Gutierrez, and K. L. Borden. 2005. 'eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR', *J Cell Biol*, 169: 245-56.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, L. Skrabanek, M. Ruiz-Gutierrez, and K. L. Borden. 2006. 'eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation', *J Cell Biol*, 175: 415-26.

- Darmostuk, M., S. Rimpelova, H. Gbelcova, and T. Ruml. 2015. 'Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology', *Biotechnol Adv*, 33: 1141-61.
- DaSilva, J., L. Xu, H. J. Kim, W. T. Miller, and D. Bar-Sagi. 2006. 'Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation', *Mol Cell Biol*, 26: 1898-907.
- de Arriba, M. D. C., G. Fernández, E. Chacón-Solano, M. Mataix, L. Martínez-Santamaría, N. Illera, R. Carrión-Marchante, M. E. Martín, F. Larcher, V. M. González, M. Del Río, and M. Carretero. 2022. 'FPR2 DNA Aptamers for Targeted Therapy of Wound Repair', *J Invest Dermatol*, 142: 2238-48.e8.
- De Benedetti, A., and J. R. Graff. 2004. 'eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases', *Oncogene*, 23: 3189-99.
- De Benedetti, A., S. Joshi-Barve, C. Rinker-Schaeffer, and R. E. Rhoads. 1991. 'Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F', *Mol Cell Biol*, 11: 5435-45.
- DeFatta, R. J., C. O. Nathan, and A. De Benedetti. 2000. 'Antisense RNA to eIF4E suppresses oncogenic properties of a head and neck squamous cell carcinoma cell line', *Laryngoscope*, 110: 928-33.
- Denizot, F., and R. Lang. 1986. 'Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability', *J Immunol Methods*, 89: 271-7.
- Diab, S., M. Kumarasiri, M. Yu, T. Teo, C. Proud, R. Milne, and S. Wang. 2014. 'MAP kinase-interacting kinases--emerging targets against cancer', *Chem Biol*, 21: 441-52.
- Dobrikov, M., E. Dobrikova, M. Shveygert, and M. Gromeier. 2011. 'Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C{alpha} regulates eIF4G1 binding to Mnk1', *Mol Cell Biol*, 31: 2947-59.
- Dong, Y., Y. Xu, W. Yong, X. Chu, and D. Wang. 2014. 'Aptamer and its potential applications for food safety', *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54: 1548-61.
- Dostie, J., M. Ferraiuolo, A. Pause, S. A. Adam, and N. Sonenberg. 2000. 'A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E', *EMBO J*, 19: 3142-56.
- Duma, N., R. Santana-Davila, and J. R. Molina. 2019. 'Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment', *Mayo Clin Proc*, 94: 1623-40.
- 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: 380-8.

- Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1990. 'In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands', *Nature*, 346: 818-22.
- Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1992. 'Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures', *Nature*, 355: 850-2.
- Evans, M. K., M. C. Brown, J. Geradts, X. Bao, T. J. Robinson, M. K. Jolly, P. B. Vermeulen, G. M. Palmer, M. Gromeier, H. Levine, M. A. Morse, S. J. Van Laere, and G. R. Devi. 2018. 'XIAP Regulation by MNK Links MAPK and NFκB Signaling to Determine an Aggressive Breast Cancer Phenotype', *Cancer Res*, 78: 1726-38.
- Fernández, G., A. Moraga, M. I. Cuartero, A. García-Culebras, C. Peña-Martínez, J. M. Pradillo, M. Hernández-Jiménez, S. Sacristán, M. I. Ayuso, R. Gonzalo-Gobernado, D. Fernández-López, M. E. Martín, M. A. Moro, V. M. González, and I. Lizasoain. 2018. 'TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models', *Mol Ther*, 26: 2047-59.
- 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: 21684-8.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree. 2006. 'Clonogenic assay of cells in vitro', *Nat Protoc*, 1: 2315-9.
- Frezza, V., C. Pinto-Díez, G. Fernández, M. Soto, M. E. Martín, A. García-Sacristán, and V. M. González. 2020. 'DNA aptamers targeting Leishmania infantum H3 protein as potential diagnostic tools', *Anal Chim Acta*, 1107: 155-63.
- Fu, Z., and J. Xiang. 2020. 'Aptamers, the Nucleic Acid Antibodies, in Cancer Therapy', *Int J Mol Sci*, 21.
- 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: 1921-33.
- Furic, L., L. Rong, O. Larsson, I. H. Koumakpayi, K. Yoshida, A. Brueschke, E. Petroulakis, N. Robichaud, M. Pollak, L. A. Gaboury, P. P. Pandolfi, F. Saad, and N. Sonenberg. 2010. 'eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 14134-9.
- García-Recio, E. M., C. Pinto-Díez, M. I. Pérez-Morgado, M. García-Hernández, G. Fernández, M. E. Martín, and V. M. González. 2016. 'Characterization of MNK1b DNA Aptamers That Inhibit Proliferation in MDA-MB231 Breast Cancer Cells', *Mol Ther Nucleic Acids*, 5: e275.
- Geter, P. A., A. W. Ernlund, S. Bakogianni, A. Alard, R. Arju, S. Giashuddin, A. Gadi, J. Bromberg, and R. J. Schneider. 2017. 'Hyperactive mTOR and MNK1 phosphorylation of eIF4E confer tamoxifen resistance and estrogen independence through selective mRNA translation reprogramming', *Genes Dev*, 31: 2235-49.

- Gingras, A. C., B. Raught, S. P. Gygi, A. Niedzwiecka, M. Miron, S. K. Burley, R. D. Polakiewicz, A. Wyslouch-Cieszynska, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 2001. 'Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1', *Genes Dev*, 15: 2852-64.
- Goetz, C., R. G. Everson, L. C. Zhang, and M. Gromeier. 2010. 'MAPK signal-integrating kinase controls cap-independent translation and cell type-specific cytotoxicity of an oncolytic poliovirus', *Mol Ther*, 18: 1937-46.
- 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: 279-90.
- Graff, J. R., E. R. Boghaert, A. De Benedetti, D. L. Tudor, C. C. Zimmer, S. K. Chan, and S. G. Zimmer. 1995. 'Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts', *Int J Cancer*, 60: 255-63.
- Grzmil, M., P. Morin, Jr., M. M. Lino, A. Merlo, S. Frank, Y. Wang, G. Moncayo, and B. A. Hemmings. 2011. 'MAP kinase-interacting kinase 1 regulates SMAD2-dependent TGF- $\beta$  signaling pathway in human glioblastoma', *Cancer Res*, 71: 2392-402.
- Grzmil, M., J. Seebacher, D. Hess, M. Behe, R. Schibli, G. Moncayo, S. Frank, and B. A. Hemmings. 2016. 'Inhibition of MNK pathways enhances cancer cell response to chemotherapy with temozolomide and targeted radionuclide therapy', *Cell Signal*, 28: 1412-21.
- Guil, S., J. C. Long, and J. F. Cáceres. 2006. 'hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response', *Mol Cell Biol*, 26: 5744-58.
- Guo, L., F. Zhang, Y. Cai, and T. Liu. 2009. 'Expression profiling of integrins in lung cancer cells', *Pathol Res Pract*, 205: 847-53.
- Guo, Q., V. Z. Li, J. N. Nichol, F. Huang, W. Yang, S. E. J. Preston, Z. Talat, H. Lefrère, H. Yu, G. Zhang, M. Basik, C. Gonçalves, Y. Zhan, D. Plourde, J. Su, J. Torres, M. Marques, S. A. Habyan, K. Bijian, F. Amant, M. Witcher, F. Behbod, L. McCaffrey, M. Alaoui-Jamali, N. V. Giannakopoulos, M. Brackstone, L. M. Postovit, S. V. Del Rincón, and W. H. Miller, Jr. 2019. 'MNK1/NODAL Signaling Promotes Invasive Progression of Breast Ductal Carcinoma In Situ', *Cancer Res*, 79: 1646-57.
- Guo, Z., G. Peng, E. Li, S. Xi, Y. Zhang, Y. Li, X. Lin, G. Li, Q. Wu, and J. He. 2017. 'MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2 promotes proliferation, metastasis, and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer', *Sci Rep*, 7: 10612.
- Hamilton, B. J., C. M. Burns, R. C. Nichols, and W. F. Rigby. 1997. 'Modulation of AUUUA response element binding by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in human T lymphocytes. The roles of cytoplasmic location, transcription, and phosphorylation', *J Biol Chem*, 272: 28732-41.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100: 57-70.

- Hanson, P. J., H. M. Zhang, M. G. Hemida, X. Ye, Y. Qiu, and D. Yang. 2012. 'IRES-Dependent Translational Control during Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis', *Front Microbiol*, 3: 92.
- Haruta, K., N. Otaki, M. Nagamine, T. Kayo, A. Sasaki, S. Hiramoto, M. Takahashi, K. Hota, H. Sato, and H. Yamazaki. 2017. 'A Novel PEGylation Method for Improving the Pharmacokinetic Properties of Anti-Interleukin-17A RNA Aptamers', *Nucleic Acid Ther*, 27: 36-44.
- Hefner, Y., A. G. Borsch-Haubold, M. Murakami, J. I. Wilde, S. Pasquet, D. Schieltz, F. Ghomashchi, J. R. Yates, 3rd, C. G. Armstrong, A. Paterson, P. Cohen, R. Fukunaga, T. Hunter, I. Kudo, S. P. Watson, and M. H. Gelb. 2000. 'Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases', *J Biol Chem*, 275: 37542-51.
- Herbst, R. S., D. Morgensztern, and C. Boshoff. 2018. 'The biology and management of non-small cell lung cancer', *Nature*, 553: 446-54.
- Hernández-Jiménez, M., S. Martín-Vílchez, D. Ochoa, G. Mejía-Abril, M. Román, P. Camargo-Mamani, S. Luquero-Bueno, B. Jilma, M. A. Moro, G. Fernández, D. Piñeiro, M. Ribó, V. M. González, I. Lizasoain, and F. Abad-Santos. 2022. 'First-in-human phase I clinical trial of a TLR4-binding DNA aptamer, ApTOLL: Safety and pharmacokinetics in healthy volunteers', *Mol Ther Nucleic Acids*, 28: 124-35.
- Hirsch, F. R., G. V. Scagliotti, J. L. Mulshine, R. Kwon, W. J. Curran, Jr., Y. L. Wu, and L. Paz-Ares. 2017. 'Lung cancer: current therapies and new targeted treatments', *Lancet*, 389: 299-311.
- Holcik, M., and R. G. Korneluk. 2001. 'XIAP, the guardian angel', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 550-6.
- Hou, J., F. Lam, C. Proud, and S. Wang. 2012. 'Targeting Mnks for cancer therapy', *Oncotarget*, 3: 118-31.
- Hou, S., P. Du, P. Wang, C. Wang, P. Liu, and H. Liu. 2017. 'Significance of MNK1 in prognostic prediction and chemotherapy development of epithelial ovarian cancer', *Clin Transl Oncol*, 19: 1107-16.
- Hsu, W. H., J. C. Yang, T. S. Mok, and H. H. Loong. 2018. 'Overview of current systemic management of EGFR-mutant NSCLC', *Ann Oncol*, 29: i3-i9.
- Huang, X. B., C. M. Yang, Q. M. Han, X. J. Ye, W. Lei, and W. B. Qian. 2018. 'MNK1 inhibitor CGP57380 overcomes mTOR inhibitor-induced activation of eIF4E: the mechanism of synergic killing of human T-ALL cells', *Acta Pharmacol Sin*, 39: 1894-901.
- Iwai, Y., M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo, and N. Minato. 2002. 'Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 12293-7.

- Izaurrealde, E., A. Jarmolowski, C. Beisel, I. W. Mattaj, G. Dreyfuss, and U. Fischer. 1997. 'A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export', *J Cell Biol*, 137: 27-35.
- Jang, S. K., H. G. Kräusslich, M. J. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg, and E. Wimmer. 1988. 'A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation', *J Virol*, 62: 2636-43.
- Jauch, R., M. K. Cho, S. Jäkel, C. Netter, K. Schreiter, B. Aicher, M. Zweckstetter, H. Jäckle, and M. C. Wahl. 2006. 'Mitogen-activated protein kinases interacting kinases are autoinhibited by a reprogrammed activation segment', *EMBO J*, 25: 4020-32.
- Jauch, R., S. Jäkel, C. Netter, K. Schreiter, B. Aicher, H. Jäckle, and M. C. Wahl. 2005. 'Crystal structures of the Mnk2 kinase domain reveal an inhibitory conformation and a zinc binding site', *Structure*, 13: 1559-68.
- Jin, X., J. Merrett, S. Tong, B. Flower, J. Xie, R. Yu, S. Tian, L. Gao, J. Zhao, X. Wang, T. Jiang, and C. G. Proud. 2019. 'Design, synthesis and activity of Mnk1 and Mnk2 selective inhibitors containing thieno[2,3-d]pyrimidine scaffold', *Eur J Med Chem*, 162: 735-51.
- Jin, X., R. Yu, X. Wang, C. G. Proud, and T. Jiang. 2021. 'Progress in developing MNK inhibitors', *Eur J Med Chem*, 219: 113420.
- Joshi, B., A. L. Cai, B. D. Keiper, W. B. Minich, R. Mendez, C. M. Beach, J. Stepinski, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, and R. E. Rhoads. 1995. 'Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209', *J Biol Chem*, 270: 14597-603.
- Joshi, S., S. Kaur, A. J. Redig, K. Goldsborough, K. David, T. Ueda, R. Watanabe-Fukunaga, D. P. Baker, E. N. Fish, R. Fukunaga, and L. C. Platanias. 2009. 'Type I interferon (IFN)-dependent activation of Mnk1 and its role in the generation of growth inhibitory responses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 12097-102.
- Joshi, S., B. Sharma, S. Kaur, B. Majchrzak, T. Ueda, R. Fukunaga, A. K. Verma, E. N. Fish, and L. C. Platanias. 2011. 'Essential role for Mnk kinases in type II interferon (IFN $\gamma$ ) signaling and its suppressive effects on normal hematopoiesis', *J Biol Chem*, 286: 6017-26.
- Joubert, P. E., K. Stapleford, F. Guivel-Benhassine, M. Vignuzzi, O. Schwartz, and M. L. Albert. 2015. 'Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the Mnk/eIF4E Pathway', *PLoS Pathog*, 11: e1005091.
- Jung, J., H. S. Seol, and S. Chang. 2018. 'The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research', *Cancer Res Treat*, 50: 1-10.
- Kannan, S., M. R. Pradhan, J. Cherian, T. L. Joseph, Z. Y. Poh, Y. Hai Yan, H. Melvyn, L. Boping, H. Jeffrey, K. Nacro, and C. S. Verma. 2017. 'Small Molecules Targeting the Inactive Form of the Mnk1/2 Kinases', *ACS Omega*, 2: 7881-91.

- Karimpour, M., R. Ravanbakhsh, M. Maydanchi, A. Rajabi, F. Azizi, and A. Saber. 2021. 'Cancer driver gene and non-coding RNA alterations as biomarkers of brain metastasis in lung cancer: A review of the literature', *Biomed Pharmacother*, 143: 112190.
- Kaur, H., J. G. Bruno, A. Kumar, and T. K. Sharma. 2018. 'Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines', *Theranostics*, 8: 4016-32.
- Keefe, A. D., S. Pai, and A. Ellington. 2010. 'Aptamers as therapeutics', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 537-50.
- Kellar, A., C. Egan, and D. Morris. 2015. 'Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications', *Biomed Res Int*, 2015: 621324.
- Kjellerup, R. B., K. Kragballe, L. Iversen, and C. Johansen. 2008. 'Pro-inflammatory cytokine release in keratinocytes is mediated through the MAPK signal-integrating kinases', *Exp Dermatol*, 17: 498-504.
- Kleiner, H. E., P. Krishnan, J. Tubbs, M. Smith, C. Meschonat, R. Shi, M. Lowery-Nordberg, P. Adegboyega, M. Unger, J. Cardelli, Q. Chu, J. M. Mathis, J. Clifford, A. De Benedetti, and B. D. Li. 2009. 'Tissue microarray analysis of eIF4E and its downstream effector proteins in human breast cancer', *J Exp Clin Cancer Res*, 28: 5.
- Konicek, B. W., J. R. Stephens, A. M. McNulty, N. Robichaud, R. B. Peery, C. A. Dumstorf, M. S. Dowless, P. W. Iversen, S. Parsons, K. E. Ellis, D. J. McCann, J. Pelletier, L. Furic, J. M. Yingling, L. F. Stancato, N. Sonenberg, and J. R. Graff. 2011. 'Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases', *Cancer Res*, 71: 1849-57.
- Koromilas, A. E., A. Lazaris-Karatzas, and N. Sonenberg. 1992. 'mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E', *EMBO J*, 11: 4153-8.
- Korrodi-Gregório, L., V. Soto-Cerrato, R. Vitorino, M. Fardilha, and R. Pérez-Tomás. 2016. 'From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research', *PLoS One*, 11: e0165973.
- Kumar, K., C. R. Chow, K. Ebine, A. D. Arslan, B. Kwok, D. J. Bentrem, F. D. Eckerdt, L. C. Plataniias, and H. G. Munshi. 2016. 'Differential Regulation of ZEB1 and EMT by MAPK-Interacting Protein Kinases (MNK) and eIF4E in Pancreatic Cancer', *Mol Cancer Res*, 14: 216-27.
- Kumar Kulabhusan, P., B. Hussain, and M. Yüce. 2020. 'Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents', *Pharmaceutics*, 12.
- Kumar, R., M. Afsar, N. Khandelwal, Y. Chander, T. Riyesh, R. K. Dedar, B. R. Gulati, Y. Pal, S. Barua, B. N. Tripathi, T. Hussain, and N. Kumar. 2021. 'Emetine suppresses

- SARS-CoV-2 replication by inhibiting interaction of viral mRNA with eIF4E', *Antiviral Res*, 189: 105056.
- Kumar, R., N. Khandelwal, R. Thachamvally, B. N. Tripathi, S. Barua, S. K. Kashyap, S. Maherchandani, and N. Kumar. 2018. 'Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication', *Virus Res*, 253: 48-61.
- Kwegyir-Afful, A. K., R. D. Bruno, P. Purushottamachar, F. N. Murigi, and V. C. Njar. 2016. 'Galeterone and VNPT55 disrupt Mnk-eIF4E to inhibit prostate cancer cell migration and invasion', *Febs j*, 283: 3898-918.
- Landi, L., and F. Cappuzzo. 2015. 'Experience with erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer', *Ther Adv Respir Dis*, 9: 146-63.
- Langevin, S. M., R. A. Kratzke, and K. T. Kelsey. 2015. 'Epigenetics of lung cancer', *Transl Res*, 165: 74-90.
- 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: 544-7.
- Li, C., H. Wang, Y. Jiang, W. Fu, X. Liu, R. Zhong, B. Cheng, F. Zhu, Y. Xiang, J. He, and W. Liang. 2022. 'Advances in lung cancer screening and early detection', *Cancer Biol Med*, 19: 591-608.
- Lim, S., T. Y. Saw, M. Zhang, M. R. Janes, K. Nacro, J. Hill, A. Q. Lim, C. T. Chang, D. A. Fruman, D. A. Rizzieri, S. Y. Tan, H. Fan, C. T. Chuah, and S. T. Ong. 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: E2298-307.
- 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: 1539-55.
- Liu, Y., L. Sun, X. Su, and S. Guo. 2016. 'Inhibition of eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation by cercosporamide selectively suppresses angiogenesis, growth and survival of human hepatocellular carcinoma', *Biomed Pharmacother*, 84: 237-43.
- Maimon, A., M. Mogilevsky, A. Shilo, R. Golan-Gerstl, A. Obiedat, V. Ben-Hur, I. Lebenthal-Loinger, I. Stein, R. Reich, J. Beenstock, E. Zehorai, C. L. Andersen, K. Thorsen, T. F. Ørntoft, R. J. Davis, B. Davidson, D. Mu, and R. Karni. 2014. 'Mnk2 alternative splicing modulates the p38-MAPK pathway and impacts Ras-induced transformation', *Cell Rep*, 7: 501-13.
- Makkinje, A., H. Xiong, M. Li, and Z. Damuni. 1995. 'Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insulin-stimulated protamine kinase', *J Biol Chem*, 270: 14824-8.
- Martineau, Y., R. Azar, C. Bousquet, and S. Pyronnet. 2013. 'Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins', *Oncogene*, 32: 671-7.

- Mayer, G. 2009. 'The chemical biology of aptamers', *Angew Chem Int Ed Engl*, 48: 2672-89.
- Mendonsa, S. D., and M. T. Bowser. 2004. 'In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis', *Anal Chem*, 76: 5387-92.
- Mi, J., Y. Liu, Z. N. Rabbani, Z. Yang, J. H. Urban, B. A. Sullenger, and B. M. Clary. 2010. 'In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs', *Nat Chem Biol*, 6: 22-4.
- Minich, W. B., M. L. Balasta, D. J. Goss, and R. E. Rhoads. 1994. 'Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 7668-72.
- Mohammad, R. M., I. Muqbil, L. Lowe, C. Yedjou, H. Y. Hsu, L. T. Lin, M. D. Siegelin, C. Fimognari, N. B. Kumar, Q. P. Dou, H. Yang, A. K. Samadi, G. L. Russo, C. Spagnuolo, S. K. Ray, M. Chakrabarti, J. D. Morre, H. M. Coley, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S. S. Ashraf, W. G. Helderich, X. Yang, C. S. Boosani, G. Guha, D. Bhakta, M. R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S. I. Mohammed, W. N. Keith, A. Bilsland, D. Halicka, S. Nowsheen, and A. S. Azmi. 2015. 'Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer', *Semin Cancer Biol*, 35 Suppl: S78-s103.
- Molina, J. R., P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, and A. A. Adjei. 2008. 'Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship', *Mayo Clin Proc*, 83: 584-94.
- Moreno, M., E. Rincón, D. Piñeiro, G. Fernández, A. Domingo, A. Jiménez-Ruiz, M. Salinas, and V. M. González. 2003. 'Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process', *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 214-8.
- Moy, J. K., A. Khoutorsky, M. N. Asiedu, B. J. Black, J. L. Kuhn, P. Barragán-Iglesias, S. Megat, M. D. Burton, C. C. Burgos-Vega, O. K. Melemedjian, S. Boitano, J. Vagner, C. G. Gkogkas, J. J. Pancrazio, J. S. Mogil, G. Dussor, N. Sonenberg, and T. J. Price. 2017. 'The MNK-eIF4E Signaling Axis Contributes to Injury-Induced Nociceptive Plasticity and the Development of Chronic Pain', *J Neurosci*, 37: 7481-99.
- Na, T. Y., L. Schecterson, A. M. Mendonsa, and B. M. Gumbiner. 2020. 'The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 5931-37.
- Nasim, F., B. F. Sabath, and G. A. Eapen. 2019. 'Lung Cancer', *Med Clin North Am*, 103: 463-73.
- Ng, E. W., D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, Jr., D. R. Guyer, and A. P. Adamis. 2006. 'Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease', *Nat Rev Drug Discov*, 5: 123-32.
- Ni, S., H. Yao, L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A. Lu, and G. Zhang. 2017. 'Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes', *Int J Mol Sci*, 18.

- Nicholson, A. G., M. S. Tsao, M. B. Beasley, A. C. Borczuk, E. Brambilla, W. A. Cooper, S. Dacic, D. Jain, K. M. Kerr, S. Lantuejoul, M. Noguchi, M. Papotti, N. Rekhtman, G. Scagliotti, P. van Schil, L. Sholl, Y. Yatabe, A. Yoshida, and W. D. Travis. 2022. 'The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015', *J Thorac Oncol*, 17: 362-87.
- Nimjee, S. M., R. R. White, R. C. Becker, and B. A. Sullenger. 2017. 'Aptamers as Therapeutics', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57: 61-79.
- Noorolyai, S., N. Shajari, E. Baghbani, S. Sadreddini, and B. Baradaran. 2019. 'The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer', *Gene*, 698: 120-28.
- Nowak, E., and I. Bednarek. 2021. 'Aspects of the Epigenetic Regulation of EMT Related to Cancer Metastasis', *Cells*, 10.
- O'Loughlen, A., V. M. González, T. Jurado, M. Salinas, and M. E. Martín. 2007. 'Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1416-27.
- O'Loughlen, A., V. M. Gonzalez, D. Pineiro, M. I. Perez-Morgado, M. Salinas, and M. E. Martin. 2004. 'Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1', *Exp Cell Res*, 299: 343-55.
- Ospina, J. D. 2020. 'Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology', *Biomedica*, 40: 148-65.
- Parra-Palau, J. L., G. C. Scheper, M. L. Wilson, and C. G. Proud. 2003. 'Features in the N and C termini of the MAPK-interacting kinase Mnk1 mediate its nucleocytoplasmic shuttling', *J Biol Chem*, 278: 44197-204.
- Parra, J. L., M. Buxadé, 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: 37623-33.
- Pashenkov, M. V., L. S. Balyasova, Y. A. Dagil, and B. V. Pinegin. 2017. 'The Role of the p38-MNK-eIF4E Signaling Axis in TNF Production Downstream of the NOD1 Receptor', *J Immunol*, 198: 1638-48.
- Pelletier, J., and N. Sonenberg. 1988. 'Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA', *Nature*, 334: 320-5.
- Pendharkar, D., B. V. Ausekar, and S. Gupta. 2013. 'Molecular biology of lung cancer-a review', *Indian J Surg Oncol*, 4: 120-4.
- Pereira, R. L., I. C. Nascimento, A. P. Santos, I. E. Y. Ogusuku, C. Lameu, G. Mayer, and H. Ulrich. 2018. 'Aptamers: novelty tools for cancer biology', *Oncotarget*, 9: 26934-53.
- 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: 1645-9.

- Pinto-Díez, C., R. Ferreras-Martín, R. Carrión-Marchante, V. M. González, and M. E. Martín. 2020. 'Deeping in the Role of the MAP-Kinases Interacting Kinases (MNKs) in Cancer', *Int J Mol Sci*, 21.
- Pinto-Díez, C., R. Ferreras-Martín, R. Carrión-Marchante, J. I. Klett-Mingo, M. García-Hernández, M. I. Pérez-Morgado, S. Sacristán, M. Barragán, M. Seijo-Vila, I. Tundidor, S. Blasco-Benito, E. Pérez-Gómez, I. Gómez-Pinto, C. Sánchez, C. González, V. M. González, and M. E. Martín. 2022. 'An optimized MNK1b aptamer, apMNKQ2, and its potential use as a therapeutic agent in breast cancer', *Molecular Therapy - Nucleic Acids*.
- Pinto-Díez, C., E. M. García-Recio, M. I. Pérez-Morgado, M. García-Hernández, L. Sanz-Criado, S. Sacristán, M. V. Toledo-Lobo, B. Pérez-Mies, I. Esteban-Rodríguez, A. Pascual, M. Garcia-Villanueva, N. Martínez-Jañez, V. M. González, and M. E. Martín. 2018. 'Increased expression of MNK1b, the spliced isoform of MNK1, predicts poor prognosis and is associated with triple-negative breast cancer', *Oncotarget*, 9: 13501-16.
- Polonschii, C., S. David, S. Tombelli, M. Mascini, and M. Gheorghiu. 2010. 'A novel low-cost and easy to develop functionalization platform. Case study: aptamer-based detection of thrombin by surface plasmon resonance', *Talanta*, 80: 2157-64.
- Poolsup, S., and C. Y. Kim. 2017. 'Therapeutic applications of synthetic nucleic acid aptamers', *Curr Opin Biotechnol*, 48: 180-86.
- Proud, C. G. 2015. 'Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1849: 766-73.
- Puck, T. T., and P. I. Marcus. 1956. 'Action of x-rays on mammalian cells', *J Exp Med*, 103: 653-66.
- Puisieux, A., T. Brabletz, and J. Caramel. 2014. 'Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors', *Nat Cell Biol*, 16: 488-94.
- Pyronnet, S., H. Imataka, A. C. Gingras, R. Fukunaga, T. Hunter, and N. Sonenberg. 1999. 'Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E', *EMBO J*, 18: 270-9.
- Raddatz, M. S., A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, and G. Mayer. 2008. 'Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting', *Angew Chem Int Ed Engl*, 47: 5190-3.
- Rafehi, H., C. Orlowski, G. T. Georgiadis, K. Ververis, A. El-Osta, and T. C. Karagiannis. 2011. 'Clonogenic assay: adherent cells', *J Vis Exp*.
- Ramalingam, S., L. Gediya, A. K. Kwegyir-Afful, V. P. Ramamurthy, P. Purushottamachar, H. Mbatia, and V. C. Njar. 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: 530-43.

- Ramalingam, S., V. P. Ramamurthy, L. K. Gediya, F. N. Murigi, P. Purushottamachar, W. Huang, E. Y. Choi, Y. Zhang, T. S. Vasaitis, M. A. Kane, R. G. Lapidus, and V. C. O. Njar. 2019. 'The Novel Mnk1/2 Degradar and Apoptosis Inducer VNLG-152 Potently Inhibits TNBC Tumor Growth and Metastasis', *Cancers (Basel)*, 11.
- Ramamurthy, V. P., S. Ramalingam, L. K. Gediya, and V. C. O. Njar. 2018. 'The retinamide VNLG-152 inhibits f-AR/AR-V7 and MNK-eIF4E signaling pathways to suppress EMT and castration-resistant prostate cancer xenograft growth', *Febs j*, 285: 1051-63.
- Raso, M. G., N. Bota-Rabassedas, and Wistuba, II. 2021. 'Pathology and Classification of SCLC', *Cancers (Basel)*, 13.
- Raught, B., A. C. Gingras, S. P. Gygi, H. Imataka, S. Morino, A. Gradi, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 2000. 'Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G1', *EMBO J*, 19: 434-44.
- Reich, S. H., P. A. Sprengeler, G. G. Chiang, J. R. Appleman, J. Chen, J. Clarine, B. Eam, J. T. Ernst, Q. Han, V. K. Goel, E. Z. R. Han, V. Huang, I. N. J. Hung, A. Jemison, K. A. Jessen, J. Molter, D. Murphy, M. Neal, G. S. Parker, M. Shaghafi, S. Sperry, J. Staunton, C. R. Stumpf, P. A. Thompson, C. Tran, S. E. Webber, C. J. Wegerski, H. Zheng, and K. R. Webster. 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: 3516-40.
- Robichaud, N., S. V. del Rincon, B. Huor, T. Alain, L. A. Petruccelli, J. Hearnden, C. Goncalves, S. Grotegut, C. H. Spruck, L. Furic, O. Larsson, W. J. Muller, W. H. Miller, and N. Sonenberg. 2015. 'Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3', *Oncogene*, 34: 2032-42.
- Robichaud, N., B. E. Hsu, R. Istomine, F. Alvarez, J. Blagih, E. H. Ma, S. V. Morales, D. L. Dai, G. Li, M. Souleimanova, Q. Guo, S. V. Del Rincon, W. H. Miller, Jr., Y. Cajal S. Ramón, M. Park, R. G. Jones, C. A. Piccirillo, P. M. Siegel, and N. Sonenberg. 2018. 'Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E2202-e09.
- Rossi, A., and M. Di Maio. 2016. 'Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles', *Expert Rev Anticancer Ther*, 16: 653-60.
- Rousseau, D., R. Kaspar, I. Rosenwald, L. Gehrke, and N. Sonenberg. 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: 1065-70.
- Rowlett, R. M., C. A. Chrestensen, M. Nyce, M. G. Harp, J. W. Pelo, F. Cominelli, P. B. Ernst, T. T. Pizarro, T. W. Sturgill, and M. T. Worthington. 2008. 'MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294: G452-9.

- Ruiz Ciancio, D., M. R. Vargas, W. H. Thiel, M. A. Bruno, P. H. Giangrande, and M. B. Mestre. 2018. 'Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer', *Pharmaceuticals (Basel)*, 11.
- Sansook, S., E. Lineham, S. Hassell-Hart, G. J. Tizzard, S. J. Coles, J. Spencer, and S. J. Morley. 2018. 'Probing the Anticancer Action of Novel Ferrocene Analogues of MNK Inhibitors', *Molecules*, 23.
- Santag, S., F. Siegel, A. M. Wengner, C. Lange, U. Bömer, K. Eis, F. Pühler, P. Lienau, L. Bergemann, M. Michels, F. von Nussbaum, D. Mumberg, and K. Petersen. 2017. 'BAY 1143269, a novel MNK1 inhibitor, targets oncogenic protein expression and shows potent anti-tumor activity', *Cancer Lett*, 390: 21-29.
- Scheper, G. C., J. L. Parra, M. Wilson, B. Van Kollenburg, A. C. Vertegaal, Z. G. Han, and C. G. Proud. 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: 5692-705.
- Scheper, G. C., and C. G. Proud. 2002. 'Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation?', *Eur J Biochem*, 269: 5350-9.
- Scheper, G. C., B. van Kollenburg, J. Hu, Y. Luo, D. J. Goss, and C. G. Proud. 2002. 'Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA', *J Biol Chem*, 277: 3303-9.
- Seidel, P., Q. Sun, L. Costa, D. Lardinois, M. Tamm, and M. Roth. 2016. 'The MNK-1/eIF4E pathway as a new therapeutic pathway to target inflammation and remodelling in asthma', *Cell Signal*, 28: 1555-62.
- Shahbazian, D., P. P. Roux, V. Mieulet, M. S. Cohen, B. Raught, J. Taunton, J. W. Hershey, J. Blenis, M. Pende, and N. Sonenberg. 2006. 'The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity', *EMBO J*, 25: 2781-91.
- Shi, Y., P. Frost, B. Hoang, Y. Yang, R. Fukunaga, J. Gera, and A. Lichtenstein. 2013. 'MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells', *Oncogene*, 32: 190-7.
- Shi, Y., A. Sharma, H. Wu, A. Lichtenstein, and J. Gera. 2005. 'Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway', *J Biol Chem*, 280: 10964-73.
- Shiers, S., J. Mwirigi, G. Pradhan, M. Kume, B. Black, P. Barragan-Iglesias, J. K. Moy, G. Dussor, J. J. Pancrazio, S. Kroener, and T. J. Price. 2020. 'Reversal of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain and cognitive dysfunction via genetic and tomivosertib targeting of MNK', *Neuropsychopharmacology*, 45: 524-33.
- Shigdar, S., B. Schrand, P. H. Giangrande, and V. de Franciscis. 2021. 'Aptamers: Cutting edge of cancer therapies', *Mol Ther*, 29: 2396-411.

- Shimada, N., I. Rios, H. Moran, B. Sayers, and K. Hubbard. 2009. 'p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts', *RNA Biol*, 6: 293-304.
- Shveygert, M., C. Kaiser, S. S. Bradrick, and M. Gromeier. 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: 5160-7.
- Slentz-Kesler, K., J. T. Moore, M. Lombard, J. Zhang, R. Hollingsworth, and M. P. Weiner. 2000. 'Identification of the human Mnk2 gene (MKNK2) through protein interaction with estrogen receptor beta', *Genomics*, 69: 63-71.
- Socinski, M. A., C. Obasaju, D. Gandara, F. R. Hirsch, P. Bonomi, P. A. Bunn, Jr., E. S. Kim, C. J. Langer, R. B. Natale, S. Novello, L. Paz-Ares, M. Pérol, M. Reck, S. S. Ramalingam, C. H. Reynolds, D. R. Spigel, H. Wakelee, and N. Thatcher. 2018. 'Current and Emergent Therapy Options for Advanced Squamous Cell Lung Cancer', *J Thorac Oncol*, 13: 165-83.
- Stead, R. L., and C. G. Proud. 2013. 'Rapamycin enhances eIF4E phosphorylation by activating MAP kinase-interacting kinase 2a (Mnk2a)', *FEBS Lett*, 587: 2623-8.
- Steurer, M., M. Montillo, L. Scarfò, F. R. Mauro, J. Andel, S. Wildner, L. Trentin, A. Janssens, S. Burgstaller, A. Frömmling, T. Dümmler, K. Riecke, M. Baumann, D. Beyer, S. Vauléon, P. Ghia, R. Foà, F. Caligaris-Cappio, and M. Gobbi. 2019. 'Olaptesed pegol (NOX-A12) with bendamustine and rituximab: a phase IIa study in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia', *Haematologica*, 104: 2053-60.
- Suarez, M., G. T. Blyth, A. A. Mina, E. M. Kosciuczuk, B. Dolniak, S. Dinner, J. K. Altman, E. A. Eklund, D. Saleiro, E. M. Beauchamp, and L. C. Platanius. 2021. 'Inhibitory effects of Tomivosertib in acute myeloid leukemia', *Oncotarget*, 12: 955-66.
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray. 2021. 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA Cancer J Clin*, 71: 209-49.
- Svobodová, M., A. Pinto, P. Nadal, and O' Sullivan CK. 2012. 'Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes', *Anal Bioanal Chem*, 404: 835-42.
- Tan, A. C. 2020. 'Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)', *Thorac Cancer*, 11: 511-18.
- Tan, W., M. J. Donovan, and J. Jiang. 2013. 'Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications', *Chem Rev*, 113: 2842-62.
- Teo, T., Y. Yang, M. Yu, S. K. Basnet, T. Gillam, J. Hou, R. M. Schmid, M. Kumarasiri, S. Diab, H. Albrecht, M. J. Sykes, and S. Wang. 2015. 'An integrated approach for discovery of highly potent and selective Mnk inhibitors: Screening, synthesis and SAR analysis', *Eur J Med Chem*, 103: 539-50.

- Thai, A. A., B. J. Solomon, L. V. Sequist, J. F. Gainor, and R. S. Heist. 2021. 'Lung cancer', *Lancet*, 398: 535-54.
- Tian, S., X. Wang, and C. G. Proud. 2017. 'Oncogenic MNK signalling regulates the metastasis suppressor NDRG1', *Oncotarget*, 8: 46121-35.
- 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: 8639-42.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal. 2015. 'Global cancer statistics, 2012', *CA Cancer J Clin*, 65: 87-108.
- Travis, W. D., E. Brambilla, A. G. Nicholson, Y. Yatabe, J. H. M. Austin, M. B. Beasley, L. R. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. B. Flieder, K. Geisinger, F. R. Hirsch, Y. Ishikawa, K. M. Kerr, M. Noguchi, G. Pelosi, C. A. Powell, M. S. Tsao, and I. Wistuba. 2015. 'The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification', *J Thorac Oncol*, 10: 1243-60.
- Tschopp, C., U. Knauf, M. Brauchle, M. Zurini, P. Ramage, D. Glueck, L. New, J. Han, and H. Gram. 2000. 'Phosphorylation of eIF-4E on Ser 209 in response to mitogenic and inflammatory stimuli is faithfully detected by specific antibodies', *Mol Cell Biol Res Commun*, 3: 205-11.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. 'Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase', *Science*, 249: 505-10.
- Ueda, T., M. Sasaki, A. J. Elia, Chio, II, K. Hamada, R. Fukunaga, and T. W. Mak. 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: 13984-90.
- Ueda, T., R. Watanabe-Fukunaga, H. Fukuyama, S. Nagata, and R. Fukunaga. 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: 6539-49.
- Wan, Y., Y. T. Kim, N. Li, S. K. Cho, R. Bachoo, A. D. Ellington, and S. M. Iqbal. 2010. 'Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology', *Cancer Res*, 70: 9371-80.
- Wang, H., C. Wu, S. Wan, H. Zhang, S. Zhou, and G. Liu. 2013. 'Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin  $\beta$ 1 expression and the ERK1/2 signaling pathway', *Toxicology*, 308: 104-12.
- Wang, S., B. Li, B. Liu, M. Huang, D. Li, L. Guan, J. Zang, D. Liu, and L. Zhao. 2018. 'Design and synthesis of novel 6-hydroxy-4-methoxy-3-methylbenzofuran-7-carboxamide derivatives as potent Mnks inhibitors by fragment-based drug design', *Bioorg Med Chem*, 26: 4602-14.

- Wang, X., Y. Wang, Q. Zhang, H. Zhuang, and B. Chen. 2018. 'MAP Kinase-Interacting Kinase 1 Promotes Proliferation and Invasion of Hepatocellular Carcinoma and Is an Unfavorable Prognostic Biomarker', *Med Sci Monit*, 24: 1759-67.
- Wang, X., P. Yue, C. B. Chan, K. Ye, T. Ueda, R. Watanabe-Fukunaga, R. Fukunaga, H. Fu, F. R. Khuri, and S. Y. Sun. 2007. 'Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation', *Mol Cell Biol*, 27: 7405-13.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud, and J. A. Cooper. 1997. 'Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2', *EMBO J*, 16: 1909-20.
- Waskiewicz, A. J., J. C. Johnson, B. Penn, M. Mahalingam, S. R. Kimball, and J. A. Cooper. 1999. 'Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo', *Mol Cell Biol*, 19: 1871-80.
- Wen, Q., W. Wang, J. Luo, S. Chu, L. Chen, L. Xu, H. Zang, M. M. Alnemah, J. Ma, and S. Fan. 2016. 'CGP57380 enhances efficacy of RAD001 in non-small cell lung cancer through abrogating mTOR inhibition-induced phosphorylation of eIF4E and activating mitochondrial apoptotic pathway', *Oncotarget*, 7: 27787-801.
- Wen, Q., Y. Zhan, H. Zheng, H. Zang, J. Luo, Y. Zhang, W. Wang, J. Feng, J. Lu, L. Chen, and S. Fan. 2019. 'Elevated expression of mcl-1 inhibits apoptosis and predicts poor prognosis in patients with surgically resected non-small cell lung cancer', *Diagn Pathol*, 14: 108.
- Wendel, H. G., R. L. Silva, A. Malina, J. R. Mills, H. Zhu, T. Ueda, R. Watanabe-Fukunaga, R. Fukunaga, J. Teruya-Feldstein, J. Pelletier, and S. W. Lowe. 2007. 'Dissecting eIF4E action in tumorigenesis', *Genes Dev*, 21: 3232-7.
- 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: 728-35.
- Wieleba, I., K. Wojas-Krawczyk, and P. Krawczyk. 2020. 'Aptamers in Non-Small Cell Lung Cancer Treatment', *Molecules*, 25.
- Worch, J., L. Tickenbrock, J. Schwäble, B. Steffen, T. Cauvet, B. Mlody, H. Buerger, H. P. Koeffler, W. E. Berdel, H. Serve, and C. Müller-Tidow. 2004. 'The serine-threonine kinase MNK1 is post-translationally stabilized by PML-RARalpha and regulates differentiation of hematopoietic cells', *Oncogene*, 23: 9162-72.
- Xie, J., K. Shen, A. T. Jones, J. Yang, A. R. Tee, M. H. Shen, M. Yu, S. Irani, D. Wong, J. E. Merrett, R. V. Lenchine, S. De Poi, K. B. Jensen, P. J. Trim, M. F. Snel, M. Kamei, S. K. Martin, S. Fitter, S. Tian, X. Wang, L. M. Butler, A. C. W. Zannettino, and C. G. Proud. 2020. 'Reciprocal signaling between mTORC1 and MNK2 controls cell growth and oncogenesis', *Cell Mol Life Sci*, 78: 249-70.
- Xu, W., S. Kannan, C. S. Verma, and K. Nacro. 2022. 'Update on the Development of MNK Inhibitors as Therapeutic Agents', *J Med Chem*, 65: 983-1007.

- Yang, W., E. Khoury, Q. Guo, S. A. Prabhu, A. Emond, F. Huang, C. Gonçalves, Y. Zhan, D. Plourde, J. N. Nichol, M. S. Dahabieh, W. H. Miller, Jr., and S. V. Del Rincón. 2020. 'MNK1 signaling induces an ANGPTL4-mediated gene signature to drive melanoma progression', *Oncogene*, 39: 3650-65.
- Yang, X., W. Zhong, and R. Cao. 2020. 'Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer', *Cell Signal*, 73: 109689.
- Yu, M., P. Li, S. K. Basnet, M. Kumarasiri, S. Diab, T. Teo, H. Albrecht, and S. Wang. 2015. 'Discovery of 4-(dihydropyridinon-3-yl)amino-5-methylthieno[2,3-d]pyrimidine derivatives as potent Mnk inhibitors: synthesis, structure-activity relationship analysis and biological evaluation', *Eur J Med Chem*, 95: 116-26.
- Yuan, M., L. L. Huang, J. H. Chen, J. Wu, and Q. Xu. 2019. 'The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer', *Signal Transduct Target Ther*, 4: 61.
- Zamay, T. N., G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, R. A. Zukov, M. M. Petrova, A. Gargaun, M. V. Berezovski, and A. S. Kichkailo. 2017. 'Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer', *Cancers (Basel)*, 9.
- Zeller, K. S., O. Idevall-Hagren, A. Stefansson, T. Velling, S. P. Jackson, J. Downward, A. Tengholm, and S. Johansson. 2010. 'PI3-kinase p110 $\alpha$  mediates  $\beta$ 1 integrin-induced Akt activation and membrane protrusion during cell attachment and initial spreading', *Cell Signal*, 22: 1838-48.
- Zhan, Y., J. Guo, W. Yang, C. Goncalves, T. Rzymiski, A. Dreas, E. Żyłkiewicz, M. Mikulski, K. Brzózka, A. Golas, Y. Kong, M. Ma, F. Huang, B. Huor, Q. Guo, S. D. da Silva, J. Torres, Y. Cai, I. Topisirovic, J. Su, K. Bijian, M. A. Alaoui-Jamali, S. Huang, F. Journe, G. E. Ghanem, W. H. Miller, Jr., and S. V. Del Rincón. 2017. 'MNK1/2 inhibition limits oncogenicity and metastasis of KIT-mutant melanoma', *J Clin Invest*, 127: 4179-92.
- Zhang, H., S. Guttikonda, L. Roberts, T. Uziel, D. Semizarov, S. W. Elmore, J. D. Levenson, and L. T. Lam. 2011. 'Mcl-1 is critical for survival in a subgroup of non-small-cell lung cancer cell lines', *Oncogene*, 30: 1963-8.
- Zhang, N., Z. Chen, D. Liu, H. Jiang, Z. K. Zhang, A. Lu, B. T. Zhang, Y. Yu, and G. Zhang. 2021. 'Structural Biology for the Molecular Insight between Aptamers and Target Proteins', *Int J Mol Sci*, 22.
- Zhang, Y., B. S. Lai, and M. Juhas. 2019. 'Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications', *Molecules*, 24.
- Zhang, Y., H. Zhang, D. W. H. Chan, Y. Ma, A. Lu, S. Yu, B. Zhang, and G. Zhang. 2022. 'Strategies for developing long-lasting therapeutic nucleic acid aptamer targeting circulating protein: The present and the future', *Front Cell Dev Biol*, 10: 1048148.
- Zhou, J., and J. Rossi. 2017. 'Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges', *Nat Rev Drug Discov*, 16: 181-202.

- Zhuo, Z., Y. Yu, M. Wang, J. Li, Z. Zhang, J. Liu, X. Wu, A. Lu, G. Zhang, and B. Zhang. 2017. 'Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine', *Int J Mol Sci*, 18.
- Zuberek, J., A. Wyslouch-Cieszynska, A. Niedzwiecka, M. Dadlez, J. Stepinski, W. Augustyniak, A. C. Gingras, Z. Zhang, S. K. Burley, N. Sonenberg, R. Stolarski, and E. Darzynkiewicz. 2003. 'Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein', *Rna*, 9: 52-61.