

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Mecanismo de acción de un aptámero frente a MNK1 en
cáncer de mama**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Ferreras Martín

Directora

M.^a Elena Martín Palma

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Mecanismo de acción de un aptámero frente a MNK1 en cáncer de mama

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel Ferreras Martín

DIRECTORA

M.^a Elena Martín Palma

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA

MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

Mecanismo de acción de un aptámero frente a MNK1
en cáncer de mama

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Ferreras Martín

Directora

M.^a Elena Martín Palma

Madrid, 2023

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) del Hospital Ramón y Cajal con la financiación aportada por el Ministerio de Ciencia e Innovación con el proyecto “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 gracias a un contrato predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU19/02929) y a un contrato predoctoral de la Comunidad de la Madrid (PEJD-2017-PRE/BMD-4416).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han publicado dos artículos científicos, que recogen parte de los resultados obtenidos, y una revisión bibliográfica:

1. Pinto-Díez C, Ferreras-Martín R, Carrión-Marchante R, Klett-Mingo JI, García-Hernández M, Pérez-Morgado MI, et al. An optimized MNK1b aptamer, apMNKQ2, and its potential use as a therapeutic agent in breast cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Dec; 30:553–68.
2. Mulens-Arias V, Portilla Y, Pérez-Yagüe S, Ferreras-Martín R, Martín ME, González VM, et al. An electrostatically conjugated-functional MNK1 aptamer reverts the intrinsic antitumor effect of polyethyleneimine-coated iron oxide nanoparticles in vivo in a human triple-negative cancer xenograft. *Cancer Nanotechnol*. 2023 Dec 14;14(1):64.
3. 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;21(8).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido, cada uno a su manera, a que este trabajo fuera posible.

Gracias a ti, Elena, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por todo lo que me has enseñado en nuestras charlas científicas y por tener la puerta siempre abierta, fuera la hora que fuera, para resolver cualquier duda o darle vueltas a cada nuevo problema (que no han sido pocos). Gracias por guiarme de la mejor manera posible y a la vez, darme autonomía e independencia para llevar a cabo mi trabajo. Gracias a ti también, Víctor, por tu pragmatismo y por estar ahí siempre para lo que fuera necesario. A los dos, por ser los jefes más amables y comprensivos que podía encontrar.

Gracias a todo el personal del Hospital Universitario Ramón y Cajal que ha colaborado en este proyecto y a todos aquellos compañeros y amigos del departamento que me han echado una mano durante estos años.

A los miembros de las UCAs de proteómica, genómica y bioinformática: el Dr. Alberto Alcázar González, la Dr. Emma Martínez Alonso, la Dr. Leticia Olavarrieta Scappini y a su técnico Miguel, por su apoyo científico y técnico en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros del grupo de aptámeros y, en concreto, a los seniors del grupo, Gero y Ana, por vuestros buenos consejos, y Silvi, por acogerme bajo tu ala desde el primer día y hacerme saber que siempre podía contar contigo (y con tu laboratorio como refugio). Ojalá los laboratorios contaran con más gente que, como tú, se implica de manera tan personal a la hora de resolver, codo con codo, cualquier clase de problema. Mención aparte se merecen las nuevas incorporaciones, que son un soplo de aire fresco más que necesario: Laura, por tu determinación a la hora de hacer las cosas y buen rollo y Manu, por tu contagioso entusiasmo y ganas de echarle horas. No me cabe duda de que vais a arrasarlo con todo lo que os proponáis.

A mis compis de despacho, que han hecho infinitamente más ameno cada día en el laboratorio. Valerio, por conseguir que me sintiera integrada desde que llegué. Alex, porque juntos dejamos un legado más importante que nuestras tesis y que permanecerá más allá de nosotros: el pulmón verde del laboratorio (o un pote y tres plantas más o menos moribundas, según quien lo mire). Lorena, compi de equipo y de introversión, mola mucho tener a alguien con quien me entienda tanto. Emma, para mí eres un ejemplo para seguir como científica. Además de ayudarme en lo personal y en lo profesional con tu mejor disposición y tu buena mano, has sabido ver mi potencial como nadie y me has enseñado el valor de hacer un buen trabajo en el laboratorio. Y, aunque no pertenece al despacho, pero ha pasado mucho tiempo allí, Carlitos, por tus ideas brillantes, tus dramas y tu compañía de tarde noche en el hospital.

Fuera del laboratorio, quería agradecer a amigos y familiares todo el apoyo que me han mostrado y, sobre todo, los buenos momentos que hemos pasado juntos, que han sido un respiro para poder continuar. A mi querida Comisión de Apuntes (Ro, Carmen y David) porque habéis sido la mejor compañía para desesperarse en tiempos de exámenes y lo seguís siendo en cada nueva

etapa. A mis amigos de siempre. Nati, por todos los recuerdos que guardamos juntas de otros tiempos y los nuevos que vendrán. Olga y Carla, porque, aunque siempre nos separan cientos de km, me acuerdo mucho de vosotras y aprecio cada minuto que conseguimos reunirnos. Adri, porque tus mensajes de ánimo los lunes por la mañana me han empujado a sacar adelante cada semana y tus discursos filosóficos, a ver las cosas desde otra perspectiva. Y a la última incorporación, mi equipo de vóley, que no se imagina lo que me ha ayudado a desconectar y a tomarme un descanso durante este último año de escritura.

Entre mi familia, quería destacar a mis padres, a mi hermano y a mi tita Conchi, que siempre han tenido más certeza que yo de que terminaría cada etapa que empezaba. Gracias por los valores con los que me habéis educado y por todo el esfuerzo que habéis invertido en mí. He tenido la suerte de contar con vuestra ayuda y comprensión todos los días (y con comidas cada domingo que me han sacado de más de un apuro). Habéis hecho posible que llegue hasta aquí y espero que os sintáis orgullosos.

Y por último a Albert, compañero de tonterías y origen de mis mejores carcajadas. Me siento muy afortunada de haber coincidido contigo. Sé que no hace falta que te lo diga, pero gracias por tu apoyo, por animarme a seguir y por aguantarme cada día por muy pesada que fuera. Esta tesis no sería ni la mitad de lo que es si no hubiéramos trabajado mano a mano juntos.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	17
1. Cáncer	19
1.1. Biología del cáncer de mama	19
1.2. La traducción de proteínas como diana terapéutica en cáncer	20
2. MNKs: quinasas que interaccionan con MAPK	21
3. Sustratos de MNK	24
3.1. eIF4E	24
3.2. Sprouty (Spry2)	26
3.3. Ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 (hnRNP A1)	27
3.4. Factor de <i>splicing</i> asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF)	27
3.5. Fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2)	28
4. MNKs en cáncer	28
4.1. Expresión e implicación de MNK en cáncer	28
4.2. Expresión e implicación de eIF4E en cáncer	30
4.3. Mecanismos de MNK en cáncer	32
4.3.1 Traducción de mRNAs específicos	32
4.3.2. Transporte entre núcleo citoplasma	34
4.3.3. Modulación de la señalización de mTORC1	35
4.3.3.1. mTOR: señalización y relevancia en cáncer	35
4.3.3.2. Interacción entre las rutas de MNK y mTOR	35
4.3.3.3. Resistencia a rapamicina mediada por MNK/eIF4E y combinación de inhibidores	36
4.3.5. Traducción dependiente de IRES	37
4.4. Inhibidores de MNK en cáncer	38
4.4.1 Combinación con otros fármacos	41
5. Proteínas reguladas por MNK en cáncer	42
5.1. MNK y apoptosis	42
5.1.1. Familia Bcl-2: MCL1	42

5.1.2. Familia de Inhibidores de la apoptosis (IAPs)	43
5.2. MNK y proliferación.....	44
5.2.1 Proteínas relacionadas con ciclo celular: Ciclinas y CDKs	44
5.2.2. c-Myc.....	45
5.2.3. β -catenina.....	46
5.3. MNK y metástasis	47
5.3.1 Marcadores EMT	47
5.3.2 Interacción con la ruta de TGF β	49
5.3.3 NDRG1.....	49
5.3.4 NODAL.....	50
5.3.5 ANGPTL4 y NGFR.....	50
5.4. MNK y angiogénesis.....	51
5.5. MNK y respuesta inmune	51
6. Aptámeros	52
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1. Cultivos celulares	63
1.1. Líneas celulares, mantenimiento y siembra.....	63
1.3. Transfección de células	64
1.4. Ensayos de viabilidad celular (MTT).....	65
1.5. Ensayos de migración por herida.....	65
1.6. Ensayos de migración e invasión en Transwell	66
1.7. Ensayos de adhesión celular	66
1.8. Tratamientos farmacológicos y con TGF β de líneas celulares	67
1.8.1. MG132.....	67
1.8.2. Everolimus: estudio de combinación de fármacos	67
1.8.3. TGF β	68
1.8.4. GSK-650394	68
2. Procesamiento de muestras.....	68
2.1. Extracción de proteínas	68
2.2. Extracción de RNA.....	69
3. Técnicas de análisis	69
3.1. Análisis de la expresión de proteínas por Western blot.....	69

3.2. Isoelectroenfoque	71
3.3. Análisis de la expresión de mRNAs mediante qPCR	72
3.4. Inmunoprecipitación	73
3.5. Cromatografía de afinidad con m ⁷ GTP-sefarsa	74
3.6. Zimogramas	74
3.7. Inmunocitoquímica	74
3.8. Actividad fosfoglicerato mutasa (PGAM) en lisados celulares	75
3.9. Valoración de la síntesis global de proteínas	76
3.10. Análisis de la expresión diferencial de proteínas por técnicas proteómicas	76
3.10.1. Electroforesis bidimensional 2D-DIGE	76
3.10.2. Digestión de proteínas	78
3.10.3. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	78
3.11. Análisis del perfil de ribosomas (Riboseq)	79
3.11.1. Extracción de fragmentos de RNA protegidos por ribosomas	79
3.11.2. Generación de librerías y secuenciación	81
3.12. Análisis de la expresión diferencial de mRNAs (RNAseq)	82
3.13. Análisis de datos	83
3.13.1. Procesamiento de datos de RNAseq/riboseq	83
3.13.2. Análisis de enriquecimiento	84
3.13.3. Análisis de interacciones entre proteínas	84
4. Mutagénesis dirigida del gen de NDRG1 en el plásmido pcDNA3	85
4.1. Digestión de DNA con enzimas de restricción	86
4.2. Ligación de DNA	87
4.3. Transformación de bacterias y purificación de plásmidos	87
5. Estadística	87
RESULTADOS	89
1. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre MNK1 y sus sustratos	91
1.1. Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de sustratos de MNK	91
1.2. Efecto de apMNKQ2 sobre las isoformas de MNK1	94
1.2.1. Regulación de MNK1 por miRNAs en presencia de apMNKQ2	95
1.2.2. Estudio de la degradación de MNK1 por el proteasoma en presencia de apMNKQ2	96
2. Efecto de apMNKQ2 tras la modulación de la expresión de MNK1	96

2.1. Efecto de apMNKQ2 tras la sobreexpresión de MNK1a	96
2.2. Efecto de apMNKQ2 tras el silenciamiento de MNK1 y MNK2.....	97
3. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la apoptosis de células de mama	99
3.1. Efecto de apMNKQ2 sobre proteínas antiapoptóticas reguladas por MNK.....	99
3.2. Estudio de la degradación de MCL1 y XIAP por el proteasoma en presencia de apMNKQ2	101
4. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la proliferación de células de mama.....	103
4.1. Efecto de apMNKQ2 sobre proteínas reguladas por MNK en proliferación.....	103
4.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la ruta de mTORC1 en presencia de everolimus	106
5. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad metastásica de células de mama	112
5.1. Efecto de apMNKQ2 sobre la transición epitelio mesénquima (EMT) inducida por TGFβ	112
5.2 Efecto de apMNKQ2 sobre marcadores EMT en la línea MDA-MB-231.....	116
5.3 Efecto de apMNKQ2 sobre NDRG1 y su implicación en la migración celular.....	117
5.3.1. Modulación de la fosforilación de NDRG1 en presencia de apMNKQ2.....	119
5.3.1.1. Inhibición de SGK1	119
5.3.1.2. Expresión transitoria de NDRG1 T346A.....	122
6. Estudio de las -ómicas en células de mama tratadas con apMNKQ2	125
6.1. Estudio del proteoma: análisis de los niveles de expresión diferencial de proteínas en células tratadas con apMNKQ2 por técnicas proteómicas	125
6.1.1. Estudio de la expresión de proteínas identificadas mediante inmunodetección	128
6.1.2. Análisis de interacciones y clasificación funcional de las proteínas identificadas..	130
6.1.3. Determinación de la actividad fosfoglicerato mutasa.....	132
6.2. Estudio del transcriptoma y translatoma: análisis de la expresión diferencial de mRNAs en células tratadas con apMNKQ2 por RNAseq y Riboseq	134
DISCUSIÓN	141
1. Modulación de los sustratos de MNK, rutas de apoptosis, proliferación y migración por apMNKQ2	143
1.1. Efecto de apMNKQ2 sobre las MNKs y sus sustratos	143
1.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la apoptosis.....	147
1.3. Efecto de apMNKQ2 sobre la proliferación.....	148
1.4. Efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad metastásica	150
2. Estudio de las -ómicas.....	154
2.1. Estudio del proteoma.....	154

2.2. Estudio del transcriptoma	156
3. Especificidad de apMNKQ2 y mecanismos de MNK1 alternativos a eIF4E	160
CONCLUSIONES.....	165
BIBLIOGRAFÍA.....	169
ANEXO.....	203

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación de las isoformas de MNK.....	24
Figura 2. Representación esquemática de la iniciación de la traducción dependiente de cap.....	25
Figura 3. Señalización de MNK.....	32
Figura 4. Proteínas reguladas por MNK.....	52
Figura 5. Esquema de la técnica SELEX.....	53
Figura 6. Acoplamiento de reacciones enzimáticas para determinar la actividad PGAM.....	75
Figura 7. Representación esquemática de la extracción de RPFs y la generación de librerías.....	81
Figura 8. Representación esquemática del proceso de mutagénesis dirigida mediante la generación de fragmentos solapantes.....	85
Figura 9. La fosforilación de eIF4E se incrementa temporalmente a las 4 h tras la transfección con los aptámeros y se reduce a partir de las 16 h en células tratadas con apMNKQ2.....	91
Figura 10. ApMNKQ2 afecta a la movilidad electroforética de spry2.....	92
Figura 11. ApMNKQ2 no afecta a la expresión, localización y fosforilación de hnRNPA1.....	93
Figura 12. ApMNKQ2 disminuye MNK1a y MNK1b a nivel de proteína.....	94
Figura 13. El efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de MNK1a no depende de la actividad de miR-7-5p.....	95
Figura 14. La expresión de MNK1 en presencia de apMNKQ2 podría estar regulada a nivel del proteasoma.....	96
Figura 15. La variación de los niveles de MNK1a inducida por apMNKQ2 no parece ser responsable de la inhibición de la viabilidad celular y capacidad de migración.....	97
Figura 16. Cuantificación de los niveles de las isoformas de MNK1 y MNK2 tras el silenciamiento con siRNAs.....	98
Figura 17. El silenciamiento de MNK1 no reduce la viabilidad de las células MDA-MB-231 y no potencia el efecto del aptámero, al contrario de lo que ocurre en las células MCF7.....	99

Figura 18. ApMNKQ2 disminuye los niveles de MCL1 y XIAP a tiempos cortos.....	100
Figura 19. ApMNKQ2 regula la expresión de MCL1 a nivel del proteasoma de forma parcial.....	102
Figura 20. ApMNKQ2 disminuye los niveles de XIAP independientemente de la inhibición del proteasoma.....	103
Figura 21. ApMNKQ2 disminuye la expresión de ciclina D1 y β -catenina a tiempos largos.....	104
Figura 22. ApMNKQ2 reduce la fosforilación y expresión de CDK2.....	105
Figura 23. ApMNKQ2 y everolimus ejercen un efecto sinérgico sobre la viabilidad celular.....	107
Figura 24. Estado de fosforilación de sustratos de mTORC1 y proteínas relacionadas con resistencia a la inhibición de mTORC1.....	108
Figura 25. Expresión de proteínas pro-supervivencia (XIAP) y proliferación (ciclina D1) en presencia de everolimus y apMNKQ2.....	109
Figura 26. ApMNKQ2 y everolimus incrementan la formación de complejos 4EBP1-eIF4E.....	110
Figura 27. ApMNKQ2 no afecta a la fosforilación de 4EBP1.....	111
Figura 28. Modelo de inducción de EMT por TGF β	113
Figura 29. Niveles de marcadores EMT y EMT-TFs en presencia de apMNKQ2 y TGF β	114
Figura 30. Expresión del mRNA de marcadores EMT y EMT-TFs en presencia de apMNKQ2 y TGF β	115
Figura 31. ApMNKQ2 modula la capacidad migratoria e invasiva inducida por TGF β	115
Figura 32. ApMNKQ2 reduce la actividad de la MMP2.....	116
Figura 33. Niveles de marcadores EMT y EMT-TFs en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2.....	117
Figura 34. ApMNKQ2 incrementa la fosforilación de NDRG1 sin afectar a sus niveles.....	118
Figura 35. ApMNKQ2 incrementa los niveles de proteína y mRNA de SGK1.....	119
Figura 36. SGK1 reduce la fosforilación de NDRG1 en presencia de apMNKQ2.....	120
Figura 37. SGK1 afecta levemente a la viabilidad celular.....	120
Figura 38. SGK1 reduce los efectos inhibitorios de apMNKQ2 sobre la migración y la adhesión celular.....	121
Figura 39. ApMNKQ2 produce cambios morfológicos y una reorganización del citoesqueleto que son parcialmente inhibidos por SGK1.....	122

Figura 40. Inmunodetección de NDRG1 y su fosforilación en las formas WT mutadas T346A y 346E.....	124
Figura 41. Expresión diferencial de los niveles de proteínas entre células tratadas con apMNKQ2 y células control.....	126
Figura 42. Variación de la expresión de proteínas 24 h tras la transfección con apMNKQ2.....	128
Figura 43. Inmunodetección de proteínas identificadas en 2D-DIGE.....	130
Figura 44. Interacciones entre las proteínas moduladas por apMNKQ2.....	131
Figura 45. ApMNKQ2 inhibe la actividad PGAM.....	132
Figura 46. La expresión de la cofilina S3A reduce parcialmente el efecto inhibitorio de apMNKQ2 sobre la migración en Transwell.....	134
Figura 47. Expresión diferencial de genes entre células control y tratadas con apMNKQ2 durante 4 h y 8 h.....	136
Figura 48. Análisis de enriquecimiento en GO, KEGG y Reactome.....	138
Figura 49. Interacciones entre las proteínas codificadas en los transcritos cuyos niveles se reducen con apMNKQ2.....	139
Figura 50. Representación gráfica de los cambios inducidos por apMNKQ2.....	160
Tabla 1. Inhibidores de MNK.....	40
Tabla 2. Valores del índice de combinación y tipo de interacción entre fármacos asociado.....	67
Tabla 3. Anticuerpos utilizados.....	71
Tabla 4. <i>Primers</i> utilizados en los ensayos de qPCR.....	73
Tabla 5. <i>Primers</i> utilizados en los ensayos de mutagénesis dirigida.....	86
Tabla 6. Identificación de proteínas moduladas por apMNKQ2.....	127
Tabla 7. Análisis Riboseq.....	135

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer diagnosticado con mayor frecuencia con una incidencia estimada de 2.3 millones de nuevos casos en el año 2020 y 685000 fallecidas. Los avances en las técnicas de diagnóstico y el desarrollo de nuevas terapias han mejorado el pronóstico para un elevado número de pacientes, aunque actualmente se carece de estrategias clínicas efectivas frente a algunos subtipos de cáncer más agresivos y para los estados metastásicos. Por ello, continúa siendo necesaria la búsqueda de proteínas diana implicadas en progresión tumoral y el desarrollo de nuevos fármacos que permitan abordar de manera más efectiva el tratamiento del cáncer de mama.

Las proteínas quinasas que interaccionan con MAP quinasa (MNKs) son activadas por ERK y p38, por lo que responden a una amplia variedad de estímulos extracelulares. En humanos, las MNKs están codificadas por dos genes (MKNK1 y MKNK2) que producen dos isoformas por *splicing* alternativo: MNK1a/MNK1b y MNK2a/MNK2b. Su sustrato mejor caracterizado es el factor de iniciación de la traducción eIF4E, aunque también se ha relacionado su actividad con la fosforilación de otras proteínas como hnNRPA1, Spry2, PSF, o cPLA2 y con la regulación de la actividad de mTORC1. Las MNKs se encuentran sobreexpresadas en distintos tipos tumorales y participan en desarrollo tumoral y metástasis a través del control de los niveles y actividad de proteínas implicadas en apoptosis (MCL1, XIAP, survivina), proliferación (Ciclinas, CDKs, c-Myc, β -catenina), migración y transición epitelio mesénquima (ZEB1, Snail, MMPs, NDRG1, NODAL, ANGPTL4), angiogénesis (VEGF) y respuesta inmune e inflamación (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF α , CCL2, CCL7, MCP-1).

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla (RNA o DNA) que se unen de forma estable y con una alta afinidad a una diana gracias a su capacidad para adquirir estructuras tridimensionales, lo que les convierte en herramientas con un alto potencial terapéutico y con ciertas ventajas sobre los anticuerpos. El aptámero apMNKQ2 frente a MNK1, seleccionado y caracterizado en nuestro laboratorio, es capaz de inhibir procesos de proliferación, migración e inducir apoptosis en líneas de cáncer de mama y reduce el tamaño tumoral en un modelo ortotópico de cáncer de mama triple-negativo en ratones.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de apMNKQ2, se ha estudiado el efecto del aptámero sobre los sustratos de MNK y proteínas reguladas por ésta en rutas claves de apoptosis, proliferación y migración y se ha realizado un análisis del proteoma y transcriptoma para determinar de forma global los procesos biológicos alterados.

En este trabajo se ha demostrado que apMNKQ2 disminuye el estado de fosforilación de eIF4E en paralelo a una disminución de los niveles de MNK1a y MNK1b, pero no afecta a otros sustratos como hnRNPA1 o spry2 ni a la actividad de mTORC1, a pesar de presentar un efecto sinérgico sobre la inhibición de la viabilidad celular con everolimus, inhibidor alostérico de mTORC1. A nivel de las proteínas reguladas por MNK, apMNKQ2 produce una disminución temprana de los niveles de las proteínas XIAP y MCL1 y modifica el estado de fosforilación de CDK2 y NDRG1,

mientras que a tiempos más largos reduce los niveles de las proteínas ciclina D1, β -catenina, CDK2 y ZEB1.

En un modelo de inducción de la transición epitelio mesénquima por TGF β , apMNKQ2 es capaz de reducir la migración y la invasión celular, de acuerdo con la disminución de factores de transcripción y marcadores mesenquimales. Además, el incremento en la fosforilación de la cofilina y la actividad de SGK1 inducidas por apMNKQ2 se han relacionado directamente con su actividad antimigratoria.

Por último, los estudios del proteoma y del transcriptoma han demostrado la alteración de proteínas y genes relacionados con metabolismo, citoesqueleto, proteostasis, angiogénesis, inflamación o migración, así como un conjunto de factores de transcripción relevantes en progresión tumoral.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed type of cancer, with an estimated incidence of 2.3 million new cases in 2020 and 685000 deaths. Advances in diagnostic tools and the development of new therapies have improved the prognosis for a large number of patients. However, effective clinical strategies are currently lacking for some aggressive cancer subtypes and metastatic stages. Therefore, the research of targets involved in tumor progression and the development of new drugs to more effectively treat breast cancer remains necessary.

The MAP kinase-interacting kinases (MNKs) are activated by ERK and p38, and as a result, they respond to a wide range of extracellular stimuli. In humans, two genes (MKNK1 and MKNK2) encode MNKs, which produce two isoforms through alternative splicing: MNK1a/MNK1b and MNK2a/MNK2b. Their best-characterized substrate is the translation initiation factor eIF4E, although their activity has also been associated with the phosphorylation of other proteins such as hnRNPA1, Spry2, PSF, cPLA2, and the regulation of mTORC1 activity. MNKs are overexpressed in various tumor types and play a role in oncogenesis and metastasis by controlling the levels and activity of proteins involved in apoptosis (MCL1, XIAP, survivin), proliferation (Cyclins, CDKs, c-myc, β -catenin), migration and epithelial-mesenchymal transition (ZEB1, Snail, MMPs, NDRG1, NODAL, ANGPTL4), angiogenesis (VEGF), immune response and inflammation (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF α , CCL2, CCL7, MCP-1).

Aptamers are single chain nucleic acids (DNA or RNA) that can bind to a target with high affinity and stability due to their ability to adopt three-dimensional structures. This makes them powerful tools with significant therapeutic potential and certain advantages over antibodies. The aptamer apMNKQ2 against MNK1, selected and characterized in our laboratory, has the ability to inhibit proliferation, migration, and induce apoptosis in breast cancer cells. Furthermore, it has shown efficacy in reducing tumor size in an orthotopic model of triple-negative breast cancer in mice.

In order to determine the mechanism of action of apMNKQ2, the effect of the aptamer on MNK substrates and MNK-regulated proteins involved in apoptosis, proliferation, and migration has been studied. Additionally, a comprehensive analysis of the proteome and transcriptome has been conducted to globally identify altered biological processes.

In this study we have demonstrated that apMNKQ2 decreases eIF4E phosphorylation concurrently with a reduction in the levels of MNK1a and MNK1b, but it does not affect other substrates such as hnRNPA1 or spry2, or the activity of mTORC1, despite showing a synergistic effect on cell viability inhibition in combination with everolimus, an allosteric inhibitor of mTORC1. Regarding the MNK-regulated proteins, apMNKQ2 induces an early downregulation of XIAP and MCL1 proteins and affects the phosphorylation state of CDK2 and NDRG1, while at longer term, it reduces the levels of cyclin D1, β -catenin, CDK2, and ZEB1 proteins.

In a model of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF β , apMNKQ2 is capable of reducing cell migration and invasion, as evidenced by the decrease in transcription factors and

mesenchymal markers. Furthermore, the increase in cofilin phosphorylation and SGK1 activity induced by apMNKQ2 has been directly associated with its antimigratory activity.

Finally, proteomic and transcriptomic analysis have revealed the modulation of proteins and genes related to metabolism, cytoskeleton, proteostasis, angiogenesis, inflammation, and migration, as well as a set of transcription factors relevant in tumor progression.

ABREVIATURAS

2D-DIGE Electroforesis en gel con diferencia de fluorescencia en dos dimensiones	BTK Tirosina quinasa de Bruton
2-PG 2-fosfoglicerato	BVA Análisis de variación biológica
3-PG 3-fosfoglicerato	C/EBP Proteínas de unión a CCAAT/enhancer
4EBPs Proteínas de unión a eIF4E	Cap Ácido 7-metilguanílico en el extremo 5' del mRNA
4E-T Transportador de eIF4E	c-Cbl <i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
ACTA2 α Actina de músculo esquelético	CCLs Ligandos de quimiocina
AKT Proteína quinasa B	CCTs Subunidades de la proteína 1 del complejo T
ANGPTL4 <i>Angiopoietin-like 4</i>	CDC25C <i>Cell Division Cycle 25C phosphatase</i>
AP Fosfatasa alcalina	CDKs Quinasas dependientes de ciclina
AP-1 Proteína activadora 1	cDNA DNA copia
AR Receptor de andrógenos	CERT Reguladores de la traducción ricos en cisteínas
ARE Secuencia rica en AU	c-Fms Receptor del factor 1 estimulante de colonias
ATF3 Factor de transcripción dependiente de AMPc	cGAS-STING GMP-AMP cíclico sintasa y estimulador de genes de interferón
BA Bicarbonato amónico	C-KIT Receptor tirosina quinasa
BAK <i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>	CLDN5 Claudina-5
BAX Proteína X asociada a Bcl-2	COX2 Ciclooxygenasa 2
BCL6 Proteína 6 del linfoma de células B	cPLA2 Fosfolipasa A2 citoplasmática
BC-LSCs Células madre de leucemia	CREB Elementos de respuesta a AMPc
BDNF Factor neurotrófico derivado del cerebro	CRISPR <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
BET Proteínas con bromodominio y dominio extra terminal	Ct Ciclo umbral
BMPs Proteínas morfogénicas óseas	CXCL1 Ligando quimioquina 2 con motivo C-X-C
BRCA Gen del cáncer de mama	CYFIP1 Proteína citoplasmática asociada a FMPR
BRSK1/2 Quinasas 1 y 2 específicas de cerebro	
BSA Albúmina de suero bovino	

Abreviaturas

DCIS Carcinoma ductal in situ	FDA Administración de Alimentos y Medicamentos
DDB1 Proteína específica de unión a DNA dañado 1	FGF Factor de crecimiento de fibroblastos
DEPTOR Proteína de interacción con mTOR con dominio DEP	FMRP Proteína de retraso mental del cromosoma X frágil
DMSO Dimetil sulfóxido	FOXM1 <i>Forkhead Box M1</i>
DNA-PKcs Subunidad catalítica quinasa dependiente de DNA	FSP-1 Proteína específica de fibroblasto 1
DNAsa Desoxirribonucleasa	G6PD Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
dNTP Deoxinucleótido trifosfato	GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
dsDNA DNA de doble cadena	GLO1 Lactoilglutation liasa/Glyoxalasa I
DTT Ditiotreitól	GMPs Progenitores de granulocitos/monocitos
DUSP1 Proteína fosfatasa dual específica 1	GO <i>Gene Ontology</i>
E2F1 Factor de transcripción 1 E2F	HDM2 Proteína Human Double minute 2
EDN1 Endotelina-1	HER Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
EDTA Ácido etilendiaminotetracético	HGF Factor de crecimiento de hepatocitos
eEF Factor de elongación	HIF1α Factor 1-alfa inducible por hipoxia
EGF Factor de crecimiento epidérmico	hnRNP Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
EGR1 Proteína de respuesta de crecimiento temprano	HRP Peroxidasa de rábano
eIF Factor de iniciación eucariota	IAPs Proteínas inhibidoras de la apoptosis
ELONA Ensayo enzimático en placa con aptámeros	IC50 Concentración inhibitoria del 50%
EMT Transición epitelio-mesénquima	IDC Carcinoma ductal invasivo
EphA2 Receptor de efrinas A2	IEF Isoelectroenfoque
ER Receptor de estrógenos	IFN Interferón
ERK1/2 Quinasa regulada a través de señalización extracelular	IGF-1 Factor de crecimiento insulínico tipo 1
FAK Quinasa de adhesión focal	IKKϵ Quinasas de I κ B
FBS Suero bovino fetal	IL Interleuquina
	ILs Interleuquinas
	IMEx <i>The International Molecular Exchange</i>

IRES Sitio interno de entrada al ribosoma	ODC Ornitina descarboxilasa
ITAFs <i>IRES-trans acting factors</i>	p70S6K Quinasa p70 ribosómica
JNK1 Quinasas c-Jun N-terminal	PABP Proteína de unión a poliA
KEGG <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>	PARP Polimerasa de poli ADP-ribosa
KO <i>Knock out</i>	PBS Tampón fosfato salino
KRAS <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	PCNA Antígeno nuclear de proliferación nuclear
MALDI-TOF Espectrometría de masas por desorción por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo	PCR Reacción en cadena de la polimerasa
MAPK Proteína quinasa activada por mitógenos	PD-L1 Ligando de muerte programada1
MCL1 Proteína de células de leucemia mieloide 1	PGAM Fosfoglicerato mutasa
MCP-1 Proteína quimioatrayente de monocitos 1	PI Punto isoelectrico
MEF Fibroblastos embrionarios de ratón	PI3K Fosdfatidil inositol 3 quinasa
MEK Quinasa activada por mitógenos	PIAS1 Proteína inhibidora de STAT1 activa
miRNA Micro-RNA	PKA/C/G Proteínas quinasa A, C y G
MMP Metaloproteasa	PLS-DA Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
MNK1/2 Proteína quinasa de interacción con MAPK	pMLC2 Cadena ligera 2 de la fosfo-miosina
mRNA RNA mensajero	PR Receptor de progesterona
Mtap1b Proteína asociada a microtúbulos	Prdx6 Peroxirredoxina-6
mTOR Proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos	PRK2 , Proteinna quinasa N2
mTORC1 Complejo 1 de mTOR	PSF Proteína de unión al tramo de polipirimidina
MTT Metiltiazol tetrazolio	PSMB2 Subunidad β del proteasoma
NADH Nicotin adenin dinucleótido	PTEN Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
NDRG1 Proteína <i>N-Myc Downstream Regulated 1</i>	PVDF Fluoruro de polivinilideno
NES Señal de exportación nuclear	qPCR PCR cuantitativa a tiempo real
NF-κB Factor nuclear κ B	RAPTOR Proteína reguladora asociada a mTOR
NGFR Factor de crecimiento nervioso	RASSF1 Proteína 1 que contiene el dominio de asociación Ras
NLS Señal de localización nuclear	RIOK2 Quinasa RIO2

RNAse Ribonucleasa	SSH1 Proteína fosfatasa homóloga a Slingshot
ROCK1 <i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1</i>	STIP1 Fosfoproteína inducida por estrés
ROS Especies reactivas de oxígeno	SUnSET <i>Surface sensing of traslation</i>
RPFs Fragmentos protegidos por ribosomas	TELO2 Proteína de mantenimiento de la telomerasa 2
rpS6 o S6 Proteína ribosomal S6	TGFβ factor de crecimiento transformante β
rRNA RNA ribosómico	TLRs Receptores tipo Toll
RSK p90S6 quinasa	TME Transición mesénquimo-epitelial
RTKs Receptores tirosina quinasa	TMEM119 Proteína transmembrana 119
S6K Proteína quinasa de la proteína ribosomal S6	TNBC Carcinoma de mama Triple-negativo
SDS Dodecil sulfato sódico	TNFα Factor de necrosis tumoral alfa
SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS	TOP Motivos oligopirimidina 5' terminal
SELEX Enriquecimiento exponencial por evolución sistemática de ligandos	TP53 Proteína tumoral 53
SEM Error estándar de la media	TSC2 Complejo de esclerosis tuberosa 2,
SF2/ASF Factor de <i>splicing</i> rico en serina/arginina	Twist Proteína 1 relacionada con la torsión
SGK Quinasa activada por suero y glucocorticoides	UTR Región no codificante del mRNA
SGKi Inhibidor de SGK1/2	VEGF Factor de crecimiento del endotelio vascular
shRNAs , RNA de horquilla corta	VRK1 Quinasa relacionada con vaccinia
siRNAs RNA pequeño de interferencia	XIAP Proteína inhibidora de apoptosis ligada a X
SMAD <i>Mothers against decapentaplegic</i>	YAP <i>Yes-associated protein 1</i>
Spry Proteína sprouty	YB-1 Proteína 1 de unión a la caja Y
SRPK Quinasa rica en serina y arginina	ZEB1 Proteína Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
	ZO-1 <i>Zona occludens 1</i>

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

En el año 2020, se estima que se diagnosticaron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y se registraron casi 10 millones de muertes a nivel mundial, situándose como la primera o segunda causa de muerte prematura (antes de los 70 años) en 112 países, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se espera que la incidencia del cáncer crezca hasta los 28.4 millones de casos en 2040 a nivel mundial, lo que se ha asociado con el crecimiento y el envejecimiento poblacional, así como a un incremento de la prevalencia de los factores de riesgo (1).

Las células tumorales se caracterizan por una serie de características adquiridas que incluyen la proliferación sostenida, la resistencia a supresores del crecimiento, la evasión del sistema inmune y la apoptosis, la reprogramación del metabolismo energético y la capacidad para producir metástasis. Todas estas alteraciones resultan de la acumulación de múltiples cambios genéticos y epigenéticos y de un microambiente tumoral inflamatorio (2).

1.1. Biología del cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo más común de cáncer diagnosticado a nivel mundial, con una incidencia de 2.3 millones de casos en 2020, lo que supone el 11.7% del total de diagnósticos, seguido por el cáncer de pulmón y colorrectal. Además, se sitúa como la quinta causa de mortalidad por cáncer y la primera en mujeres, con 685.000 fallecidas (1).

El cáncer de mama se origina en las células epiteliales de las unidades lobular-ductal (unidades funcionales de la glándula mamaria). Entre los 19 tipos de cáncer de mama que diferencia la OMS atendiendo a su morfología histológica, el carcinoma ductal invasivo es el tipo más frecuente (70-75%), seguido del carcinoma lobular invasivo (10-14%) (3).

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea a nivel molecular. Los tumores de mama se han clasificado en distintos subtipos, independientemente de su clasificación histológica, para facilitar la predicción del pronóstico y guiar la elección de los tratamientos sistémicos en base a la detección de marcadores como el receptor de estrógeno (ER) y de progesterona (PR), el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) o el marcador de proliferación Ki-67, asociado con la tasa de proliferación (4). Los perfiles de expresión génica para detectar marcadores genómicos como BRCA1, BRCA2 y PIK3CA (5) o la detección de linfocitos infiltrantes en el tumor y el marcador PD-L1 también aportan información acerca del pronóstico y las posibles estrategias de tratamiento (4, 5).

Los tumores del subtipo luminal A son positivos para ER y PR, negativos para HER2 y tienen un bajo índice de proliferación, mientras que el subtipo luminal B, además de expresar los receptores ER y PR, aunque en menor medida que el subtipo A, puede expresar HER2 y tienen una mayor tasa de proliferación. Otros subtipos incluyen los tumores que solo expresan los receptores HER2 y aquellos que no expresan ninguno de los tres, denominados tumores de mama triple negativo (TNBC) (4) y que a su vez se pueden clasificar en otros subtipos (3).

Entre el 60-70 % de todos los diagnósticos se corresponden a los subtipos luminales, mientras que el 10-15 % son TNBC y la amplificación de HER2 se produce en el 13-15 % de las pacientes. De forma general, el subtipo luminal A tiene el mejor pronóstico, los subtipos luminal B y HER2 positivo tienen un pronóstico intermedio y los TNBC presentan el pronóstico más desfavorable, ya que suelen ser tumores más agresivos, altamente proliferativos (3) y que recurren con más frecuencia (6). Por otro lado, la disponibilidad de tratamientos sistémicos es más limitada para el subtipo TNBC. Además de quimioterapia, las pacientes con tumores ER/PR positivos y HER2 reciben terapias dirigidas que bloquean los receptores de estrógeno, como el tamoxifeno o anticuerpos monoclonales frente a HER2, respectivamente. Al no disponer de estos receptores que permitan el uso de terapias dirigidas, el tratamiento de los TNBC se ha limitado al uso de quimioterapia (6), aunque recientemente se ha aprobado el uso de inhibidores de PARP y anticuerpos monoclonales frente al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (7).

1.2. La traducción de proteínas como diana terapéutica en cáncer

La traducción de proteínas es el proceso celular que consume más energía (8) y tiene un papel predominante en la regulación de la expresión de proteínas a nivel postranscripcional, lo que supone la existencia de discrepancias entre los niveles de mRNA y el proteoma (9). En células eucariotas, la traducción de la mayor parte de proteínas tiene lugar de forma dependiente del reconocimiento de la estructura 7-metil guanósina (m⁷G cap) del extremo 5' del mRNA, aunque también puede producirse de forma independiente de cap, mediada por los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) (10). El proceso de traducción en su fase de iniciación está altamente controlado por múltiples rutas de señalización que convergen en componentes de la maquinaria de traducción regulando su función, mayoritariamente sobre los factores de iniciación de la traducción (eIF) como eIF4E y eIF2 α (10).

Las alteraciones en el control de la traducción constituyen una característica distintiva de las células tumorales y suponen un mecanismo crítico en el desarrollo y progresión de tumores, ya que dirigen tanto la síntesis global de proteínas, que permite mantener una rápida y continua proliferación, como la traducción selectiva de mRNAs involucrados en supervivencia, angiogénesis, respuesta inmune, control de la energía celular y adaptación a estrés (11,12,13).

La desregulación de la traducción en cáncer se produce gracias a una amplia variedad de alteraciones moleculares, entre las que se encuentran la sobreexpresión de algunos componentes de la maquinaria de traducción (como eIF4E, eIF4G, eIF4A o isoformas de eIF3) (10), las alteraciones de la actividad de proteínas de unión al RNA, las modificaciones de los mRNAs, o la participación de microRNAs y RNAs largos no codificantes (14).

Por otro lado, las mutaciones más habituales en cáncer se producen en genes que participan en la regulación de la maquinaria de traducción como los oncogenes PIK3CA, KRAS y MYC o los supresores de tumores TP53, TSC2 y PTEN (10). Se considera que la formación y actividad del complejo de iniciación de la traducción está regulada principalmente por dos rutas de señalización frecuentemente implicadas en la etiología del cáncer: la ruta de PI3K/AKT/mTOR y la ruta de las quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (11). Dentro de estas rutas destacan en la regulación

de la traducción el complejo sensible a rapamicina (mTORC1) y dos proteínas quinasas activadas por MAPKs, las quinasas de la proteína ribosomal S6 (RSKs) y las quinasas que interaccionan con MAPK (MNKs) (10).

Puesto que la desregulación de la traducción supone una característica común de células tumorales con distintas alteraciones genéticas, el desarrollo de terapias dirigidas a componentes de la maquinaria de traducción o nexos comunes en las rutas que controlan la traducción puede constituir una buena estrategia terapéutica en cáncer, particularmente para hacer frente a la heterogeneidad intra-tumoral (11). Así, las proteínas MNKs se presentan como potenciales dianas frente a las cuales existe un gran interés por desarrollar inhibidores con aplicaciones terapéuticas.

2. MNKs: quinasas que interaccionan con MAPK

La señalización de las MAPKs responde a estímulos extracelulares, como factores de crecimiento, estrés o citoquinas y depende de la activación secuencial de una serie de quinasas. Existen tres tipos principales de MAPK con varias isoformas: la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK1/2/3) y p38 α /β/γ/δ MAPK. Las diferentes MAPKs se activan en función del estímulo y el contexto celular y a su vez fosforilan una amplia variedad de proteínas efectoras involucradas en procesos de proliferación, diferenciación, respuesta a estrés, migración y supervivencia. Entre los sustratos de las MAPKs destaca la familia de proteínas quinasas activadas por MAPK (MAPKAPKs), entre las cuales se encuentran las MNKs (15).

Las MNKs son una familia de serina/treonina quinasas descubiertas en 1997 por dos grupos de investigación de forma independiente en ensayos de cribado de sustratos de ERK (16) y en ensayos de doble híbrido para identificar proteínas que interaccionan con ERK (17). Estos ensayos identificaron a MNK como sustrato de ERK y de p38 MAPK en respuesta a una amplia variedad de estímulos como el suero, ésteres de forbol, el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleuquina 1 β (IL1 β) o radiación UV-C (16,17). En estos primeros ensayos también se determinó que la fosforilación de las MNKs estimulaba su actividad quinasa sobre su sustrato eIF4E y que MNK2 interacciona preferencialmente con ERK (17), aunque también puede ser fosforilado por p38 MAPK α y β (18).

Las MNKs están codificadas por dos genes (MKNK1 y MKNK2) con una homología del 71% (19) que en humanos dan lugar a dos isoformas por *splicing* alternativo: MNK1a/MNK1b y MNK2a/MNK2b, mientras que en ratón únicamente se expresan las formas de mayor longitud, MNK1a y MNK2a (19,20) (Figura 1).

Las dos isoformas de MNK2 son iguales para los primeros 385 aminoácidos y solo difieren en su C-terminal, de manera que MNK2a cuenta con 80 aminoácidos más y MNK2b con 29 aminoácidos distintos (19). En el caso de MNK1, a partir del aminoácido 336 la isoforma MNK1a cuenta con 89 aminoácidos en el C-terminal que son remplazados por 12 aminoácidos distintos en la isoforma MNK1b (20).

MNK1 y MNK2 participan de distinta forma en la fosforilación de eIF4E. MNK1a presenta una actividad basal baja que se activa en respuesta a la señalización de las MAPKs, mientras que MNK1b tiene una actividad mayor en estado basal y es independiente de la actividad de las MAPK (18,20). En el caso de MNK2a, la actividad basal es elevada y se ve incrementada o disminuida de forma leve en respuesta a la activación o inhibición de las MAPKs. Por otro lado, MNK2b tiene menor actividad basal que MNK2a, y responde con un patrón similar a las variaciones en la señalización de las MAPKs (18,21). Los ensayos en fibroblastos embrionarios de ratones *knock out* (KO) para *Mnk1* y *Mnk2* han permitido demostrar que el incremento en la fosforilación de eIF4E inducido tras la activación de la ruta de las MAPK es dependiente de MNK1, mientras que los niveles de fosforilación basales y constitutivos de eIF4E dependen de MNK2 (22).

El nivel de actividad de cada isoforma y su respuesta a la fosforilación por las MAPK, así como su localización celular vienen determinados por diferencias en su secuencia y estructura. Todas las isoformas de MNK presentan en su bucle de activación dos residuos de treonina que forman parte de sitios de fosforilación consenso de las MAPK: Thr209 y Thr214 en MNK1 y Thr244 y Thr249 en MNK2 (19, 20, 17,23) (Figura 1). Estos residuos son cruciales para la actividad quinasa de las MNKs, ya que mutaciones puntuales en ellos eliminan su actividad enzimática (18). La fosforilación en estos residuos se ve incrementada con la actividad de las MAPKs (17,23), aunque solo las isoformas MNK1a y MNK2a presentan en su región C-terminal secuencias consenso de unión a MAPK (LARRR en el caso de MNK1a y LAQRR para MNK2a) (19,20), lo que supone que las isoformas MNK1b y MNK2b sean sustratos débiles de las MAPK.

Se han determinado otros sitios de fosforilación en MNK1a, como la ser353, cuya fosforilación por la quinasa regulada por glucocorticoides 1 (SGK1) tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de MNK1a (24), o la fosforilación en la Ser74 de MNK2 por mTORC1, también inhibitoria (25). Otro sitio potencial de fosforilación es la Thr344 (16). Este residuo mantiene MNK1a en una conformación inactiva (23) y sus mutaciones, tanto por residuos ácidos como por residuos sin carga, incrementa la actividad de MNK1a (23,26,27).

Las diferencias en la actividad basal entre las isoformas de las MNKs se han asociado con configuraciones particulares del C-terminal y de su dominio catalítico. El C-terminal de MNK1a reprime la actividad basal y la fosforilación del bucle de activación, siendo responsables de esta inhibición la región de unión a MAPK y otra región α -hélice que ocuyen el acceso al dominio catalítico y al bucle de activación (27). En otros estudios la elevada actividad basal de MNK1b no se ha asociado con la pérdida de estas estructuras del C-terminal de MNK1a, si no con características propias del dominio C-terminal de MNK1b (28).

El dominio catalítico de las MNKs es similar al de otras serina/treonina quinasas, pero presenta una serie de particularidades que le confieren características únicas. Las MNKs disponen de dos insertos específicos en el dominio catalítico (I1, I2) y tienen un motivo no canónico DFD (Asp191–Phe192–Asp193 en *Mnk1* y Asp226–Phe227–Asp228 en *Mnk2*) en el dominio de unión a magnesio, a diferencia del motivo DFG (Asp-Phe-Gly) típico de otras quinasas (29,30) (Figura 1). El motivo DFD puede encontrarse en una conformación inactiva denominada DFG/D-out, en la que el

residuo de fenilalanina impide la unión de ATP, o en una conformación activa denominada DFG/D-in.

Las estructuras cristalizadas de los dominios catalíticos de MNK1 y MNK2 en su estado desfosforilado han demostrado que existen profundas diferencias en la conformación de su segmento de activación y en detalles atómicos referentes a la conformación DFG/D-out (30). En el caso de MNK2, la composición de los insertos determina una conformación extendida del segmento de activación en la forma no fosforilada de MNK2, que adopta una conformación activa tras la fosforilación (29). El motivo DFD adopta una conformación inactiva DFG/D-out, pero el Asp228 no establece ninguna interacción con otros residuos que estabilice esta conformación, por lo que puede unir ATP independientemente de las fosforilaciones en el bucle de activación. El cambio hacia la conformación activa DFG/D-in podría estar impuesto por la unión del ATP (29).

En el caso de MNK1a, en su estado desfosforilado el segmento de activación actúa como un módulo autoinhibitorio, que se posiciona hacia la región N-terminal e impide la unión de ATP y el posicionamiento del sustrato, principalmente debido a residuos del inserto I2 del segmento de activación como la Glu228 y la Phe230 que estabilizan la conformación autoinhibitoria. En concreto, la Phe230 desplaza a la Phe192 del motivo DFD que se posiciona en el sitio de unión a ATP, lo que da lugar a una conformación inactiva DFG/D-out. A diferencia de lo que ocurre en MNK2, esta conformación es estable gracias a interacciones entre los Asp del motivo DFD y otros residuos, de manera que la unión de ATP es mínima (30). Se ha sugerido que MNK2 dispone de un mecanismo autoinhibitorio similar al de MNK1, pero de una forma menos restrictiva, de tal manera que el segmento de activación de MNK2 puede fluctuar entre conformaciones que permitan o no la unión de ATP (30).

El N-terminal de todas las isoformas presenta una región polibásica que permite a las MNKs interactuar con α -importina (23) y con eIF4G (18,21,23). MNK1b se localiza en el núcleo y en el citoplasma, mientras que MNK1a permanece en el citoplasma, ya que ambas isoformas pueden transportarse al núcleo gracias a las secuencias de localización nuclear (NLS) del N-terminal, pero solo el C-terminal de MNK1a presenta secuencias de exportación nuclear (NES) (Figura 1). Por ello, en presencia de leptomicina B, un compuesto que bloquea la exportación nuclear mediada por la exportina-1, se produce una acumulación de MNK1a en el núcleo (31). MNK2a es mayoritariamente citoplasmática, mientras que MNK2b también aparece en el núcleo. A diferencia de MNK1a, MNK2a no presenta la secuencia consenso para la exportación nuclear (NES) mediada por exportina-1 pero se localiza en el citoplasma, probablemente por una interferencia entre su región C-terminal con la región básica del N-terminal que bloquee su transporte al núcleo (21).

Mnk1	TS EL LGEGAY	AKVQGAVSLQ	NGKEYAVKII	EXQAGHSRSR	VFREVE TLYQ	CQGKNK ILEL
Mnk2	QEDVLGEGAH	ARVQTC I NL I	TS QEYAVKII	EXQPGHI RSR	VFREVEMLYQ	CQGHNRNVLEL
IEFFEDDTRF	YLVFEK LQGG	SILAHIQKQK	HFNEREASRV	VRDVAAALDF	LHTKGIAHRD	LKPENILCES
IEFFEEEDRF	YLVFEKMRGG	SILSHIMKRR	HFNELEASVV	VQDVASALDF	LHNKGIAHRD	LKPENILCEH
PEKVPSPKIC	DFDLGSGMKL	NNSCTPITTP	ELTTPCGSAE	YMAPEVVEVF	TDQATFYDKR	CDLWSLGVVL
PNQVSPVKIC	DFDLGSGIKL	NGDCSPISTP	ELLTPCGSAE	YMAPEVVEAF	SELEAS IYDKR	CDLWSLGV IL

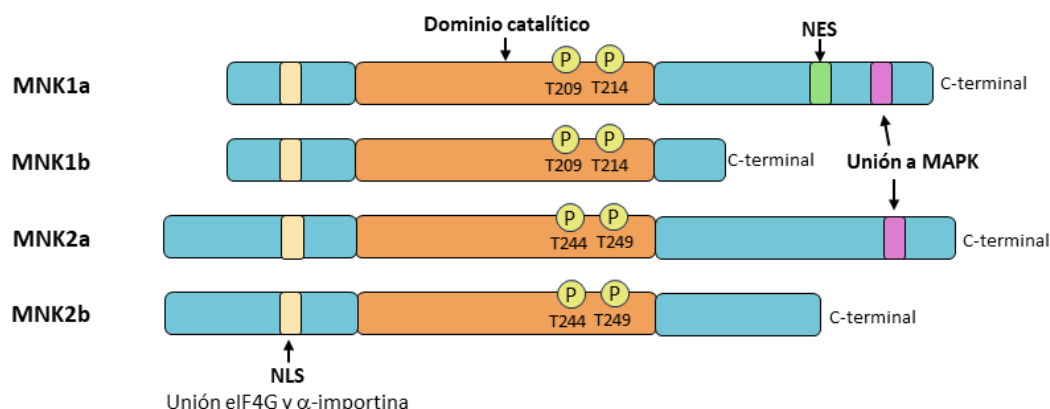


Figura 1. Representación de las isoformas de MNK. (A) Secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de MNK1 y MNK2 en el que se destacan el motivo DFD, los insertos I1 e I2 y los residuos de treonina fosforilables del bucle de activación. (B) Dominios funcionales de las isoformas de MNK, incluyendo las secuencias de localización nuclear (NLS), el dominio catalítico, la región de exportación nuclear (NES) en MNK1a y los sitios consenso de unión a MAPK en MNK1a y MNK1b.

La expresión del mRNA de MNK1 y MNK2 se ha detectado en todos los tejidos del ratón adulto a excepción del cerebro, donde los niveles de MNK2 son muy reducidos. Por otro lado, destaca la abundancia de ambas proteínas en músculo esquelético (17). En tejidos humanos las isoformas de MNK2a/b y MNK1a/b también están presentes de forma ubicua, con una gran abundancia en páncreas para las cuatro isoformas (19,20).

3. Sustratos de MNK

3.1. eIF4E

El eIF4E está involucrado en el control de la iniciación de la traducción de proteínas dependiente de cap, formando parte del complejo eIF4F junto a la proteína estructural eIF4G y a la helicasa de RNA eIF4A (32). En este complejo, la unión de eIF4E y eIF4G incrementa la afinidad de eIF4E por el m⁷G cap, permitiendo el reconocimiento del mRNA (33,34), mientras que eIF4A se encarga de eliminar estructuras secundarias en la región no traducida 5' (5'UTR) del mRNA. Por otro lado, eIF4G interacciona con la proteína de unión a poliA (PABP), formando una estructura circular en el mRNA, y con eIF3, lo que facilita el reclutamiento del complejo de pre-iniciación 43S, compuesto por la subunidad pequeña del ribosoma (40S), eIF5, eIF3, eIF1, eIF1A y eIF2-GTP unido al Met-tRNA_i. Una vez constituida esta estructura (complejo de iniciación de la traducción

48S) comienza el escaneo del mRNA en dirección 3' en busca del codón de iniciación AUG para proceder con la elongación (32) (Figura 2).

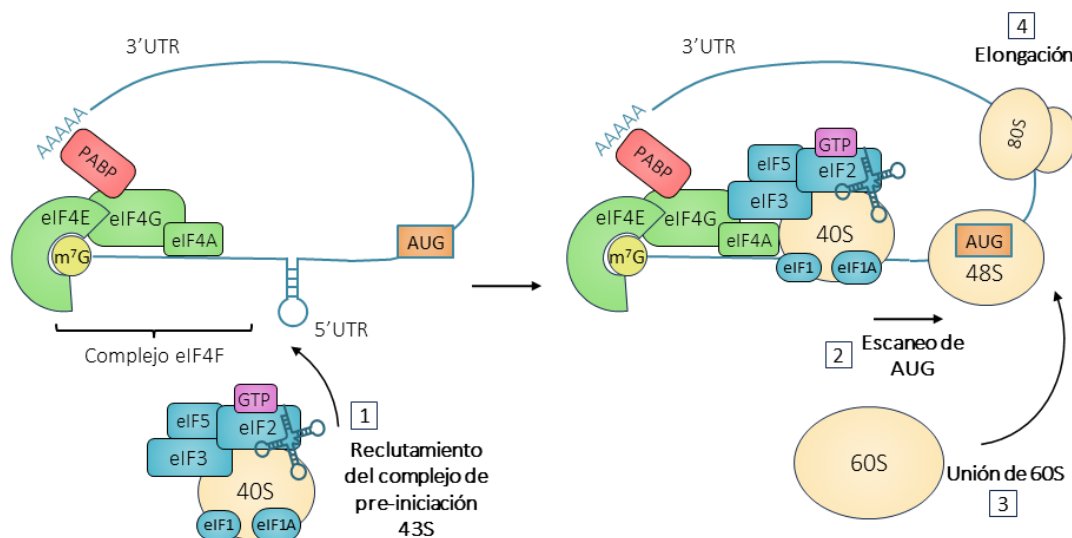


Figura 2. Representación esquemática de la iniciación de la traducción dependiente de cap. La iniciación de la traducción se basa en el reconocimiento del m⁷G cap por eIF4E, que se encuentra formando parte del complejo eIF4F. La sucesiva unión del complejo de pre-iniciación 43S permite comenzar el escaneo del mRNA en busca del codón AUG y la posterior unión de la subunidad grande del ribosoma para proceder con la fase de elongación de la traducción.

El eIF4E constituye el factor limitante en la formación del eIF4F (32,35) y su disponibilidad está regulada a nivel transcripcional, postranscripcional, postraduccional y a través de la interacción con la familia de proteínas de unión a 4E (4EBPs) (36). La interacción con 4EBP1 constituye el principal mecanismo regulatorio de la actividad de eIF4E y, con ello, del inicio de la traducción (32). En su estado hipofosforilado, 4EBP1 se une a eIF4E por la misma región que el eIF4G, por lo que impiden la formación del eIF4F. Diversos estímulos dan lugar a la activación de la quinasa que fosforila a las 4EBP1 (mTORC1), lo que permite la liberación de eIF4E y con ello, la iniciación de la traducción (36).

La serina 209 es el principal sitio de fosforilación en el eIF4E y, hasta el momento, el único descrito con relevancia biológica (37–39). Las MNKs son las únicas quinasas capaces de fosforilar eIF4E en la Ser209 *in vivo*. Así, en ensayos en ratones doble KO para *Mnk1* y *Mnk2* la fosforilación en la Ser209 no se detectó en ningún tejido de forma basal o tras la activación de las rutas de ERK o p38 MAPK (22). Para que la fosforilación de eIF4E se produzca de forma eficiente es necesario que MNK y eIF4E se encuentren interaccionando con eIF4G (23,40). La fosforilación de MNK1 (T209/214) por las MAPKs promueve la interacción MNK-eIF4G por lo que dicha fosforilación, además de incrementar la actividad quinasa de MNK1a, también facilitaría la proximidad a su sustrato (41). Las MNKs podrían fosforilar también a eIF4G (40,42) aunque su relevancia en el proceso de traducción no está demostrada.

La fosforilación de eIF4E se incrementa en respuesta a una amplia variedad de estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, hormonas que activan las rutas de ERK y p38 MAPK y que se

traducen en un incremento de la síntesis de proteínas. Sin embargo, la fosforilación no parece ser crítica en el control de la iniciación de la traducción; en ensayos donde la Ser209 se sustituye por una alanina o con el uso de inhibidores de MNK como el CGP57380 se ha observado que la fosforilación de eIF4E no es necesaria para que se produzca la iniciación de la traducción *in vitro* o *in vivo* (43,44) y el incremento de su fosforilación a través de la sobreexpresión de MNK1 no supone un incremento en la síntesis global de proteínas y no afecta a la interacción eIF4G/eIF4E (45,46) o a la interacción eIF4E/4EBP1 (47). Además, los fibroblastos doble KO de *Mnk1/2* no presentan una disminución de la síntesis global de proteínas (22).

Contrario a lo que cabría esperar, la fosforilación de eIF4E reduce su afinidad por el m⁷G cap de los mRNAs, probablemente debido a una repulsión electrostática entre la fosforilación en la Ser209 y los grupos fosfato del RNA o de la estructura m⁷G cap (47,48). Una hipótesis sugiere que este efecto permitiría liberar eIF4E del mRNA tras la formación del complejo de iniciación de la traducción, aumentando su disponibilidad para iniciar la traducción de otros mRNAs (49). El papel fisiológico de la fosforilación en la Ser209 no está completamente esclarecido, pero no parece ser necesario para el desarrollo y la proliferación normal (22,39). Sin embargo, existen numerosos estudios que indican su relevancia en progresión tumoral y metástasis.

3.2. Sprouty (Spry2)

Las proteínas Spry actúan como reguladores negativos de la señalización de los receptores tirosina quinasa (RTKs) a distintos niveles y responden frente a una amplia variedad de factores tróficos. En mamíferos existen 4 genes diferentes (Spry1-4), que tienen funciones relevantes en desarrollo embrionario y como supresores de tumores (50).

Las proteínas Spry están reguladas a nivel postraducciona a través de la degradación por el proteasoma de forma dependiente de la fosforilación de residuos de tirosina. En células CHOK1 que sobreexpresan Spry2 y son estimuladas con factor de crecimiento epidérmico (EGF), MNK1 estabiliza Spry2 mediante su fosforilación en las Ser112/121. La fosforilación en estos residuos, a su vez, disminuye la fosforilación en la Tyr55 por la familia de quinasas Src, necesaria para la ubiquitinización por la E3 ubiquitina ligasa c-Cbl. De este modo, la inhibición de MNK por CGP57380 o la sustitución de los residuos de serina por alanina incrementan la degradación de Spry2, lo que promueve el mantenimiento de la señalización de ERK (51). De forma contraria, en un estudio posterior en células HEK293 que sobreexpresan Spry2 se observó que la fosforilación en las Ser112/121 por MNK2 es necesaria para que Nedd4, otra E3 ubiquitina ligasa, pueda interaccionar y degradar a Spry2. Así, el silenciamiento de MNK2, pero no el de MNK1, disminuye la interacción Spry2/Nedd4 incrementando los niveles de spry2 y, con ello, la capacidad para inhibir la actividad de ERK1/2 inducida por la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estos estudios sugieren que la estabilidad de Spry2 mediada por las fosforilaciones en Ser112/121 puede depender del tipo celular y de la abundancia relativa de las E3 ligasas (52).

Por otro lado, se ha demostrado que en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) la señalización por interferón tipo I (IFN) produce, de forma dependiente de MNKs, una sobreexpresión de Spry1 y 2 que resulta en la inhibición de la señalización por p38 MAPK inducida por IFN (53).

3.3. Ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 (hnRNPA1)

La familia hnRNP constituye un conjunto de proteínas de unión a RNA que participan en procesos biológicos como el procesamiento de mRNAs, el *splicing* alternativo, la regulación transcripcional y la traducción de proteínas. Entre todos sus miembros, hnRNPA1 es el más abundante y mejor estudiado. Se encuentra sobreexpresado en varios tipos tumorales y está implicado en tumorigénesis por múltiples mecanismos. Las modificaciones postraduccionales de hnRNPA1 son claves a la hora de controlar su actividad en respuesta a distintos estímulos (54). La fosforilación de hnRNPA1 por MNK se ha relacionado con dos de las actividades de hnRNPA1: la capacidad para translocarse entre núcleo y citoplasma y la capacidad para unirse a elementos ricos en AU (AREs) presentes en la región no traducida 3' (3'UTR) de mRNAs de proteínas como el TNF α , regulando su traducción o estabilidad.

Ensayos en una línea de linfocitos T activados tratada con CGP57380 demostraron que MNK fosforila a hnRNPA1 en la Ser192 y Ser310/311/312, disminuyendo su capacidad para unirse a secuencias AREs presentes en el mRNA de TNF α . Puesto que hnRNPA1 actúa en este caso como un supresor de su traducción, la fosforilación por MNK promueve un incremento de la traducción de TNF α (55).

En un primer estudio se demostró que las MNKs no estaban involucradas en la distribución global de hnRNPA1, ya que su inhibición por CGP57380 en linfocitos T activados no afectó a la relación núcleo-citoplasma de sus niveles (55). En otros modelos sí se ha observado una participación de MNK en la localización subcelular de hnRNPA1. En respuesta a estrés por choque osmótico, hnRNPA1 se transloca desde el núcleo y se acumula en el citoplasma. En esta situación, y de forma dependiente de la señalización por p38, MNK fosforila a hnRNPA1 unido a mRNAs, lo que facilita el reclutamiento de hnRNPA1 y su mRNA a los gránulos de estrés y su acumulación citoplasmática. Este papel de hnRNPA1/MNK podría estar asociado con el mantenimiento de la viabilidad en respuesta a estrés (56). En otro modelo celular basado en fibroblastos senescentes, la inhibición de MNK por CGP57380 disminuye los niveles de fosforilación de hnRNPA1 e impide la acumulación citoplasmática de hnRNPA1 que tiene lugar en fibroblastos senescentes respecto a fibroblastos jóvenes, sin afectar a sus niveles totales. Este estudio determinó además que MNK1 forma un complejo con hnRNPA1 que se mantiene estable a pesar de la inhibición con CGP57380 (57).

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

PSF es una proteína nuclear que puede actuar de forma individual o formando complejos multifuncionales con p54^{nrb} y que está implicada en procesos como la transcripción, el procesamiento de RNA (58) o la traducción dependiente de IRES del protooncogén c-Myc (59).

MNK fosforila a PSF en la Ser8 y Ser283 *in vitro*. La Ser8 es mayoritariamente fosforilada por MNK2 y puede bloquearse mediante CGP5738 en células HEK293. Utilizando el inhibidor CGP57380 en una línea de linfocitos T activados se determinó que la fosforilación de PSF puede facilitar la interacción entre el complejo PSF/p54^{nrb} y regiones AREs presentes en el mRNA de TNF α sin afectar a su distribución entre núcleo y citoplasma o a los niveles totales del mRNA. La relevancia de MNK sobre esta interacción aún no se ha determinado, aunque podría participar en otros aspectos del procesamiento del mRNA en el núcleo o en su traducción (60).

3.5. Fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2)

La cPLA2 es una enzima que forma parte de la ruta de síntesis de lípidos eicosanoides que cataliza la hidrólisis del enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos de la membrana, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres como el ácido araquidónico. El ácido araquidónico puede ser metabolizado posteriormente por ciclooxigenasas, lipooxigenasas y el citocromo p450, generando eicosanoides implicados en procesos de inflamación y tumorigénesis. La cPLA2 tiene un papel protumoral en la mayoría de tipos de cáncer, a excepción del cáncer de colon (61).

La actividad enzimática de la cPLA2 se regula, entre otros mecanismos, a través de las fosforilaciones en los residuos Ser505 y Ser727. La fosforilación en la Ser505 está catalizada por proteínas de la familia de MAPK, como p38 MAPK y ERK (62,63), mientras que la fosforilación en la Ser727 está catalizada por MNK1 *in vitro* (64). Algunos autores sugieren que MNK1 podría además fosforilar a la cPLA2 en la Ser505, ya que en plaquetas y megacariocitos KO para MNK1 la fosforilación en este residuo y, con ello, la actividad de la cPLA2 se encuentra disminuida (65). Además de regular su fosforilación, MNK1 parece estar implicada también en la traducción de su mRNA (65).

4. MNKs en cáncer

4.1. Expresión e implicación de MNK en cáncer

Los estudios realizados hasta el momento indican que las MNKs y la fosforilación de eIF4E tienen un papel en la transformación oncogénica, en la progresión tumoral y en la metástasis.

Las proteínas MNK1 y MNK2, así como sus isoformas a y b, tienen un patrón distinto de expresión y mayor o menor relevancia en función del tipo tumoral. En carcinoma hepatocelular (66), cáncer epitelial de ovario (67) y cáncer de mama triple negativo (68) existe un incremento de la expresión de MNK1 que se correlaciona con un peor pronóstico. Además, MNK1 se encuentra sobreexpresada en glioblastoma multiforme y astrocitomas de bajo grado a nivel transcripcional, mientras que los niveles de MNK2 se mantienen respecto al tejido sano (69). En otros tumores, como el carcinoma renal de célula clara ambas MNKs se encuentran incrementadas (70). Respecto a MNK2, se ha demostrado una sobreexpresión en cáncer de pulmón de célula no pequeña que se correlaciona con metástasis en nódulos linfáticos y menor supervivencia (71). La forma fosforilada de MNK1 (Thr197/202) se ha encontrado incrementada en melanomas con mutaciones en el receptor tirosina quinasa C-KIT (72), en astrocitomas (73), carcinoma nasofaríngeo (74) y cáncer

de pulmón de célula no pequeña (75) y en los últimos tres casos se correlaciona con menor supervivencia. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de tipos tumorales, MNK1 tiene una menor expresión en tumores de vejiga respecto al tejido sano que se asocia con menor supervivencia (76).

Al igual que ocurre en las muestras de tumores de pacientes, muchas líneas tumorales presentan niveles elevados de las MNKs respecto a las correspondientes líneas no tumorales inmortalizadas. Líneas de cáncer de mama que sobreexpresan HER2 o líneas de cáncer de mama triple negativo, como las MDA-MB-231, se caracterizan por una elevada expresión y activación de las MNKs (77), al igual que líneas de sarcoma de tejido blando (78). Líneas de glioma, de melanoma y de carcinoma de célula renal presentan una mayor expresión de MNK1 (69,70,72), mientras que el transcripto de MNK2 se encuentra incrementado en líneas de cáncer de pulmón (71). Sólo algunas líneas de cáncer de vejiga tienen menor expresión de MNK1 respecto a una línea no tumoral (76).

El factor de *splicing* SF2/ASF, una oncoproteína incrementada en varios tipos tumorales y en respuesta a quimioterapias como la gemcitabina, controla el *splicing* alternativo de MNK2, promoviendo un incremento de la isoforma MNK2b en detrimento de la isoforma MNK2a (79,80). A pesar de que ambas quinasas fosforilen a eIF4E y que la actividad de MNK2a sea mayor (81), el cambio en el ratio de *splicing* aumenta la fosforilación de eIF4E y con ello la transformación oncogénica (79) y la resistencia a gemcitabina (80). Además, el uso de oligonucleótidos que promueven el *splicing* de MNK2 hacia la isoforma MNK2a reduce la supervivencia de líneas de cáncer de mama, como las MDA-MB-231, de carcinoma hepatocelular y glioblastoma y el crecimiento de tumores *in vivo* (82). Por otro lado, en muestras de tumores de mama, pulmón, colon y glioblastoma el ratio MNK2a/MNK2b es menor respecto a muestras de tejido normal (82,83) y en líneas de carcinoma de células renales el silenciamiento de MNK2a o su inhibición farmacológica promueve migración e invasión (70). Estas diferencias entre las isoformas de MNK2 parecen relacionarse con la capacidad de MNK2a para promover la traslocación nuclear de p38a MAPK, activando rutas de estrés que promueven la muerte celular, a diferencia de MNK2b que carece de esta capacidad y que únicamente participaría en la fosforilación de eIF4E o de otros sustratos con actividad oncogénica (83). Por tanto, estos estudios sugieren un papel supresor de tumores para la isoforma MNK2a y un papel protumoral para la isoforma MNK2b. Este papel antagónico entre las formas MNK2a y MNK2b podría ocurrir de forma similar entre las isoformas MNK1a y MNK1b. En línea con esta hipótesis, se ha observado una relación entre la sobreexpresión de MNK1b y un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama triple negativo, así como una mayor capacidad de proliferación, migración e invasión en líneas tumorales de mama (68). Las diferencias entre las MNKs y sus isoformas ponen de manifiesto el valor de disponer de agentes terapéuticos selectivos para cada quinasa.

Las primeras evidencias directas del papel oncogénico de MNK se demostraron en un modelo de linfomagénesis en ratones donde se observó que la expresión de un mutante de MNK1 constitutivamente activo (T332D) promovía la generación de tumores, mientras que los mutantes de MNK sin actividad quinasa carecían de esta capacidad (84). Por otro lado, ratones doble KO para *Mnk1/Mnk2* muestran un retraso en el desarrollo tumoral en otro modelo de linfomagénesis

basado en la pérdida de PTEN (85) y los MEFs obtenidos de estos los ratones son resistentes a la transformación mediada por diferentes oncogenes (39,85).

La disminución de la expresión de MNK1 o MNK2 en líneas tumorales también se relaciona con una disminución de su potencial oncogénico tanto *in vitro* como *in vivo*. El silenciamiento de MNK1 mediante shRNAs, siRNAs o CRISPR reduce la proliferación en líneas de glioma (85), melanoma (86), sarcoma de tejido blando (78) y cáncer epitelial de ovario (67), la viabilidad en líneas de cáncer de próstata (87) y procesos de migración e invasión en cáncer epitelial de ovario (67). Respecto a MNK2, se ha demostrado que su silenciamiento inhibe proliferación, migración e invasión en líneas de cáncer de pulmón (71) y viabilidad y proliferación en líneas de sarcoma de tejido blando (78). Por otro lado, el silenciamiento de ambas simultáneamente reduce la capacidad de migración en líneas de melanoma (72).

En ensayos *in vivo*, el silenciamiento de MNK1 reduce la incidencia de tumores en xenoinjertos de líneas de glioma en ratones (85,88) y su delección genética disminuye el tamaño de los tumores y la capacidad de formar metástasis en melanoma y carcinoma ductal *in situ* (86,89). En líneas de pulmón, el silenciamiento de MNK2 limita tanto el crecimiento tumoral como el número de metástasis (71), mientras que en líneas de sarcoma de tejido blando la delección tanto de MNK1 como de MNK2 se relaciona con una supresión del desarrollo tumoral (78). Únicamente en líneas de cáncer de vejiga se ha observado un papel supresor de tumores para MNK1, ya que su silenciamiento promueve proliferación y crecimiento tumoral en ratones (76).

Además, algunos estudios han demostrado que la sobreexpresión de las MNKs potencia las características tumorales. En líneas de cáncer de mama como las MDA-MB-231, o en líneas de cáncer epitelial de ovario la sobreexpresión de MNK1 promueve proliferación (67,68), al igual que en líneas de carcinoma hepatocelular, donde además se promueve migración e invasión *in vitro* (66). En líneas de melanoma la expresión de la forma constitutivamente activa de MNK1 (T332D) también incrementa la capacidad invasiva de las células (86).

La mayor parte de estudios asocian la actividad protumoral de MNK con la fosforilación de su sustrato eIF4E, considerado un protooncogén. Sin embargo, no se puede descartar que parte de la acción oncogénica de la MNKs esté mediada por el resto de sustratos descritos para MNK u otros mecanismos como la interacción con mTORC1.

4.2. Expresión e implicación de eIF4E en cáncer

El eIF4E tiene un papel clave en el control de la traducción, por lo que la desregulación de la actividad y niveles de eIF4E está directamente asociada con progresión tumoral. eIF4E se encuentra sobreexpresado en multitud de tumores, como el cáncer de mama (90–92) vejiga (93), cuello y cabeza (94,95), gastrointestinal (96,97), cérvix (98,99) ovario, glioma, melanoma (100), tiroides (101), pulmón (102), próstata (103), o hematológico (104) y generalmente está asociado con un peor pronóstico.

Las primeras descripciones de las propiedades oncogénicas de eIF4E tuvieron lugar a principios de la década de los 90 cuando se determinó que la sobreexpresión de eIF4E en fibroblastos de

roedores inducía su transformación oncogénica (105), mientras que su disminución impedía la transformación inducida por Ras en fibroblastos de rata y reducía la velocidad de duplicación de células humanas HeLa (106,107). En ensayos *in vivo*, la sobreexpresión de eIF4E se relaciona con un incremento de la tumorigénesis y acelera la linfomagénesis inducida por c-Myc (108,109).

La pérdida completa de eIF4E en ratones KO no es compatible con la vida y da lugar a la muerte de los embriones. Una reducción del 50% en su expresión sí es compatible con el desarrollo normal en ratones y mantiene la síntesis de proteínas global, pero impide la transformación oncogénica en fibroblastos embrionarios tras la sobreexpresión de Ras o c-Myc (110). Igualmente, su silenciamiento no afecta substancialmente a la síntesis global de proteínas en líneas de mama (111).

La sobreexpresión de eIF4E también incrementa la capacidad de migración e invasión tumoral *in vitro* y actúa como promotora de metástasis en varios modelos animales (112–114), mientras que su silenciamiento o inhibición reduce la capacidad de migración e invasión tumoral (115).

Se han observado niveles elevados de la fosforilación de eIF4E en diferentes tipos de cáncer. En algunos tumores, como el cáncer colorrectal, de cuello y cabeza o gástrico, la fosforilación es significativamente mayor en estados tempranos de desarrollo de cáncer respecto a estados avanzados, lo que sugiere un papel relevante de la fosforilación en la transformación tumoral (116). En otros tumores como el cáncer de próstata, se asocia con subtipos refractarios a hormonas y se correlaciona con peor pronóstico (39), al igual que en el cáncer de pulmón de célula no pequeña (117,118), carcinoma nasofaríngeo (74), adenocarcinoma pancreático ductal (80), astrocitomas (73), melanoma (119) o cáncer de mama (120).

Diversos estudios señalan la relevancia de la fosforilación de eIF4E en progresión tumoral y metástasis. La expresión de la forma mutante S209A de eIF4E reduce la capacidad de transformación de la línea embrionaria de fibroblastos NIH3T3 (121) o MEFs (39) y en líneas tumorales disminuye la capacidad de proliferación, de formar colonias y de generar tumores *in vivo* (122), mientras que la mutación S209D de eIF4E potencia el crecimiento tumoral (120,123). En ensayos en ratones que expresan el mutante W56A y W73F, residuos relevantes en la interacción de eIF4E con m⁷G cap y su incorporación a eIF4F, y el S209A de eIF4E han demostrado que la actividad de eIF4E sobre la traducción dependiente de cap y su fosforilación son esenciales para el efecto oncogénico de eIF4E (84). Por otro lado, ratones que expresan el mutante S209A son resistentes al desarrollo de tumores en un modelo de cáncer de próstata basado en la pérdida de PTEN (39), en un modelo de cáncer de vejiga (124) o de cáncer de mama (125) y presentan un crecimiento menor de los tumores en un modelo de melanoma en ratón (126).

La fosforilación de eIF4E también se ha relacionado con la capacidad para producir metástasis. En ensayos *in vitro* con MEFs que expresan el mutante S209A y son transformados con c-Myc o Ras se ha observado una menor capacidad de migración e invasión (125), mientras que en modelos *in vivo* de cáncer de mama metastásico y melanoma la mutación en la S209A reduce el número de metástasis en pulmón y nódulos linfáticos, respectivamente (126,127).

4.3. Mecanismos de MNK en cáncer

La contribución del eje eIF4E/MNK en cáncer se produce principalmente a través de cuatro mecanismos: 1) la regulación de la traducción dependiente de cap de mRNAs específicos, 2) el control de la estabilidad y transporte de mRNAs entre el núcleo y el citoplasma, 3) la modulación de la señalización por mTORC1 y 4) la traducción dependiente de IRES (Figura 3).

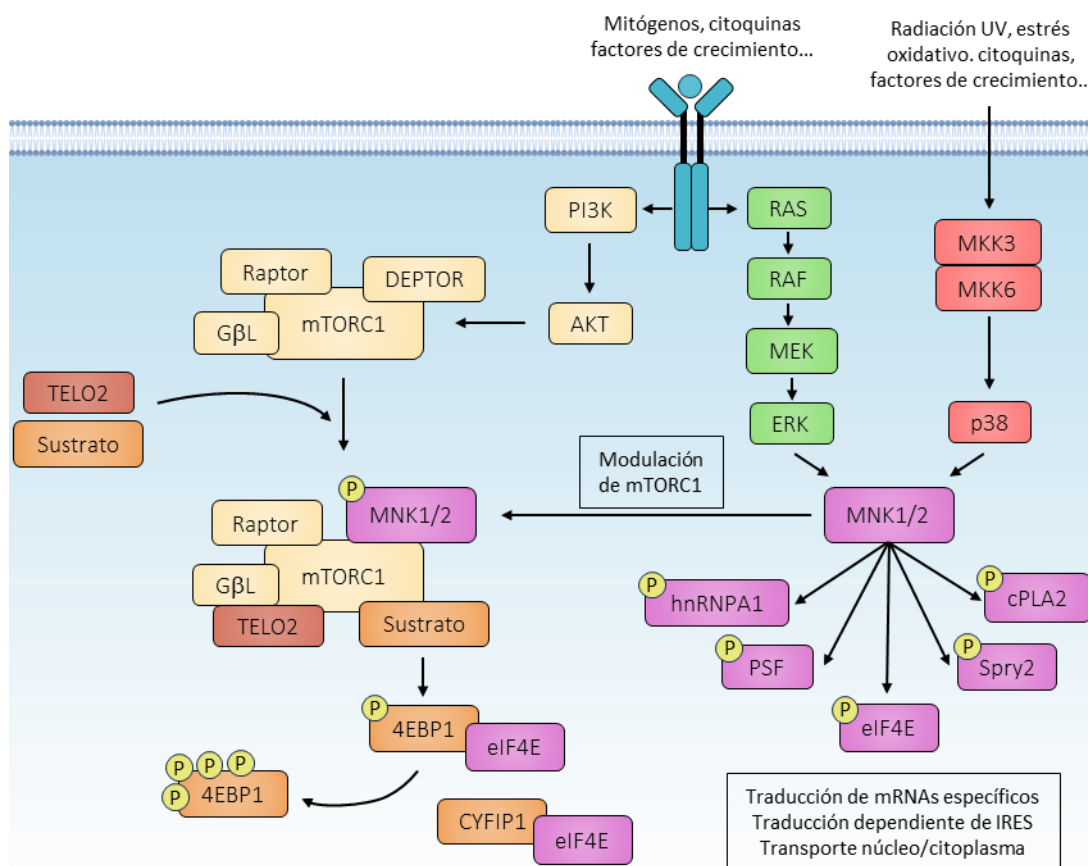


Figura 3. Señalización de MNK. Las MNKs se activan en respuesta a la señalización por RAS/RAF/MEK/ERK y p38. A través de la fosforilación de sus sustratos (eIF4E, Spry2, hnRNP A1, PSF, cPLA2), las MNKs se han relacionado con la regulación de la traducción dependiente de cap y dependiente de IRES de mRNAs claves en progresión tumoral y el transporte de mRNA entre el núcleo y citoplasma. Por otro lado, la activación de las MNKs incrementa la actividad de mTORC1 al favorecer la asociación de sus sustratos.

4.3.1 Traducción de mRNAs específicos

Uno de los principales mecanismos por los cuales las MNKs y la fosforilación de eIF4E participan en el desarrollo tumoral es a través del control traduccional de mRNAs específicos. Algunos estudios sugieren que este control depende de la longitud, la complejidad estructural y motivos concretos de las regiones 5' UTR de los mRNAs, que determina el ratio de iniciación de la traducción. De este modo, aquellos mRNAs que presentan regiones 5' UTR cortas y sin estructuras secundarias, como la β -actina o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se traducen de forma constitutiva y con independencia de las

variaciones en eIF4E, mientras que mRNAs con regiones 5'UTR largas y estructuradas (ricas en CG) tienen una menor eficiencia de traducción y son sensibles a la actividad y disponibilidad de eIF4E, de manera que solo se traducen eficientemente cuando se sobreexpresa eIF4E o no se encuentra secuestrado por 4EBP1 (128–130). Otros estudios sugieren que motivos presentes en el 5'UTR, como los reguladores de la traducción ricos en cisteínas (CERT), confieren también sensibilidad a eIF4E durante la transformación oncogénica y el estrés oxidativo (110). La traducción de mRNAs con motivos oligopirimidina 5' terminal (TOP), principalmente regulada por la actividad de mTOR, depende igualmente de los niveles de eIF4E (131,132).

El mecanismo por el cual eIF4E regula la traducción selectiva de mRNAs con regiones 5' estructuradas se desconoce, aunque un estudio ha demostrado que podría depender de la capacidad de eIF4E para reclutar a eIF4A al 5' del mRNA y de estimular su actividad helicasa, facilitando el reclutamiento y escaneo de los ribosomas (133). Estas estructuras también podrían suponer el sitio de unión de proteínas de unión a RNA que, a través de la interacción con eIF4E, regulen la formación del complejo de iniciación de la traducción.

Se ha demostrado la implicación de la fosforilación de eIF4E en la traducción selectiva de los mRNAs, ya que la inhibición de las MNKs mediante CGP57380 o impidiendo su unión a eIF4G afecta únicamente a la traducción de mRNAs que contienen el m⁷G cap y estructuras en forma de horquilla (134).

Muchos de los mRNAs sensibles a eIF4E codifican proteínas relevantes en progresión tumoral al estar implicadas en el control de especies reactivas de oxígeno (ROS), ciclo celular, angiogénesis o apoptosis, como son c-Myc, ciclina D1, el factor de crecimiento vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), la survivina o la ornitina descarboxilasa (ODC) (110,129,130,135,136). Así, los incrementos de los niveles de eIF4E o de su fosforilación que aparecen en cáncer no se corresponden con un incremento de la síntesis global de proteínas, si no con una mayor tasa de traducción de estos mRNAs claves en progresión tumoral que en situaciones fisiológicas se mantienen estrictamente regulados.

La interacción de eIF4E con algunas proteínas de la familia de las 4EBPs también se ha relacionado con el conjunto de proteínas que se traducen bajo unas determinadas circunstancias o en cáncer. Un ejemplo es el complejo represor de la traducción formado por la proteína de retraso mental del cromosoma X frágil (FMRP), que se une y actúa como estabilizador, transportador o represor de un amplio grupo de mRNAs (137), y la proteína citoplasmática asociada a FMRP (CYFIP1), una proteína de la familia de 4EBPs que se une a eIF4E impidiendo la formación del complejo eIF4F (138). La modulación de este complejo por MNK se ha relacionado con la traducción de mRNAs implicados en progresión tumoral y metástasis y en plasticidad neuronal.

En neuronas de ratón, la activación de MNK en respuesta a la señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) da lugar a la liberación de eIF4E del complejo CYFIP1/FMRP, incrementando la traducción de mRNAs dendríticos implicados en procesos de plasticidad sináptica principalmente a través de moduladores del citoesqueleto de actina (139, 140).

FMRP se encuentra sobreexpresado y participa en la progresión y metástasis de múltiples tipos de cáncer (141–146). En células de ratón de cáncer de mama, FMRP se ha asociado con el control de la expresión de mRNAs implicados en migración, adhesión e invasión como la vimentina, la E-cadherina, la Ocludina, la fibronectina 1, la proteína asociada a microtúbulos (Mtap1b) o factores de transcripción claves en la transición epitelio mesénquima (EMT) como la proteína 1 relacionada con la torsión (Twist) o la proteína *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2* (ZEB2) (147). Se ha demostrado que la inhibición farmacológica con MNK-I1 y genética de las MNKs disminuye la vimentina a nivel de proteína, a través del incremento de la unión de eIF4E al complejo CYFIP1/FMRP, que reprime la traducción de vimentina (148). Dado que el sistema CYFIP1/FMRP regula la traducción y estabilidad del mRNA de multitud de proteínas implicadas en la modulación del citoesqueleto y EMT, el control de su interacción con eIF4E podría suponer el mecanismo por el cual las MNKs están implicadas en procesos de migración y metástasis.

Algunos ensayos han cuestionado el papel de la fosforilación de eIF4E en la liberación de CYFIP1, ya que las formas mutadas no fosforilables de eIF4E (S209A y S209C) tienen una menor afinidad por CYFIP1 que la forma *wild-type* (148) y la zona de interacción de CYFIP1 con eIF4E coincide con la región de unión a eIF4G, lo que podría suponer un impedimento para que se produzca la fosforilación de eIF4E (138). El control de la interacción entre CYFIP1/FMRP1 y eIF4E por MNK1 podría estar mediado por la fosforilación de otros sustratos de MNK o, incluso, a través de la fosforilación de las propias CYFIP1/FMR1.

Otras proteínas que interaccionan con eIF4E y regulan un grupo determinado de mRNAs son el transportador de eIF4E (4E-T), Maskin o Neuroguidina, aunque por el momento no se ha determinado su implicación en cáncer (36).

4.3.2. Transporte entre núcleo citoplasma

Una fracción de eIF4E se localiza en el núcleo, donde participa en la exportación nuclear de un determinado grupo de mRNAs y en su procesamiento, incluyendo la adición del m⁷G cap (149) y la maduración de la región 3' terminal del pre-mRNA (150). La implicación en procesos de exportación depende de una región estructural localizada en el 3' UTR de algunos mRNAs y que se denomina elemento sensible a eIF4E (4E-SE). Cientos de transcritos estarían modulados a este nivel por eIF4E, incluyendo los mRNAs de proteínas implicadas en ciclo celular y progresión tumoral como ciclina D1, ODC, Mdm2/HDM2, Nibrina o c-Myc (151,152). Para llevar a cabo la exportación de estos mRNAs, eIF4E forma un complejo con el mRNA a través de la unión de la proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptidos ricos en leucina (LRPPRC) a las regiones 4E-SE y la asociación, entre otras, de hrRNPA1 y la exportina-1, que permiten la transición a través del poro nuclear en un mecanismo diferente al de exportación clásico de la mayoría de mRNAs (153).

El control de eIF4E sobre la exportación de mRNAs contribuye a la actividad oncogénica de eIF4E (151,154–156) y está regulada por la fosforilación en la Ser209 de tal manera que la actividad MNK promueve el transporte de mRNAs entre núcleo y citoplasma. Así, se ha demostrado que mutaciones en la Ser209 o la inhibición farmacológica de MNK por CGP57380 suprimen la

exportación nuclear del mRNA de proteínas como la ciclina D1 o HDM2, la cual controla la actividad y niveles del factor de transcripción p53 (121,157).

El control del transporte entre núcleo y citoplasma y la estabilidad de mRNAs específicos con relevancia en cáncer también podría estar regulado por SPF y hnRNPA1 a través de MNK.

4.3.3. Modulación de la señalización de mTORC1

4.3.3.1. mTOR: señalización y relevancia en cáncer

La proteína mTOR es una serina treonina quinasa con un papel central en crecimiento celular y que constituye la subunidad catalítica de dos complejos diferenciados, mTORC1 y mTORC2, compuestos por distintas subunidades que determinan su señalización. mTORC2 controla la supervivencia celular, la organización del citoesqueleto y el metabolismo de glucosa y lípidos y tiene como sustratos principales a AKT y SGK1, mientras que mTORC1 regula proliferación, crecimiento, metabolismo, autofagia y síntesis de proteínas a través de diversos sustratos. La regulación de la traducción de proteínas por mTOR tiene lugar por varios mecanismos entre los que se encuentran la fosforilación de las proteínas 4EBP o la fosforilación de la quinasa p70 ribosómica (p70S6K), que se activa para fosforilar a la proteína ribosomal S6 (rpS6) y otras proteínas implicadas en la iniciación de la traducción. Entre las dianas traduccionales de mTOR se encuentra un grupo de mRNAs que contienen motivos TOP, que incluyen proteínas ribosomales, el factor de elongación 2 (eEF2) o PABP (11).

La actividad de mTORC1 responde a una gran cantidad de estímulos como factores de crecimiento, señales de estrés, energía celular, etc. y se encuentra constitutivamente activa en un alto porcentaje de tumores, ya sea por alteraciones genéticas en rutas de señalización que regulan su actividad, como PI3K/AKT o Ras/MAPK, por sobreexpresión de componentes del complejo mTORC1 o por la pérdida de inhibidores de su señalización (158).

Existen dos familias de inhibidores de mTOR: la rapamicina y sus análogos sintéticos denominados rapálogos (como el temsirolimus y el everolimus) y los inhibidores competitivos de ATP. La rapamicina y los rapálogos son inhibidores alostéricos que dan lugar a una inhibición parcial de mTORC1 que afecta solo a algunos de sus sustratos y que no inhibe la actividad de mTORC2. El uso de rapálogos está aprobado en clínica, pero tienen un efecto limitado como terapia en cáncer debido a la inhibición incompleta de mTORC1 y a la generación de mecanismos compensatorios (159).

4.3.3.2. Interacción entre las rutas de MNK y mTOR

Las rutas de MNK y mTOR se encuentran conectadas a distintos niveles. Varios estudios han demostrado una reducción de la actividad de mTORC1 tras la inhibición de MNK. En líneas de glioblastoma la inhibición con CGP57380 o el silenciamiento de MNK1 disminuye ligeramente la fosforilación de 4EBP1 en la Ser65 e incrementa la asociación de 4EBP y eIF4E (160), mientras que el inhibidor dual de MNK1/2 MNKI-57 reduce la fosforilación de 4EBP1 en las Thr70 y en la Ser65 en una línea de leucemia mieloide crónica (161). Otros inhibidores de MNK como los derivados

de retinamidas también tienen un efecto inhibitorio sobre la señalización de mTORC1 (162,163). El silenciamiento de MNK1 o MNK2 o ambas en células HeLa, además de atenuar la señalización de mTORC1 como el CGP57380, incrementa los niveles de DEPTOR, que actúa como inhibidor de mTORC1 (164). La traducción de TOP mRNAs tras la estimulación por suero también se ve suprimida con la inhibición de MNK (165).

El mecanismo propuesto para la contribución de las MNKs a la señalización de mTORC1 supone que MNK interactúa directamente con mTORC1 promoviendo el desplazamiento de la proteína DEPTOR y la asociación de la proteína TEO2, que incrementa la interacción de mTORC1 con su sustrato y con ello su actividad. MNK se encuentra interactuando con varias proteínas del complejo mTORC1: mTOR, TEO2, raptor y la ubiquitina ligasa DDB1. La asociación se ve potenciada con la activación de MNK por las MAPK y su inhibición por CGP57380 reduce la asociación de MNK a TEO2/DDB1, pero no afecta a su unión con mTORC1. La interacción entre MNK y mTORC1 es independiente de la región de MNK que se une a eIF4G y está favorecida por la actividad catalítica de MNK, ya que la forma constitutivamente activa de MNK1 (T344D) o la isoforma MNK1b presentan una mayor asociación de mTOR/TEO2 respecto a MNK1a o la forma mutada de MNK1 (D191A) sin actividad quinasa (164,166).

Ensayos de espectrometría de masas en inmunoprecipitados de MNK1/2 en células HEK293 han confirmado la interacción entre MNK2 y mTOR y RAPTOR, pero no de MNK1. Dicha interacción no se ve modulada por el inhibidor eFT-508 (167), que tampoco afecta a la fosforilación de 4EBP1 (168). Otros inhibidores específicos de MNK como MNK-7g o MNK-I1 o ensayos en MEFs KO para las MNKs no han demostrado una regulación de la señalización de mTORC1 por MNK en respuesta a la activación de mTOR por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), suero o EGF (25). Estos estudios sugieren que la regulación positiva de mTOR por las MNKs es más limitada de lo inicialmente reportado por Brown y Gromeier (164).

4.3.3.3. Resistencia a rapamicina mediada por MNK/eIF4E y combinación de inhibidores.

La inhibición de mTORC1 por rapamicina y rapálogos desencadena la activación de al menos dos mecanismos que contribuyen a la resistencia a este compuesto y que permiten mantener la proliferación y supervivencia de las células tumorales; un incremento de la fosforilación de AKT (Ser473) y de eIF4E. Estos procesos se producen de forma dependiente de la actividad de PI3K (169,170) y en el caso de eIF4E, además, dependiente de las MNKs (170). La activación de las MNKs tras la inhibición de mTORC1 podría mantener la supervivencia por dos mecanismos: por un lado, de acuerdo con el modelo de Brown y Gromeier (164), reactiva la propia señalización por mTORC1 a través de la interacción con TEO2, y por otro, se activa la señalización pro-supervivencia de MNK/eIF4E y sus otros sustratos.

El mecanismo por el cual se produce una activación de las MNKs no está claro, pero de acuerdo a algunos autores, la activación de las MNKs es independiente de la ERK, p38 MAPK y mTORC2 (170,171,171,172), aunque en otros estudios se ha observado una relación con la señalización por ERK (160,172). Estudios recientes han demostrado que mTORC1 fosforila directamente a MNK2a

en la Ser74, disminuyendo su actividad catalítica, lo que supone un nuevo punto de regulación entre ambas rutas. La pérdida de esta fosforilación tras la inhibición parcial de mTOR con rapamicina incrementan la fosforilación de eIF4E y la señalización de mTORC1, así como las capacidades oncogénicas de células tumorales (25). Otro mecanismo propuesto para explicar la regulación positiva entre mTORC1 y MNK se basa en la reducción de los niveles intracelulares del micro-RNA (miRNA) miR-7-5p, que actúa como supresor de tumores y que tiene como diana a MNK1. En líneas de cáncer de pulmón se ha observado que el tratamiento con everolimus induce la secreción de exosomas cargados con miR-7-5p por lo que disminuye su inhibición sobre MNK y se promueve la fosforilación de eIF4E (173).

El incremento de la fosforilación de eIF4E tras la inhibición de mTORC1 con rapamicina o rapálogos se ha reportado en líneas tumorales de pulmón (169,170,174), colon (169,170), mama (164,169,170), glioblastoma (160,164,170), mieloma (170), próstata (165,169,175) meduloblastoma (171), leucemia mieloide aguda (176), leucemia aguda linfoblástica (177) o melanoma (164). La contribución de las isoformas de MNK en este mecanismo compensatorio parece depender del tipo celular y en algunos casos, como en meduloblastoma y próstata parece estar mediada exclusivamente por MNK2 (171,175).

Como demuestran múltiples ensayos, la inhibición simultánea de mTORC1 con rapamicina o rapálogos y el silenciamiento o la inhibición de MNK bloquea el incremento de la fosforilación de eIF4E y tiene un efecto inhibitorio más pronunciado sobre las capacidades oncogénicas de las células tumorales respecto al uso de ambas terapias por separado. Así, la combinación de rapamicina o rapálogos con CGP57380 da lugar a una mayor inhibición de la proliferación (69,160,165,170,171,174,176,177), la síntesis global de proteínas (69,160,165) o la migración (178). A nivel molecular, la combinación de ambas estrategias disminuye la fosforilación de sustratos de mTOR como 4EBP1 (160,164), incrementa la asociación 4EBP1:eIF4E (160), reduce la traducción de TOP mRNAs (165), bloquea la progresión del ciclo celular acompañado de una disminución de ciclinas (69,165) e induce apoptosis (75). Efectos similares se han encontrado con otros inhibidores de MNK como la cercosporamida (179,180), MNKI-57 (inhibidor dual MNK1/2) o MNKI-4 (selectivo para MNK2) (161). Los efectos sinérgicos de la combinación de rapamicina e inhibidores de MNK o su delección también se han demostrado *in vivo* en modelos de glioblastoma, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal (160,174,181).

4.3.5. Traducción dependiente de IRES

La traducción independiente de m⁷G cap se basa en el reconocimiento de dominios de RNA estructurados denominados IRES presentes en el 5'UTR de algunos mRNAs y que permiten reclutar a la subunidad 40S del ribosoma. Este mecanismo de traducción se descubrió inicialmente en virus, donde está ampliamente estudiado, y posteriormente en algunos mRNAs celulares. La traducción dependiente de IRES se activa en respuesta a diferentes tipos de estrés como daño en el DNA, privación de aminoácidos, hipoxia o estrés del retículo y su disfunción se ha asociado con algunas patologías como el cáncer. El bloqueo de la traducción dependiente de cap puede desencadenar la activación de este tipo de traducción para mantener los niveles de algunas proteínas que contienen IRES en sus mRNAs como c-Myc, VEGF, FGF o XIAP(182).

Se ha observado que la expresión de mutantes activos de MNK1/2 en células HEK293 disminuye la traducción dependiente de cap en relación a la traducción independiente de cap (183), aunque en otros casos, como en neuronas de *Aplysia* la sobreexpresión de MNK no incrementa la traducción dependiente de IRES (184,185).

La traducción dependiente de IRES está regulada por proteínas denominados *IRES-trans acting factors* (ITAFs) que pueden colaborar con algunos de los factores canónicos de iniciación de la traducción y que ejercen su función por distintos mecanismos (182). Uno de los sustratos de MNK, hnRNPA1 funciona como un ITAF que puede tanto suprimir la traducción dependiente de IRES como potenciarla, como ocurre con el FGF-2, el factor 1- α inducible por hipoxia (HIF1 α), la ciclina D1 o c-Myc (186). La traducción dependiente de IRES de la ciclina D1 y c-Myc, proteínas claves en proliferación y ciclo celular, se activa tras la inhibición de mTOR por rapamicina y sus análogos o tras la inducción de estrés del retículo endoplasmático de forma dependiente de la señalización de p38/ERK/MNK. (187–189). En líneas de mieloma múltiple, el silenciamiento específico de MNK1, pero no el de MNK2, o su inhibición por CGP57380 reduce la traducción dependiente de IRES de c-Myc y previene la inducción de esta traducción por rapamicina o estrés del retículo, al igual que ocurre en MEFs doble KO para MNK1 y MNK2 (188,189). En consecuencia, en estas líneas la inhibición de MNK disminuye parcialmente los niveles de c-Myc, mientras que su expresión se reduce completamente cuando CGP57380 se combina con rapamicina (188). La regulación de este sistema por parte de MNK podría relacionarse con la modulación de la actividad de hnRNPA1, que regula positivamente la traducción dependiente de IRES de ciclina D1 y c-Myc (190,191). Algunos autores sugieren que durante el estrés del retículo endoplasmático la fosforilación de hnRNPA1 promueve su asociación con el IRES de c-Myc, facilitando la traducción de c-Myc (192). PSF también funciona como ITAF que regula positivamente la traducción de la familia Myc (59).

Otra proteína que presenta secuencias IRES en su 5'UTR y cuya traducción está mediada por MNK1 tras la estimulación con TNF α es la proteína promielocítica de leucemia (PML), la cual funciona como un regulador transcripcional y como supresor de tumores (193).

Por otro lado, la actividad de MNK promueve la traducción dependiente de IRES de un virus oncolítico a través de la regulación de la quinasa rica en serina y arginina (SRPK) y a sus sustratos, las proteínas SR, las cuales tienen un papel clave en *splicing*, transporte, estabilidad y traducción de mRNAs, incluyendo la traducción dependiente de IRES viral. La actividad de MNK estaría asociada con la retención citoplasmática de SRPK y la reducción de su actividad nuclear, en un mecanismo independiente de la fosforilación de eIF4E o de la unión a eIF4G (194,195).

4.4. Inhibidores de MNK en cáncer

Las MNKs no son esenciales para el crecimiento celular durante el desarrollo embrionario; ratones que carecen de *Mnk1*, *Mnk2* o ambos son viables, fértiles y se desarrollan correctamente y los MEFs obtenidos de estos ratones mantienen tanto la síntesis global de proteínas como la traducción dependiente de cap (22). Dada la relevancia de la fosforilación de eIF4E y de MNK en oncogénesis y que las MNKs son dispensables en el desarrollo normal, la inhibición farmacológica de estas

quinasas se presenta como una alternativa prometedora y con menos efectos secundarios en el tratamiento del cáncer.

Durante las últimas dos décadas se han desarrollado multitud de inhibidores de MNK capaces de suprimir el crecimiento tumoral, aunque por el momento ninguno ha sido aprobado para su uso en clínica (Tabla 1). La eficacia antitumoral de estos inhibidores se ha comprobado en líneas celulares y modelos animales de distintos tipos tumorales, dando lugar a una inducción de apoptosis, inhibición de la proliferación, migración e invasión, así como a una disminución del tamaño tumoral y metástasis en modelos animales. Muchos de los inhibidores de MNK inhiben otras quinasas además de las MNKs, lo que puede potenciar los efectos antitumorales observados o dar lugar a efectos adversos.

Los primeros inhibidores de MNK descritos capaces de disminuir la fosforilación de eIF4E fueron derivados de la estaurosporina, un inhibidor multiquinasa de origen natural (196). El CGP57380 fue el primer inhibidor sintético de MNK identificado (183) y es uno de los más utilizados en experimentación en cáncer a pesar de su baja potencia (valores de IC₅₀ en el rango micromolar) y de que inhiba otras quinasas a concentraciones similares, como la caseína quinasa 1, SGK1, MKK1 o AuroraB (197). La cercosporamida, aislada del hongo *Cercosporidium henningsii*, también ha sido utilizada ampliamente como inhibidor de MNK en cáncer (179,180,198,199). Aunque presenta mayor potencia que CGP57380, con valores de IC₅₀ para las dos MNKs en el rango nanomolar (198), tampoco es completamente específica de las MNKs, ya que inhibe a quinasas como PRK2, BRSK1/2, IKK ϵ o MAP4K3 con una potencia similar (148). Por ello, aquellos mecanismos dilucidados a partir de la inhibición con estos compuestos no garantizan la acción directa de las MNKs.

Existe una gran diversidad de estructuras químicas cuyas modificaciones han dado lugar a diferentes inhibidores de MNK con mayor eficacia y selectividad respecto a los inhibidores clásicos de MNK, entre los que se encuentran los derivados de pirrolo-pirimidina (200), derivados de pirimidina-tiazolona como el MNKI-8e (201,202), derivado de indazol-dihidropiridina como SEL201 (72,86,89,203), derivados de amina-piridona como eFT508, uno de los compuestos descritos hasta el momento que presenta mayor selectividad (204) o los derivados de imidazo-piridina como el ETC-206 (205) y el ETC-168 (78,205). Los derivados de tienopirimidina constituyen un amplio grupo de inhibidores de MNK que, en general, presentan una potencia elevada en el rango nanomolar y cierta selectividad, aunque para la mayoría de ellos no se han realizado ensayos de selectividad extensos. Entre ellos se encuentra MNK-I1 (24,148), MNK-7g (206), MNKI-19 (207), MNKI-57 (161) 12dj (208) y análogos de ferroceno (209). Dentro de este grupo se han desarrollado también inhibidores selectivos frente a MNK2, que pueden resultar de mayor utilidad en aquellos tumores donde la isoforma MNK2 sea la predominante como son MNKI-85 (207) y MNKI-4 (161).

Otros inhibidores que muestran actividad sobre MNK y propiedades antitumorales pero que originalmente se diseñaron frente a otras proteínas son los inhibidores multiquinasa como Merestinib, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos (210–212), AST-487 (213),

cabozantinib (214), algunos flavonoides (215) y QL-X-138, un inhibidor dual de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) y MNK (216).

Los compuestos anteriormente descritos actúan como inhibidores quinasa de tipo I, que se unen a la forma activa de MNK y compiten por la unión del ATP. También se ha descrito un inhibidor de tipo II, EB1, que se une a la conformación inactiva de MNK1 evitando la adquisición de su forma activa (217) y 4t, un inhibidor alostérico derivado del eFT508 (218). Además de los inhibidores de la actividad quinasa, también se han descrito compuestos con actividad antitumoral que actúan como degradadores de MNK1/2 a través del proteasoma, como la galaterona y sus análogos, originalmente diseñados como inhibidores de la síntesis de andrógenos (219–221) y las nuevas retinamidas, que también actúan degradando el receptor de andrógenos (AR) (87,163,222) y tienen un potente efecto antitumoral en cáncer de mama y próstata (87,162,163,222,223). Entre las nuevas retinamidas destacan VNLG-152 (87,163,223) y su mezcla racémica VNLG-152R (162), VNHM-1-81, VNHM-1-66 y VNHM-1-73 (222).

Tabla 1. Inhibidores de MNK.

Compuesto		Tipo de inhibidor	Diana
CGP57380		Quinasa tipo I	MNK1/2
Cercosporamida		Quinasa tipo I	MNK1/2
MNKI-8e		Quinasa tipo I	MNK1/2
SEL201		Quinasa tipo I	MNK1/2
eFT508		Quinasa tipo I	MNK1/2
Derivados de imidazo- piridina	ETC-206 ETC-168	Quinasa tipo I	MNK1/2
Derivados de tienopirimidina	MNK-I1 MNK-7g MNKI-19 MNKI-57 12dj	Quinasa tipo I	MNK1/2
	MNKI-85 MNKI-4	Quinasa tipo I	Mayor selectividad para MNK2
Merestinib		Quinasa tipo II	Inhibidor multiquinasa
AST-487		Quinasa tipo II	Inhibidor multiquinasa
Cabozantinib		Quinasa tipo II	Inhibidor multiquinasa
Flavonoides		Quinasa tipo I	Inhibidor multiquinasa
QL-X-138		Quinasa tipo I	Inhibidor dual BTK/MNK1/2
EB1		Quinasa tipo II	MNK1/2
4t		Alostérico	MNK1/2
Galaterona y análogos		Degradador	Receptor de andrógenos/MNK1/2
Retinamidas	VNLG-152 VNLG-152R VNHM-1-81 VNHM-1-66 VNHM-1-73	Degradador	Receptor de andrógenos/MNK1/2
BAY1143269		Quinasa tipo I	Mayor selectividad para MNK1

Solo tres inhibidores específicos de MNK han entrado en ensayos clínicos en el tratamiento de tumores sólidos o cáncer hematológico: BAY1143269, que presenta mayor selectividad frente a MNK1 (224), eFT508 (tomivosertib) y ETC-206 (AUM001). Entre los tres, eFT508 se ha empleado en un número mayor de estudios clínicos y se encuentra en fases más avanzadas mientras que los ensayos para BAY1143269 se encuentran detenidos y para AUM001 solo un ensayo se encuentra activo (clinicaltrials.gov).

Los inhibidores de MNK parecen tener efectos distintos a nivel de inhibición de la proliferación, migración e invasión o inducción de apoptosis en función de las líneas celulares y modelos animales en las que se utiliza, así como de su capacidad para inhibir simultáneamente a las dos MNKs o si tienen mayor o menor especificidad por alguna de ellas. Por ejemplo, MNKI-8e inhibe el crecimiento celular en líneas de leucemia mieloide aguda (202), pero no afecta a la capacidad proliferativa de líneas de mama, colon, próstata o páncreas estudiadas (201), al igual que ocurre con MNKI-57 y MNKI-4 (161). Otro ejemplo es eFT508, que no disminuye la proliferación o viabilidad de líneas celulares de cáncer hematológico y tumores sólidos (204), a excepción de líneas de osteosarcoma (225), pero tiene un potente efecto antitumoral *in vivo* en modelos de linfoma de células B difuso (204) cáncer de vejiga (124) y osteosarcoma (225). Por otro lado, mediante el uso de inhibidores selectivos de MNK2 e inhibidores duales de MNK1/2 se ha demostrado que en líneas de leucemia mieloide aguda la inhibición farmacológica de ambas quinasas tiene una respuesta antitumoral más potente que solo la inhibición de MNK2 (207).

4.4.1 Combinación con otros fármacos

La activación de las MNKs constituye un mecanismo de resistencia en cáncer que mantiene la supervivencia celular durante el uso de terapias como los inhibidores alostéricos de mTORC1, algunos fármacos quimioterapéuticos o inhibidores de quinasas.

La activación de MNK y el incremento de la fosforilación de eIF4E se ha relacionado con resistencia a quimioterapias como la gemcitabina en cáncer de páncreas (80), la temozolomida y el trióxido de arsénico en glioblastoma (226–228), paclitaxel en cáncer de ovario (123), doxorubicina y cisplatino en cáncer cervical (229), doxorubicina, ciclofosfamida y fluorouracilo en pacientes de cáncer de mama (120) y citarabina (176) y azacitidina (203) en leucemia. De acuerdo con su papel como mecanismo de resistencia, la inhibición de MNK disminuye el incremento en la fosforilación de eIF4E y potencia los efectos antitumorales de estos compuestos (80,221,226,227,225,230,231,231,229,120,229,203,176,228,219).

El tratamiento con algunos inhibidores de quinasas y otros compuestos antitumorales también desencadena un incremento en la actividad de MNK en líneas tumorales asociado a resistencia como ocurre con inhibidores de las proteínas con bromodominios BET (232), los antiandrogénicos bicalutamida y enzalutamida (219,233) y palbociclib, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDK4/CDK6) (234). Igualmente, las estrategias terapéuticas que combinan inhibidores de MNK o su silenciamiento con inhibidores de PI3K α (alpelisib) (235), de la quinasa activada por mitógenos (MEK) (PD901) (214), de la quinasa BCR-ABL (dasatinib e imatinib) (205,236), del receptor de andrógenos (bicalutamida y enzalutamida) (233), de MCL1 (S63845) (78), de CDKs

(palbociclib) (234) o con el anticuerpo monoclonal frente a HER2 (trastuzumab) (237) muestran un efecto cooperativo en la inhibición del crecimiento tumoral o la inducción de apoptosis. La inhibición de la actividad de MNK se presenta, por tanto, como una estrategia terapéutica atractiva para incrementar la sensibilidad de los tratamientos convencionales en cáncer.

Algunos estudios se han centrado en los mecanismos pro-supervivencia promovidos por MNK en presencia de fármacos antitumorales. En glioblastoma, la resistencia a temozolomida se ha relacionado con la influencia de MNK sobre la fosforilación de proteínas involucradas en estrés, daño al DNA y organización del citoesqueleto de microtúbulos. En particular, se han detectado fosforilaciones sensibles a la inhibición de MNK en eIF4G1 que influyen sobre el estado de fosforilación de eIF4E y la traducción de proteínas pro-supervivencia (226). En otros casos como el del Trastuzumab se produce una sobreexpresión de MNK inducida por el factor de transcripción YB-1 (237). En el tratamiento con temozolomida (226) y bicalutamida (233) la activación de MNK es dependiente de ERK mientras que los inhibidores BET (232) actúan sobre p38 MAPK para activar MNK. Por otro lado, el trióxido de arsénico se une directamente y activa la actividad quinasas de MNK1 incrementando la fosforilación de eIF4E y la traducción de mRNAs anti-apoptóticas (228).

5. Proteínas reguladas por MNK en cáncer

La señalización de las MNKs se ha relacionado con procesos de apoptosis, migración celular y control del ciclo celular a través del control de la traducción de mRNAs específicos que podrían variar en función del tipo tumoral o la señalización que hayan activado o inhibido otras terapias. (Figura 4).

5.1. MNK y apoptosis

Una de las principales características presentes en todas las células tumorales es su capacidad para evadir los procesos de muerte celular programada o apoptosis (238). Los primeros estudios que analizaron el papel de MNK en tumorigénesis relacionaron su actividad con una supresión de la apoptosis. Linfomas que expresan la forma activa de MNK1 (T332D) presentan un menor nivel de apoptosis en un modelo de linfomagénesis en ratón, al igual que ocurre en MEFs transformados con c-Myc (84). Por otro lado, en MEFs KO para MNK1 y MNK2 y doble KO se produce una hipersensibilidad a la apoptosis tras la privación de suero que se corrige al introducir la forma *wild type* de MNK1 o la forma activada MNK1 T332D (84,239).

5.1.1. Familia Bcl-2: MCL1

Una de las primeras proteínas reguladas por MNK que se identificó fue la proteína de células de leucemia mieloide 1 (MCL1). MCL1 pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, que regulan la ruta mitocondrial de la apoptosis. A través de interacciones proteína-proteína, MCL1 mantiene la supervivencia celular al impedir que las proteínas BAK y BAX oligomericen y permeabilicen la membrana externa de la mitocondria desencadenando la muerte celular (240). El gen de MCL1 se encuentra amplificado en múltiples tipos tumorales (241) y presenta unos

elevados niveles de expresión en diversas líneas de cáncer (242), donde juega un papel esencial en supervivencia celular. MCL1 se degrada rápidamente por el proteasoma por lo que sus niveles intracelulares se ven críticamente afectados por la inhibición de su traducción, lo cual es suficiente para desencadenar la apoptosis (243).

Wendel et al demostraron que tumores o MEFs que expresan la forma activa de MNK1 presentan un incremento en los niveles de MCL1 que se produce a nivel traduccional (84). Además, la sobreexpresión de MNK1b da lugar a un incremento de los niveles de MCL1 en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 (68), mientras que el silenciamiento de MNK1 o MNK2 reduce los niveles de MCL1 en una línea de linfoma difuso de células B (244) y el de MNK1 y 2 simultáneo los disminuye a nivel de proteína en leiomioma uterino, pero no en líneas de liposarcoma (78).

Una gran parte de los inhibidores de MNK producen un incremento de la apoptosis que va en paralelo a una disminución de los niveles de MCL1, como ocurre con la cercosporamida (180,198), CGP57380 (174,177), el MNKI-8e, (201,202), derivados de pirrolo-pirimidina (200) o el ETC-168 (78), MNKI-19 y MNKI-85 (207), merestinib (212) y EFT-508 (225).

El control de la traducción de MCL1 también se ha relacionado con la capacidad de MNK de mantener la resistencia a algunas terapias usadas en cáncer como la citarabina, que induce un incremento de MCL1 en leucemia mieloide y linfomas. (202). Además, la inhibición de MNK es capaz de incrementar el efecto apoptótico de otras terapias como el everolimus al potenciar la disminución de MCL1 (174,177).

Algunos inhibidores de MNK como el MNKI-8e o el CGP57380 también causan una disminución de la proteína anti-apoptótica BCL-2, perteneciente a la misma familia que MCL1 (174,202).

5.1.2. Familia de Inhibidores de la apoptosis (IAPs)

La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) regula la apoptosis a través de la inhibición de las caspasas (245). Esta familia está formada por 8 proteínas, tres de las cuales están reguladas por MNK: la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), la survivina y cIAP1 (Figura 4). Estas proteínas se encuentran sobreexpresadas en diversos tipos tumorales y generalmente se han asociado con peor pronóstico (245).

XIAP inhibe directamente la actividad de la caspasa iniciadora 9 y de las caspasas efectoras 3 y 7 y, entre otras funciones, regula la señalización del factor nuclear κ B (NF- κ B) (245). En líneas de cáncer de mama inflamatorio el silenciamiento de MNK1 da lugar a una disminución de los niveles de XIAP, al igual que su inhibición farmacológica por CGP57380, mientras que la sobreexpresión de la forma activa de MNK1 (T344D) en células HeLa induce la sobreexpresión de XIAP a nivel de proteína. Tanto el silenciamiento como la inhibición farmacológica de MNK producen, en paralelo, una inhibición de la ruta de NF- κ B y con ello de su señalización pro-supervivencia (246).

En su forma citoplasmática, la survivina interacciona directamente con XIAP, incrementando su estabilidad y promoviendo la inhibición de las caspasas, e interacciona con otras proteínas que

modulan la actividad del resto de IAPs. En su forma nuclear, la survivina está involucrada en la regulación de la mitosis (247). Algunos estudios han asociado el control traduccional de la survivina con los niveles de eIF4E (111,136,248) y con su fosforilación por MNK, ya que su inhibición con CGP57380 (177,233), BAY1143269 (224) o su silenciamiento (249) producen una disminución de los niveles de survivina en algunas líneas tumorales.

Mediante un perfil de polisomas en MEFs de ratones que expresan la forma mutada de eIF4E S209A se identificó cIAP1 como otra proteína de la familia de las IAPs regulada a nivel de traducción por la fosforilación de eIF4E, la cual se ve disminuida también tras la inhibición de MNK con CGP57380 en líneas de próstata (250).

5.2. MNK y proliferación

La inhibición de MNK no siempre da lugar a una inducción directa de la apoptosis. En función de la línea celular y el inhibidor los efectos antitumorales de la inhibición de MNK pueden deberse únicamente a alteraciones en el ciclo celular y la capacidad de proliferación (160,161,251). La proliferación sostenida es una de las principales características de las células tumorales a la que contribuyen, entre otros, la expresión desregulada de proteínas reguladoras del ciclo celular o la activación constitutiva de rutas de señalización que participan en el control de la división celular y el crecimiento (252). La regulación de la proliferación por parte de MNK se ha asociado principalmente con la traducción de proteínas claves en ciclo celular y señalización que promueven proliferación, como son la ciclina D1, c-Myc, la β -catenina y algunas CDKs (Figura 4). El control de la traducción de estas proteínas podría ejercerse a través de la regulación de eIF4E o, como ocurre en el caso de la ciclina D1 o c-Myc, también podría producirse de forma independiente de la fosforilación de eIF4E a través de la regulación de la traducción dependiente de IRES.

5.2.1 Proteínas relacionadas con ciclo celular: Ciclinas y CDKs

Algunos inhibidores de MNK como CGP57380 (165,251), QL-X-138 (216), ETC-168 (78), BAY1143269, MNKI-19, MNKI-85 (207), MNKI-57 (161), derivados de pirrolo-pirimidina (200), flavonoides (215), galeterona y análogos (219,221) inhiben la proliferación celular al inducir la parada del ciclo celular en la fase G0/G1, al igual que ocurre con el silenciamiento de eIF4E (112,253–255). Otros compuestos como la retinamida VNLG-152, producen una parada del ciclo en fase S, además de en G0/G1 (223), mientras que Merestinib y el inhibidor de MNK1/2 SEL201 detienen el ciclo en la fase G2/M (89,212).

Las CDKs son serina/treonina quinasas claves para la progresión del ciclo celular y cuya actividad catalítica está regulada por la interacción con ciclinas. La progresión del ciclo celular a través de la fase G1 está controlada mayoritariamente por las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3), que regulan a CDK4/CDK6. La ciclina D1 se encuentra frecuentemente desregulada en cáncer y se relaciona con peor pronóstico en pacientes y su sobreexpresión se ha asociado con multitud de procesos oncogénicos tanto dependientes como independientes de CDK (256)

La regulación de la ciclina D1 por parte de MNK/eIF4E se puede producir a nivel del control de su traducción o a nivel del transporte de su mRNA. En los primeros estudios realizados en relación a las ciclinas se observó que una sobreexpresión de eIF4E incrementaba la ciclina D1 a nivel de proteína en MEFs (257) y la exportación de su mRNA al citoplasma (258) de una forma dependiente de la fosforilación por MNK (121), mientras que su silenciamiento produce una disminución de los niveles de ciclina D1 a nivel de proteína en diversas líneas de cáncer (111,112,233,255). De acuerdo con estos resultados, la expresión de la ciclina D1 sigue un patrón similar cuando se sobreexpresa o se silencia MNK1 (67).

La disminución de los niveles de ciclina D1 también se ha observado en distintas líneas tumorales tras la inhibición farmacológica de MNK con inhibidores como el GP57380 (67,75,233,251,259), VNLG-152 y su forma racémica VNLG-152R (162), degradadores de MNK derivados de retinamida (222), MNKI-57 (161), merestinib (210) galeterona y análogos (219,221) y cercosporamida (180) y EFT-508 (225).

Algunos inhibidores de MNK son capaces de modular no solo los niveles de ciclina D1 sino también de otras ciclinas, CDKs y proteínas relacionadas con el ciclo celular. Inhibidores de MNK1 como BAY1143269 afectan a la expresión de diversos factores implicados en ciclo celular incluyendo diferentes ciclinas (D3, B1, A2, H), la fosfatasa CDC25C y la CDK2 en todas las líneas de cáncer de pulmón y leucemia analizadas (224). Las ciclinas D3 y B1 y CDC25C también se modulan por VNLG-152 o el silenciamiento de MNK1 en líneas de cáncer de mama (223), mientras que la traducción de ciclinas A2 y B2 se reducen con Merestinib en una línea de leucemia linfoblástica aguda (212). En el caso de los inhibidores MNKI-19 y MNKI-85 se aprecian cambios para la ciclina D3 y CDK4 en la línea de leucemia linfoblástica MOLM-13 (207).

El análisis de los mRNAs asociados a polisomas mediante microarray en células de próstata DU145 tratadas con CGP57380 demostró que en esta línea las MNKs están implicadas en la traducción de mRNAs de proteínas involucradas en ciclo celular y proliferación como CDK2, CDK8, CDK9, KAP1, RASSF1, PIAS1 y PCNA (165). Los niveles de CDK2 también se modifican en líneas de leucemia linfoblástica aguda tratadas con CGP57380 (177).

En el caso del ETC-168 los efectos inhibitorios sobre el ciclo celular se han relacionado con una inhibición de la transcripción de los genes FOXM1, E2F1 y WEE1 dependiente de MNK, que se produce de forma similar tras el silenciamiento de las dos quinasas individualmente o en conjunto (78).

5.2.2. c-Myc

El factor de transcripción c-Myc regula la expresión de al menos un 15% del genoma y está implicado en diversos procesos celulares como proliferación, ciclo celular, apoptosis, biogénesis de ribosomas o metabolismo. Se trata de uno de los principales oncogenes humanos, ya que aparece desregulado en una gran parte de tumores (260).

En algunos tipos tumorales, como el carcinoma nasofaríngeo o cáncer de mama, la expresión de eIF4E correlaciona positivamente con la expresión de c-Myc (261,262), mientras que la expresión

de MNK1 se ha asociado con niveles elevados de c-Myc en pacientes de leucemia mieloide aguda (263). El silenciamiento de eIF4E o de MNK1 en líneas tumorales da lugar a una disminución de los niveles de c-Myc (67,255,261), al contrario de lo que ocurre al sobreexpresar MNK1 (67,68). Líneas tumorales que expresan el mutante eIF4E S209A también presentan una reducción de la traducción de c-Myc (122).

La expresión de c-Myc mantenida por MNK/eIF4E en modelos animales de cáncer colorrectal con mutaciones en KRAS es clave para tumorigénesis y su expresión se ve suprimida al combinar la rapamicina con la delección genética de MNK1/2 o con eFT508 (181).

Por otro lado, los inhibidores de MNK como CGP57380 (67,177,233), la galeterona y análogos (221), cercosporamida (180) y BAY1143269 (224) también producen una disminución de c-Myc en distintas líneas tumorales.

5.2.3. β -catenina

La β -catenina es una proteína clave en la ruta de señalización canónica de Wnt regulando la proliferación, la diferenciación, la auto-renovación de células madres, la apoptosis o la migración, por lo que se ha asociado con el desarrollo y progresión de algunos tipos tumorales. Parte de la β -catenina se encuentra unida a la membrana, donde funciona como proteína adaptadora en la adhesión celular y en ausencia de señalización por Wnt es degradada por el proteasoma. En presencia de señalización por Wnt se transloca al núcleo donde actúa como regulador transcripcional (264).

La fase blástica de la leucemia mieloide crónica se caracteriza por una señalización de β -catenina elevada en los progenitores de granulocitos/monocitos (GMPs), lo que permite que esta población funcione como células madre de leucemia (BC-LSCs) y continúe replicándose. En esta población se ha encontrado una sobreexpresión de eIF4E fosforilado en paralelo a los niveles de β -catenina nucleares, que no se produce en otras células madre hematopoyéticas. Ensayos *in vitro* basados en la expresión de las formas mutantes de eIF4E S209A/D y MNK1/2 han permitido demostrar que la sobreexpresión de MNK, eIF4E y su fosforilación por MNK incrementan la traducción de β -catenina, su translocación nuclear y su fosforilación activadora por AKT, permitiendo la auto-replicación celular. De acuerdo con estos resultados, el silenciamiento o la inhibición farmacológica de MNK con tres inhibidores distintos (CGP57380, cercosporamida, AST 487) reduce la activación de la β -catenina y con ello la auto-replicación *in vitro* e *in vivo* de las BC-LSCs (213). La activación de la β -catenina por la fosforilación de eIF4E y MNK se ha demostrado también en varias líneas de cáncer de mama (120), carcinoma nasofaríngeo (265), cáncer cervical (230) y cáncer gástrico (231).

Respecto a los inhibidores de MNK, la galeterona y análogos en cáncer de páncreas, próstata y mama (221,219,266) y la retinamida VNLG-152 (163) reducen los niveles de β -catenina.

La regulación de la β -catenina por MNK tiene un papel relevante en resistencia a quimioterapia. En cáncer de mama se ha observado que la inhibición de MNK con CGP57380 o cercosporamida y el silenciamiento de eIF4E previenen la activación de la señalización por β -catenina inducida

por quimioterapia, potenciando su respuesta anti-proliferativa (120), al igual que ocurre en cáncer gástrico con el inhibidor de MNK tomivosertib (231).

5.3. MNK y metástasis

La metástasis consiste en la diseminación de células tumorales desde un tumor primario a nuevas regiones del organismo a través del sistema linfático o sanguíneo y constituye la primera causa de muerte por cáncer. Para ello, las células tumorales deben de adquirir la capacidad para migrar e invadir los tejidos adyacentes al tumor primario (267). La modulación genética de MNK y una gran parte de sus inhibidores farmacológicos disminuyen la capacidad de migración e invasión en líneas tumorales y la generación de metástasis *in vivo*, algunos de una forma directa y sin afectar a la capacidad de proliferación o apoptosis de las células tumorales como ocurre por ejemplo con el inhibidor MNK-I1 (148) o el MNK-7g (206).

La estimulación de la formación de metástasis por MNK se ha relacionado con la capacidad para modular proteínas clave en la transición epitelio mesénquima (EMT), la ruta del factor de crecimiento transformante β (TGF β) u otras proteínas que controlan la migración o la invasión como NODAL, ANGPTL4 o NDRG1 (Figura 4).

5.3.1 Marcadores EMT

Algunos autores plantean la hipótesis de que en tumores en estados avanzados el mecanismo de EMT, propio de etapas del desarrollo embrionario, proporciona a las células tumorales las características necesarias para generar metástasis. La EMT es un proceso de plasticidad celular en el cual las células epiteliales pierden algunas características como la polaridad apical-basal o las adhesiones entre células y la membrana basal y sufren una transición hacia estados mesenquimales con capacidad de migración e invasión. El proceso inverso de la EMT es la transición mesénquimo-epitelial (MET) y permitiría que las células tumorales cesen su migración y proliferen en otra localización (268). Diversas rutas de señalización se han asociado con la EMT, como la señalización por TGF β , proteínas morfogénicas óseas (BMPs), FGF, EGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Wnt/ β -catenina o Notch. La EMT está regulada a diferentes niveles, siendo uno de los más relevantes el control transcripcional que se ejerce a través de la expresión de los factores de transcripción EMT (EMT-TFs) como ZEB1, ZEB2, Twist1, Snail y Slug, que reprimen y activan la expresión de genes epiteliales y mesenquimales, respectivamente. Las variaciones en la expresión de proteínas necesarias para los procesos de migración y metástasis se utilizan como marcadores del estado de la EMT, cuya inducción se caracteriza por la disminución de marcadores epiteliales como E-cadherina, ZO-1 u ocludina y el incremento de marcadores mesenquimales como la N-cadherina, vimentina, FSP1 o fibronectina. La mayoría de estos marcadores se corresponde con proteínas de membrana que participan en la adhesión celular o componentes del citoesqueleto como la vimentina (267,268).

Algunos estudios han asociado la actividad de MNK con la regulación directa de la traducción de proteínas esenciales para la invasión como las metaloproteasas (MMPs), que permiten degradar la matriz extracelular, y con los EMT-TFs.

El perfil de polisomas en MEFs de ratones eIF4E S209A permitió identificar a MMP3 y MMP9 como proteínas reguladas por la fosforilación de eIF4E a nivel traduccional. Además, se observó una menor expresión de MMP3 en los tejidos tumorales en un modelo animal de cáncer de próstata que expresa el mutante eIF4E S209A (250). En muestras de carcinoma nasofaríngeo, la expresión de eIF4E se correlaciona positivamente con la expresión de MMP9 y el silenciamiento de eIF4E en algunas líneas tumorales da lugar a una disminución de los niveles de MMP9 (112,261) y MMP3 (115). De acuerdo con estos resultados, la expresión de MMP9 aumenta cuando se sobreexpresa MNK1 y disminuye cuando se silencia MNK1 o se inhibe con CGP57380 (67).

El mismo perfil de polisomas en MEFs de ratones eIF4E S209A realizado por Robichaud et al, confirmó la regulación de traducción de MMP3 e identificó Snail como una nueva diana de la fosforilación de eIF4E, resultados que se corroboraron *in vivo* en tumores de ratones que expresan eIF4E S209A (125). La traducción de Snail dependiente de MNK también se ha observado tras el silenciamiento de las MNKs en líneas de melanoma (72).

Otro factor de transcripción clave en la EMT que se ha relacionado con MNK es ZEB1. La inhibición genética y farmacológica de las MNKs con CGP57380 disminuyen los niveles de proteína de ZEB1 sin afectar a los niveles de su mRNA, reduciendo la migración y revirtiendo la EMT, como muestran los cambios en los mRNAs de los marcadores EMT (incremento de E-cadherina y disminución de vimentina). Además, en estos ensayos se demostró que en líneas tumorales de cáncer de páncreas la expresión de ZEB1 es más dependiente de los niveles de MNK2 que de MNK1. El silenciamiento de hnRNPA1 incrementa igualmente la traducción de ZEB1, lo que sugiere que hnRNPA1 podría actuar como un represor de la traducción de ZEB1. En este caso, la fosforilación por MNK podría disminuir la unión de hnRNPA1 al mRNA de ZEB1 e incrementar su traducción como se ha descrito previamente para TNF α (269)

Ensayos en MEFs KO para las MNKs y el uso del inhibidor MNK-I1 han demostrado la regulación directa de la traducción y estabilidad de la vimentina por parte de MNK sin que se afecten los niveles de ZEB1 (148). Sin embargo, otros estudios no han visto cambios en su distribución en el perfil de polisomas al modificar la fosforilación de eIF4E (125) o han demostrado una disminución de la vimentina a nivel transcripcional asociada con la modulación de factores de transcripción EMT por MNK (69,269). De forma contraria a estos resultados, el silenciamiento de MNK2 o MNK2a incrementa la traducción de vimentina y con ello la capacidad de migración e invasión, demostrando el papel como supresor de metástasis de esta isoforma en carcinoma de célula renal (70). Por otro lado, el silenciamiento específico de MNK1 en dos líneas de cáncer de próstata da lugar a la disminución de N-cadherina, MMP9 y 2, Slug, Snail pero no Twist1 (270).

Los efectos inhibitorios sobre la migración, invasión y metástasis de los inhibidores de MNK se han asociado con la modulación de alguno de los marcadores EMT, principalmente con la reducción de marcadores mesenquimales. Por ejemplo, el inhibidor BAY1143269 en líneas de cáncer de pulmón reduce la expresión de ZEB1, Snail y MMP3 (224), mientras que las retinamidas VNLG-152 y VNLG-152R, la galeterona y análogos reducen una amplia variedad marcadores EMT en distintas líneas tumorales (Snail, Slug, ZEB1, MMP9 y 2, vimentina, N-cadherina,

claudina) (162,163,219,221,270). Algunos inhibidores de MNK también incrementan la expresión del marcador epitelial E-cadherina (163,221).

5.3.2 Interacción con la ruta de TGF β

La señalización por TGF β participa en múltiples aspectos de la progresión tumoral, con un papel clave en la inducción de la EMT, y su señalización se encuentra más activa en aquellos pacientes con peor pronóstico. La ruta de señalización canónica de TGF β se basa en la fosforilación de las proteínas SMAD2/3 y su posterior translocación al núcleo formando complejos con SMAD4 para regular la transcripción de genes esenciales en la EMT como SNAI1 (Snail) y SNAI2 (Slug). La señalización no canónica es independiente de las proteínas SMAD y da lugar a la activación de múltiples rutas como las MAPK o PI3K (271).

El análisis de los mRNAs asociados a polisomas mediante microarrays en la línea de glioblastoma BS125 tras el silenciamiento de MNK1 identificó una menor traducción de mRNAs relacionados con la señalización de TGF β , como SMAD2. De acuerdo con estos ensayos, MNK1 controla la traducción de SMAD2 y proteínas reguladas por TGF β como la vimentina, modulando así la motilidad celular. Además, en tejidos existe una correlación positiva entre MNK1 y SMAD2 y la sobreexpresión de MNK1 en la línea BS125 incrementa los niveles de SMAD2 (69).

Por otro lado, la señalización de TGF β produce un incremento de la fosforilación y actividad de MNK a través de su señalización no canónica (69). Este resultado se corroboró en un modelo de inducción de EMT basado en el tratamiento de células de glándula mamarias de ratón NMuMG con TGF β , donde se observó que TGF β producía un incremento de la fosforilación de eIF4E, de una forma dependiente de ERK y p38 MAPK (125). El silenciamiento de MNK1 o su inhibición con CGP57380 (125) o BAY1143269 (224) evitan el incremento de N-cadherina, fibronectina, vimentina y Snail inducido por TGF β , y con ello los cambios que promueven la migración e invasión.

La relación entre la señalización de TGF β y MNK/eIF4E también se ha demostrado en otras líneas celulares no tumorales tratadas con TGF β , como en la línea de células epiteliales de glándula mamaria humana (MCF10A) (125,272,273) o epitelial de pulmón de rata y en células mesangiales del corpúsculo renal (274).

5.3.3 NDRG1

La proteína *N-Myc down-regulated gene 1* (NDRG1) funciona como un supresor de metástasis a través de la modulación de una amplia variedad de rutas de señalización relevantes en EMT, migración, crecimiento tumoral o angiogénesis en respuesta a estrés, hipoxia o iones, entre otros estímulos. NDRG1 puede ser fosforilada en diversos residuos por SGK1, aunque el papel de la fosforilación en progresión tumoral no está completamente esclarecido (275).

Las MNKs están implicadas en la regulación a nivel transcripcional y postraduccional de NDRG1 en cáncer de mama. La inhibición de las MNKs con MNK-I1 incrementa la expresión de NDRG1 a nivel de proteína y a nivel de mRNA en líneas de cáncer de mama, mientras que su fosforilación

disminuye de forma dependiente de MNK1 y no de MNK2, sin que se afecten los niveles de SGK1. La fosforilación de NDRG1 no se produce de forma directa por MNK1 y se desconoce el mecanismo por el cual se produce. Pese a que NDRG1 promueve la migración en el modelo utilizado, la inhibición de la migración que ejerce MNK-I1 se produce igual con el silenciamiento de NDRG1 y en las líneas *wild type*, lo que indica que otros mecanismos independientes de NDRG1 están implicados en la regulación de la migración por MNK, aunque no se puede descartar la contribución de NDRG1 (24).

5.3.4 NODAL

MNK1 tiene un papel relevante en la progresión del carcinoma ductal *in situ* (DCIS) hacia el carcinoma ductal invasivo (IDC) a través de la modulación de la proteína NODAL (89), un morfógeno de la familia del TGF β que se expresa durante el desarrollo embrionario y participa en el mantenimiento de células madre y el desarrollo de las glándulas mamarias, entre otros (276).

Ensayos KO para MNK1 generados por CRISPR-Cas9 o en presencia del inhibidor SEL201 en líneas de carcinoma ductal *in situ* han demostrado que la pérdida de MNK1 reprime NODAL y vimentina y con ello propiedades de células madre y capacidad de invasión *in vitro*, retrasando la formación de metástasis en ratones, al contrario de lo que ocurre al expresar una forma constitutivamente activa de MNK1 (T332D). Además, la expresión de MNK1 fosforilada y NODAL se encuentran elevadas en muestras de IDC y DCIS respecto a carcinomas de menor grado (89).

5.3.5 ANGPTL4 y NGFR

La secuenciación del mRNA total de una línea de melanoma que expresa la forma constitutivamente activa de MNK1 (T332D) ha permitido identificar cambios en la expresión de genes pro-invasivos implicados en adhesión celular y remodelación de la matriz extracelular dependientes de la actividad de MNK1, entre los cuales se encuentra una sobreexpresión de la *Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4) y MMPs (MMP1, 10, 1a, 3) (86). La ANGPTL4 está involucrada en diversos mecanismos como angiogénesis, metabolismo, inflamación o adhesión y participa en el desarrollo tumoral, donde funciona como un regulador de las MMPs (86,277). Su silenciamiento en células que expresan la forma activa de MNK1 resulta en una menor capacidad invasiva sin afectar a la viabilidad, lo que corrobora su implicación en el mecanismo pro-metastásico de MNK1. La regulación de la expresión de ANGPTL4 por MNK1 estaría mediada, en melanoma, por los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) (86).

Por otro lado, en ensayos en líneas de melanoma, la inhibición genética de la fosforilación de eIF4E y farmacológica de MNK con SEL201 han relacionado la actividad de MNK con el incremento de la traducción del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), que promueve invasión y desdiferenciación celular (126).

5.4. MNK y angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos que en cáncer permite vascularizar los tumores, asegurando el aporte de oxígeno y nutrientes necesarios para la progresión tumoral. La sobreexpresión de eIF4E se ha relacionado en multitud de artículos con la traducción del factor de crecimiento más relevante en angiogénesis, el VEGF (278), mientras que su silenciamiento produce una disminución de los niveles de VEGF (111,112,255,279) e inhibe la formación de estructuras tipo vaso sanguíneo en células endoteliales humanas (111). Además, en muestras de tumores de pacientes existe una correlación positiva entre la expresión de eIF4E y VEGF (262,280). Los niveles de eIF4E también se ha relacionado con la traducción de FGF-2, otro factor de crecimiento relevante en angiogénesis (255,279,281).

Sin embargo, existen menos estudios centrados en el papel de MNK en angiogénesis. Se ha demostrado que la cercosporamida afecta a la angiogénesis en carcinoma hepatocelular y renal y el EFT-508 en glioblastoma, ya que son capaces de inhibir la formación de estructuras tubulares, migración, proliferación y supervivencia de células endoteliales primarias (199,180,227). El análisis de los mRNAs asociados a polisomas tras la inhibición de MNK con CGP57380 en cáncer de próstata relacionó MNK con la regulación de la traducción de HIF1a, un factor de transcripción que modula angiogénesis y la adaptación a hipoxia (165), mientras que el perfil de polisomas en MEFs que expresan eIF4E S209A incluyó al VEGFC como proteína regulada por la fosforilación de eIF4E, lo cual se corroboró con el inhibidor CGP57380 (250). Además de CGP57380, la inhibición de MNK con cercosporamida, galeterona y análogos y EFT-508 también disminuye los niveles de VEGF (180,225,270). Por otro lado, en una línea de cáncer de mama, la señalización de la integrina $\alpha 6\beta 4$ incrementa la fosforilación y actividad de MNK, controlando la traducción de VEGF (282).

5.5. MNK y respuesta inmune

Las MNKs participan en la regulación del sistema inmune a través de la señalización de algunos receptores de citoquinas y la producción de citoquinas proinflamatorias (Figura 4). Su actividad se ha relacionado, por ejemplo, con la regulación postranscripcional de $\text{TNF}\alpha$ e IL-17, con la señalización de los interferones de tipo I y II o con la señalización de los receptores tipo Toll (TLRs) en la producción de las citoquinas IL-6, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) o $\text{TNF}\alpha$ (283). Por tanto, las MNKs pueden modular el microambiente tumoral contribuyendo al desarrollo del tumor a través de la regulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias involucradas en crecimiento, angiogénesis y metástasis (284) o promoviendo la supervivencia de neutrófilos pro-metastásicos (285). En términos de inmunidad tumoral, se ha observado que la inhibición de la fosforilación de eIF4E en melanoma reprograma el microentorno tumoral inmunosupresivo, disminuyendo la liberación de factores inflamatorios e inmunosupresores (CCL2, CCL5, IL6, ANGPTL2...), la infiltración de células mieloides supresoras de la respuesta inmune e incrementando la infiltración de linfocitos T $\text{CD}8^+$ (126).

Entre los mRNAs cuya asociación a los polisomas se encuentra disminuida en MEFs que expresan eIF4E S209A se encuentran las quimioquinas CCL7, CCL2, cuyos niveles se encuentran

disminuidos en tumores de ratones que expresan eIF4E S209A, e I κ B α , que actúa como inhibidor de NF κ B α (250).

Algunos inhibidores de MNK dan lugar a una alteración en la secreción de citoquinas. El degradador de MNK VNLG-152R inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8, TNF α y la quimioquina CXCL1 en líneas de cáncer de mama (162). BAY1143269 disminuye la secreción de las citoquinas IL-1 β , TNF α , IL-6 y MCP-1 inducida por LPS en muestras de sangre humana y *ex vivo* en muestras de sangre de ratones con tumores tratados con BAY1143269 (224). Por último, eFT508, en linfoma difuso de células B grandes, disminuye la secreción de IL-6, IL-8 y TNF α debido a una desestabilización selectiva de su mRNA, lo cual podría relacionarse con la fosforilación por MNK de proteínas de unión a RNA como hnRNPA1 o PSF. Dado que el eFT508 no produce una inhibición de la proliferación, la modulación del microambiente tumoral a través de la inhibición de la secreción de citoquinas proinflamatorias es el mecanismo de acción propuesto de sus efectos antitumorales *in vivo* (204).

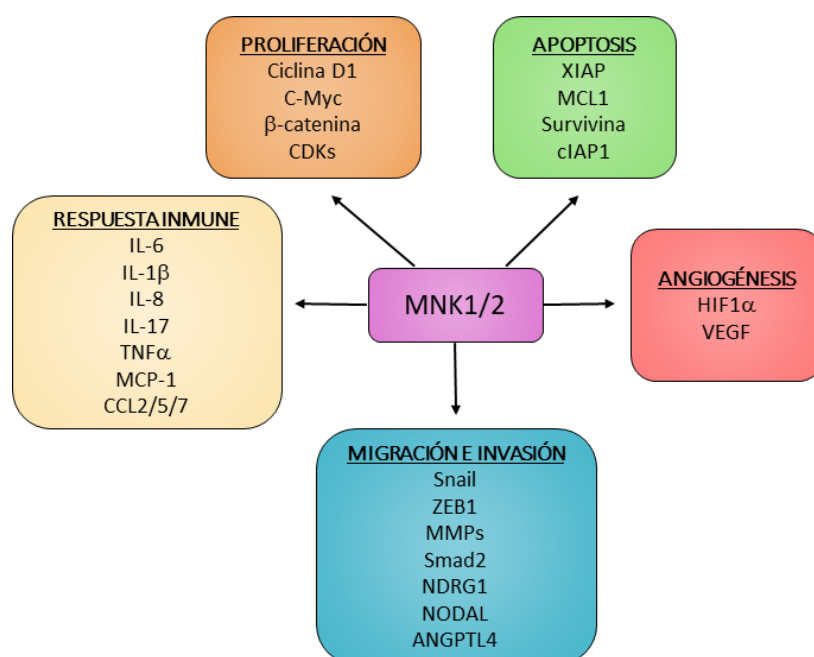


Figura 4. Proteínas reguladas por MNK. Las MNKs regulan los niveles de proteínas clave en procesos de apoptosis, proliferación, migración e invasión, respuesta inflamatoria y angiogénesis

6. Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos de RNA o DNA de cadena sencilla capaces de adquirir una estructura terciaria que se une de forma específica y con alta afinidad a una diana. En 1990 dos grupos independientes describieron por primera vez los aptámeros y desarrollaron su sistema de selección, denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) (286,287).

La técnica SELEX se basa en varios ciclos de selección por unión a una diana y posterior amplificación de las secuencias unidas. El primer ciclo de selección consiste en la incubación de la

diana con una librería de oligonucleótidos compuesta por moléculas de DNA o RNA con una región central de entre 20 y 60 nucleótidos aleatorios flanqueadas por dos regiones de secuencias conocidas que permiten su amplificación por PCR. Gracias a su secuencia aleatoria, cada uno de los aptámeros de la librería puede adoptar diferentes estructuras tridimensionales que encajen con diversas dianas. Posteriormente, las secuencias unidas a la diana se separan de las demás y se amplifican por PCR. Las secuencias amplificadas se someten a sucesivas rondas de selección frente a la diana, de tal manera que se produce un enriquecimiento de los aptámeros con más afinidad hasta que terminan por ser la población mayoritaria (Figura 5). Las secuencias seleccionadas se analizan por clonaje y secuenciación de Sanger o mediante técnicas de secuenciación masiva, las cuales permiten realizar un seguimiento del enriquecimiento de las secuencias, identificando aptámeros de alta afinidad en rondas tempranas (288).

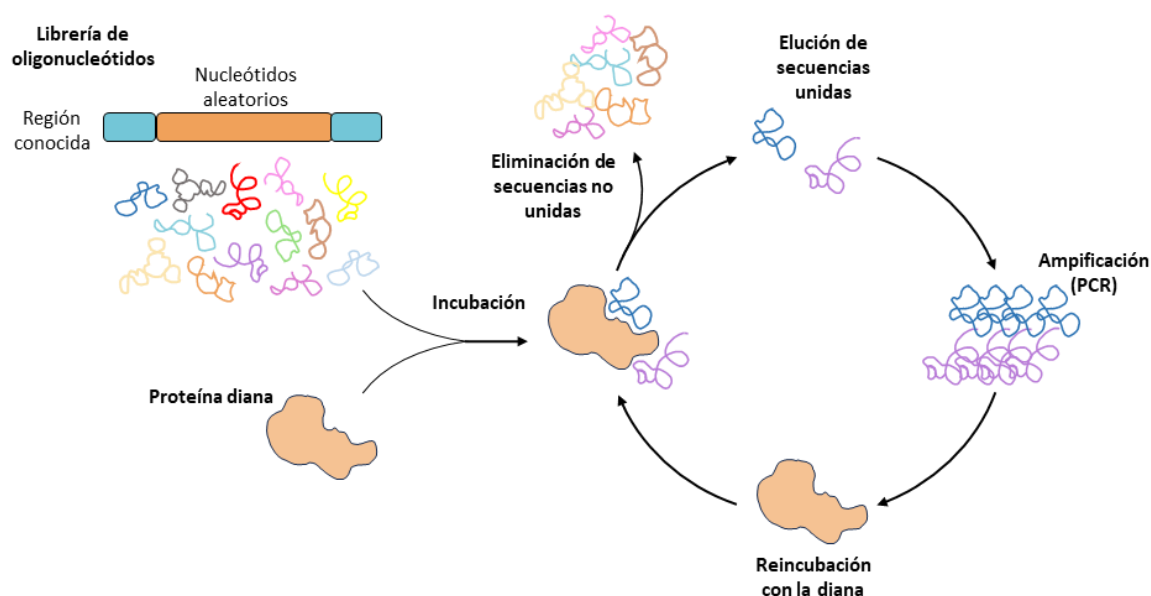


Figura 5. Esquema de la técnica SELEX. El sistema de selección de aptámeros SELEX se basa en la incubación de una librería de oligonucleótidos aleatorios con la proteína diana en sucesivas rondas de incubación y amplificación de las secuencias unidas.

Para facilitar la obtención de aptámeros específicos y con alta afinidad se pueden realizar rondas de selección negativa, que eliminan aquellas secuencias que se unen a componentes del proceso de selección, como la matriz usada para separar la proteína unida al aptámero, o rondas de contra-selección frente a análogos de la diana de interés (288). La técnica de SELEX tiene distintas variantes y puede basarse en la utilización de proteínas purificadas, células enteras que expresen en su superficie la diana (288) u organismos completos, lo que puede asegurar su funcionalidad *in vivo* (289). La interacción entre el aptámero y su diana depende de las condiciones experimentales en las cuales se realiza la selección (fuerza iónica, componentes de los tampones usados, pH, temperatura, tiempo, etc.) por lo que cambios en estas variables pueden afectar a la afinidad y función de los aptámeros (288).

Los aptámeros, gracias a la complementariedad e interacciones entre las bases de su secuencia, se encuentran formando una serie de estructuras secundarias definidas, como bucles, tallos,

horquillas, G-quadruplex, etc., que en su conjunto aportan una conformación tridimensional única. A través de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógenos, apilamiento de bases y a la complementariedad de las estructuras tridimensionales, los aptámeros son capaces de reconocer específicamente una diana con alta afinidad. La interacción que se produce entre los aptámeros y su diana es similar a la que tiene lugar entre los anticuerpos y sus antígenos, por lo que los aptámeros se han denominado también como “anticuerpos químicos” (288).

Los aptámeros tienen una selectividad y afinidad comparable a la de los anticuerpos y pueden ser capaces de distinguir entre dianas altamente relacionadas como enantiómeros (290,291) o proteínas con mutaciones en un único aminoácido (292).

Frente a los anticuerpos monoclonales, los aptámeros presentan una serie de ventajas. Son moléculas de pequeño tamaño, por lo que pueden unirse a dianas de menor tamaño o a dominios inaccesibles para los anticuerpos y penetrar mejor en los tejidos. Además, los aptámeros se producen por síntesis química, de forma más económica y en menor tiempo y, al no involucrar animales o colonias celulares como los anticuerpos, se reduce la posibilidad de contaminaciones y las variaciones entre lotes. Una vez producidos, se pueden liofilizar y permanecer estables por largos periodos de tiempo, resistiendo temperaturas elevadas y ciclos de desnaturalización y renaturalización (288). A diferencia de los anticuerpos, los aptámeros tienen una baja inmunogenicidad (293) y se pueden seleccionar frente a una mayor diversidad de dianas entre las que se encuentran iones metálicos (294), aminoácidos (290), péptidos (291), virus (295), bacterias (296), drogas (297), moléculas orgánicas (298) o antibióticos (299), aunque la mayoría de ellos se han seleccionado frente a proteínas (300).

La aplicación terapéutica de los aptámeros presenta dos inconvenientes principales: son susceptibles a la hidrólisis por nucleasas y, debido a su pequeño tamaño, se eliminan rápidamente del organismo a través de los riñones, por lo que la vida media de los aptámeros *in vivo* es corta (301). Para prolongar su acción los aptámeros se han modificado químicamente. Las modificaciones más habituales para incrementar su resistencia a nucleasas consisten en sustituciones en la posición 2' de la ribosa, que incluyen la incorporación de flúor, grupos amino o grupos O-metilo. Otras estrategias se basan en la modificación del 3' terminal con una timidina invertida o con biotina, la modificación del enlace fosfodiéster o el empleo de nucleótidos en configuración L. Para reducir la filtración renal los aptámeros se han conjugado en su posición 5' con moléculas de mayor tamaño como el polietilenglicol, el colesterol o el dialquil glicerol (302).

Los aptámeros tienen un elevado potencial terapéutico. De forma general, pueden seleccionarse como antagonistas para bloquear la actividad o interacciones entre proteínas asociadas a una patología, como agonistas para activar las funciones de receptores o como molécula transportadora para dirigir otras terapias de forma específica hacia un tipo celular o tejido (288,303).

A pesar de las ventajas y su potencial terapéutico, el éxito de los aptámeros en clínica ha sido bastante limitado y no se encuentran extendidos a nivel comercial. Algunas propiedades de los aptámeros han dado lugar a perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos subóptimos que han

reducido su eficacia en clínica. Además, se trata de una tecnología relativamente reciente y que aún requiere de un mayor desarrollo preclínico.

Desde su descubrimiento solo ha sido aprobado por la FDA el Pegaptanib (Macugen), un aptámero de RNA específico de VEGF, indicado para el tratamiento de la degeneración macular neovascular asociada a la edad (304), aunque su uso ha quedado relegado por el desarrollo de compuestos más efectivos (305). Aunque existe un número mayor de aptámeros en ensayos clínicos como terapia en diferentes enfermedades, solo dos aptámeros han entrado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer: AS1411 y NOX-A12 (306,307).

AS1411 es un aptámero de DNA de 26 nt con estructuras G-quadruplex que le hacen resistente a la degradación por nucleasas. Este aptámero no se generó utilizando la técnica SELEX, sino que se desarrolló en base a la observación de que oligonucleótidos ricos en guanosina, gracias a la adquisición de estructuras G-quadruplex, presentaron propiedades antiproliferativas en líneas tumorales a través de la unión a proteínas celulares específicas, en el caso de AS1411, a la proteína nucleolina (308), una proteína multifuncional que se encuentra sobreexpresada en cáncer (309). Desde su descubrimiento, en paralelo al desarrollo preclínico del aptámero, hubo un gran esfuerzo por determinar su mecanismo de acción que aún se desconoce de forma precisa (310) y que se ha asociado mayoritariamente con la inhibición de las funciones de la nucleolina (311,312,313), pero también con mecanismos independientes de ésta (314). Debido a su baja potencia y a pesar de la baja toxicidad y de su habilidad para inducir respuestas antitumorales en algunos pacientes, los ensayos clínicos para AS1411 se encuentran detenidos a la espera de nuevas formulaciones o conjugados con otros fármacos que mejoren sus cualidades farmacocinéticas (310).

NOX-A12 es un aptámero de RNA en configuración L (denominados Spiegelmer), seleccionado frente a la quimioquina CXCL12. NOX-A12 modula el microambiente tumoral al inhibir la señalización de los receptores de CXCL12, lo que se traduce en una disminución de la quimiotaxis y una sensibilización a otros fármacos (315,316). Además de presentar un perfil de toxicidad bajo, estudios en fase II han demostrado la efectividad de NOX-A12 en pacientes de leucemia linfocítica crónica (317), mieloma múltiple (318), cáncer colorrectal y pancreático (319) en combinación con otras terapias. Actualmente, se investiga el potencial de NOX-A12 en el tratamiento de glioblastoma (NCT04121455) y en cáncer de páncreas metastásico (NCT04901741).

En nuestro laboratorio se ha desarrollado el aptámero apMNKQ2 a partir de la optimización del aptámero parental apMNK2F, seleccionado frente a MNK1b (320). El aptámero apMNKQ2 tiene 29 nucleótidos, una elevada estabilidad gracias a la adquisición de dos estructuras G-quadruplex y una alta afinidad por las dos isoformas de MNK1, que es superior para MNK1b (constante de disociación en el rango nanomolar bajo) (321). Dada la relevancia de MNK1b en cáncer de mama (68), el efecto antitumoral de apMNKQ2 se caracterizó inicialmente en diferentes líneas de este tipo tumoral, así como en un modelo ortotópico de cáncer de mama en ratón (321). Posteriormente se ha demostrado el potencial antitumoral de apMNKQ2 en líneas y modelos animales de cáncer de pulmón (322) y cáncer de páncreas.

OBJETIVOS

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres y supone la primera causa de muerte por cáncer en muchos países. Aunque las mejoras en las terapias y las técnicas de diagnóstico han permitido incrementar las posibilidades de recuperación para un alto porcentaje de las pacientes, aún sigue siendo una enfermedad incurable para algunos subtipos de cáncer de mama y cuando los tumores se detectan en un estadio avanzado (3). Por ello es necesario desarrollar nuevas terapias más eficientes y menos tóxicas para avanzar en el tratamiento de esta enfermedad.

En nuestro grupo hemos seleccionado, caracterizado y optimizado un aptámero frente a MNK1 capaz de inhibir la proliferación, migración e invasión en líneas tumorales de mama y capaz de reducir el tamaño del tumor en un modelo ortotópico de cáncer de mama triple-negativo en ratones (321). El aptámero apMNKQ2 se ha patentado y se han iniciado los ensayos de la fase preclínica, siendo un elemento clave la determinación del mecanismo de acción del fármaco. Por ello, el objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en caracterizar los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos antitumorales de apMNKQ2, con la finalidad de validar su uso como fármaco en el tratamiento del cáncer de mama y potencialmente en otros tipos tumorales.

Los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

- 1) Análisis de la actividad de apMNKQ2 sobre las MNKs y sus sustratos.
- 2) Estudio del efecto de apMNKQ2 en la señalización de MNK relacionada con apoptosis, proliferación e interacción con mTORC1
- 3) Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la transición epitelio mesénquima y proteínas implicadas en migración y metástasis.
- 4) Identificación de los cambios inducidos por apMNKQ2 sobre el transcriptoma, translatoma y proteoma a distintos tiempos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1. Líneas celulares, mantenimiento y siembra

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

- MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26): línea celular epitelial de cáncer de mama de una de una mujer con un adenocarcinoma de mama metastásico del subtipo triple negativo con características mesenquimales (323).
- MCF7 (ATCC, HTB-22): es una línea celular epitelial de cáncer de mama aislada de una mujer con un adenocarcinoma de mama del subtipo luminal A.
- SUM-159: línea celular epitelial de cáncer de mama aislada de una mujer con un carcinoma anaplásico de mama del subtipo triple negativo con características mesenquimales (323).
- MDA-MB-468 (ATCC, HTB-132): línea celular epitelial de cáncer de mama de una mujer con adenocarcinoma metastásico del subtipo triple negativo.
- MCF10A (ATCC, CRL-10317): es una línea de no tumoral de células epiteliales inmortalizada, aislada de la glándula mamaria de una mujer con mamas fibroquísticas.

Las líneas fueron verificadas mediante el sistema GenePrint 10 System (Promega) por última vez en junio de 2021 (MCF7 y MDA-MB-231), mayo de 2022 (SUM-159) y septiembre de 2022 (MDA-MB-468).

Las líneas MDA-MB-231 y las MCF7 se mantuvieron en una mezcla 1:1 de los medios de cultivo DMEM (Biowest) y Ham's F12 (Biowest), suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco) y 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina (Antibiótico-antimicótico, Gibco). En el caso de las células MDA-MB-468 se utilizó medio RPMI (HyClone) suplementado de la misma manera.

Para el cultivo de las SUM-159 se empleó medio Ham's F12 al 5% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 5 µg/ml insulina (R&D Systems), 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), y 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina.

La línea MCF10A se mantuvo en medio DMEM/Ham's F12 (1:1) suplementado con 10 µg/ml de insulina, 20 ng/ml de EGF (Sigma-Aldrich), 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich), 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 5% de suero de caballo (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 0.25 µg/ml de anfotericina, 1 mM de piruvato y 2 mM L-glutamina.

Se trabajó con las diferentes líneas celulares en cultivos bidimensionales utilizando frascos de 25, 75 o 150 cm² (Corning), alojados en un incubador a una temperatura de 37 °C y con un nivel de CO₂ del 5% en atmósfera húmeda.

Los pases celulares y siembra de células se realizaron lavando las células sembradas en monocapa con PBS 1x (VWR) y se separaron enzimáticamente utilizando tripsina 0.25%-EDTA 0.53 mM (Gibco) durante 3 minutos a 37 °C. Posteriormente la tripsina se inactivó y diluyó con medio con

suero en una relación 1:9. Las células se transfirieron en una dilución adecuada a un nuevo frasco para mantener del cultivo o se contaron utilizando azul de tripán (Sigma-Aldrich) y un hemocitómetro (Krape) antes de su siembra en placas de cultivo celular de 6, 12, 24 o 96 pocillos (Corning). En el caso de las MCF10A, las células se incubaron con tripsina 0.05%-EDTA 0.53 mM (Gibco) durante 6-10 minutos para, finalmente, neutralizar la tripsina en DMEM/Ham's F12 (1:1) con un 20% de suero de caballo en una relación 1:5. Estas células se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos y se resuspendieron en el medio suplementado antes de contar. Las células se descartaron tras alcanzar el pase 12.

La ausencia de contaminación por mycoplasmas en los diferentes cultivos celulares se comprobó regularmente mediante el kit MYCOPLASMA Gel Form (Biotools).

Las células se almacenaron a una temperatura de -80 °C o en nitrógeno líquido, dependiendo de si se requerían a corto plazo o para un almacenamiento prolongado, respectivamente. Después de despegar las células y centrifugarlas durante 5 minutos a 1500 rpm, se resuspendieron en FBS con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) y se almacenaron en criotubos en una cantidad de 3×10^6 células por tubo. En el caso de las MCF10A, se utilizó suero de caballo al 5% en DMSO.

1.3. Transfección de células

Los aptámeros apMNKQ2 y P29 fueron sintetizados por Biospring. Los plásmidos pcDNA3-CofilinaWT, pcDNA3-CofilinaS3A, pcDNA3-CofilinaS3E se obtuvieron en Addgene. La obtención de los plásmidos pcDNA3-NDRG1 WT y los mutantes T346A y T346D se describe en el apartado 4. El plásmido pcDNA3-Flag-MNK1a se generó previamente en nuestro laboratorio (20).

Los siRNAs de MNK2 y el siRNA control (SiC) se adquirieron en SantaCruz, mientras que el silenciamiento de MNK1 se llevó a cabo con una mezcla de dos siRNAs diferentes diseñados previamente en el laboratorio con el Silencer siRNA Construction kit (Ambion) (20). Los ensayos de silenciamiento se realizaron con una doble transfección: las células se transfectaron inicialmente con 75 pmol de siRNAs (placa de 6 pocillos) y se volvieron a transfectar con apMNKQ2 24h después.

Los miRNAs se adquirieron en Ambion. Las transfecciones con los miRNAs (miC, miRNA mimic y miRNA inhibidor) se realizaron a concentraciones de entre 5 y 100 nM, de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

Las transfecciones celulares de aptámeros, plásmidos, siRNAs y miRNAs se llevaron a cabo con lipofectamina 2000 (ThermoFisher) 24h después de la siembra con una confluencia del 70-80% aproximadamente. Para todas las transfecciones se mantuvo aproximadamente el ratio entre la superficie de las diferentes placas y el nº de células, volumen de transfección, la cantidad de lipofectamina por pocillo y la cantidad de plásmido/aptámero. En las placas de 24, 12 y 6 pocillos se utilizó 1 µl, 2.5 µl y 5 µl de lipofectamina por pocillo, respectivamente.

Antes de realizar la transfección, los aptámeros se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos y renaturalizaron a 4 °C durante otros 10 minutos en tampón de aptámeros (Tris-HCl 20 mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich), MgCl₂ 1 mM (Sigma-Aldrich), KCl 5 mM (Sigma-Aldrich)).

La lipofectamina, los plásmidos, los siRNAs, los miRNAs y los aptámeros se incubaron por separado con medio Opti-MEM (Invitrogen) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se mezclaron para formar los complejos aptámero-lipofectamina, plásmido-lipofectamina o siRNA-lipofectamina y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Sobre los pocillos de las placas sembradas se añadieron tres cuartos del volumen total de transfección de medio sin antibiótico y una cuarta parte de la mezcla de aptámero-lipofectamina. En el caso de las transfecciones combinadas entre plásmidos y aptámero, los conjugados lipofectamina-plásmido y lipofectamina-aptámero se prepararon por separado para evitar la posible formación preferente de vesículas lipídicas con uno de los dos compuestos respecto al otro. Una vez formados los complejos se mezclaron en el medio de transfección. Cuatro horas después de la transfección se retiró la mezcla DNA-lipofectamina y se añadió medio fresco con antibiótico.

1.4. Ensayos de viabilidad celular (MTT)

La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción de las sales de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales que da lugar a un producto coloreado (formazán). La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas, por lo que permite estimar la viabilidad general celular (324).

Los ensayos de viabilidad se realizaron en placas de 96 pocillos, sembrando por triplicado 1×10^4 células. Tras la transfección con el aptámero, las células se incubaron entre 48 y 72h, según el ensayo solo o en combinación con otros compuestos a 37 °C. Transcurrido este tiempo las células se incubaron durante 3h con 100 µl de reactivo MTT (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml en medio de cultivo. Los cristales de formazán formados se disolvieron en SDS (Sigma-Aldrich) al 10% HCl 10 mM durante 16h a 37 °C. La disolución coloreada resultante se cuantificó midiendo la absorbancia a 540 nm en el lector de placas Infinite M Plex (TECAN) y se expresó como porcentaje respecto al control.

1.5. Ensayos de migración por herida

La capacidad de migración se evaluó mediante ensayos de cierre de heridas, que permiten determinar el movimiento de las células sobre una superficie en dos dimensiones (325). Las células se sembraron a una alta densidad (7.5×10^5 células por pocillo de p6) de tal manera que en el momento de comenzar el ensayo el cultivo se encontrara formando una monocapa. Transcurridas 8h o 24h después de la transfección, las células se trataron con mitomicina 1 µM (Roche) durante 2h para detener la duplicación celular. Posteriormente, se trazó una cruz sobre la monocapa con una punta amarilla estéril, se realizaron lavados con medio para retirar las células levantadas y se tomaron fotos a 2x mediante microscopía de contraste de fases (microscopio Olympus IX70) a

tiempo 0. Las células se incubaron con medio fresco a 37 °C y se volvieron a tomar fotografías a las 12-14h, antes de que la herida en los controles llegue a cerrarse debido a la migración celular. El área del interior de las cruces se cuantificó utilizando la macro *Wound healing tool* de ImageJ en las imágenes tomadas a los dos tiempos. La migración se expresó como el porcentaje de herida cerrada para cada condición, es decir, como el porcentaje de área ocupada a las 12-14h respecto al área total de la herida en el tiempo 0. En cada ensayo independiente se tomaron fotografías de hasta 4 cruces realizadas en regiones distanciadas del pocillo o pocillos diferentes y se calculó la media de cierre de herida entre ellas por condición experimental.

1.6. Ensayos de migración e invasión en Transwell

El sistema Transwell para evaluar la capacidad de migración de las células consiste en un soporte de plástico con una membrana semipermeable con poros de 8 μm que permiten el paso de las células sembradas sobre su superficie. Este soporte se coloca en los pocillos de una placa de 24 pocillos que contiene medio rico en sustancias quimioatrayentes como el suero y que promueva la migración a través de la membrana de la Transwell (Corning). Para evaluar la capacidad invasiva de las células se añadió sobre la membrana de la Transwell Matrigel (Corning), una preparación comercial de membrana basal solubilizada extraída de un tumor de ratón rico en proteínas de la matriz. Esta sustancia se asemeja a la matriz extracelular, que las células deben ser capaces de degradar para llegar y traspasar la membrana del soporte Transwell (325).

Se utilizaron 4×10^4 células MCF10A o MDA-MB-231 para los ensayos de migración y 6×10^4 células para los ensayos de invasión, sembradas en medio sin suero. En la parte inferior del sistema Transwell se colocó medio con suero de caballo al 5% en los ensayos con células MCF10A o FBS al 10% para las células MDA-MB-231 para crear una diferencia en la señalización quimioatrayente. En los ensayos de invasión la parte superior de la membrana Transwell se cubrió con 100 μl de Matrigel diluido a 0.5 mg/ml y se dejó gelificar durante 3h a 37 °C de acuerdo al protocolo descrito por Chichon et al. (326).

Transcurridas 24h, las membranas Transwell se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 2 minutos, seguidos de 20 minutos en metanol (Panreac). Las membranas se tiñeron con Hoechst 30 μM (ThermoFisher) durante 15 minutos para marcar los núcleos. Por cada condición se tomaron al menos 5 fotos en el microscopio de fluorescencia (Olympus IX70) que se analizaron posteriormente con ImageJ para cuantificar el número de células migradas.

1.7. Ensayos de adhesión celular

Los ensayos de adhesión celular se utilizan para evaluar la capacidad de las células de adherirse a componentes de la matriz extracelular, otras células o diferentes superficies. La capacidad de adhesión se encuentra incrementada en células tumorales y se asocia con migración y metástasis (327). Los ensayos de adhesión se realizaron en pocillos de placas de p96 tratados con 100 μl de colágeno tipo I 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich) en ácido acético 10 mM (Panreac) durante 1h a 37 °C y lavados posteriormente tres veces con PBS. Las uniones inespecíficas a la placa se bloquearon con 50 μl de BSA 1% en PBS durante 60 min seguido de 3 lavados con PBS. Sobre estos pocillos se sembraron por triplicado y en medio sin suero 4×10^4 células MDA-MB-231. Las células se

incubaron durante 1h a 37 °C y aquellas que no se adhirieron a la placa de colágeno en este tiempo fueron retiradas con 3 lavados de PBS. Las células adheridas se fijaron con 100 µl de glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 1% durante 30 min y se tiñeron con 50 µl de cristal violeta al 1% durante 30 minutos. Tras sucesivos lavados para retirar el excedente de cristal violeta, la tinción se disolvió con 100 µl de ácido acético al 10% y la absorbancia se leyó a 595 nm en el lector de placas. Como blanco se utilizaron pocillos tratados con colágeno y BSA y teñidos con cristal violeta y como control negativo de adhesión, pocillos tratados únicamente con BSA 1%.

1.8. Tratamientos farmacológicos y con TGFβ de líneas celulares

1.8.1. MG132

La implicación del proteasoma se estudió utilizando el inhibidor MG132 (Sigma-Aldrich), un péptido aldehído que bloquea la actividad proteolítica del complejo 26S del proteasoma de forma reversible (328). Las células MDA-MB-231 sembradas en placas de 6 pocillos se pre-trataron durante 2h con medio con MG132 5 µM y se transfectaron posteriormente con apMNKQ2 a 400 nM. Las células se lisaron a las 4h y 16h tras el inicio de la transfección, que se corresponde con 6h y 18h tras el inicio del tratamiento con MG132. La concentración de MG132 se mantuvo en todo momento a 5 µM, tanto en el medio de cultivo como en el de transfección.

1.8.2. Everolimus: estudio de combinación de fármacos

El estudio de efecto combinado entre everolimus y apMNKQ2 se realizó mediante el método del índice de combinación (CI) propuesto por Chou y Talalay en 1984, que se basa en la ecuación del efecto de la mediana (329,330). Para ello se utilizó el programa informático CompuSyn, desarrollado por Chou y Martin (<https://www.combosyn.com>). Este método permite calcular el índice de combinación (CI), cuyo valor indica la existencia de un efecto aditivo, sinérgico o antagonista entre fármacos (Tabla 2) a partir de los valores del efecto sobre la viabilidad de cada fármaco por separado y en combinación (329). En el diseño experimental se mantuvo un ratio de combinación no constante, que implica que uno de los fármacos se mantenga a una concentración fija (329,331).

Tabla 2. Valores del índice de combinación y tipo de interacción entre fármacos asociado. Modificado de (329)

Índice de combinación	Descripción
<0.1	Sinergia muy elevada
0.1-0.3	Sinergia elevada
0.3-0.7	Sinergia
0.7-0.85	Sinergia moderada
0.85-0.90	Ligera sinergia
0.90-1.10	Casi aditivo
1.10-1.20	Ligero antagonismo
1.20-1.45	Antagonismo moderado
1.45-3.3	Antagonismo

El modelo del CI tiene como requisito la determinación de forma simultánea de las curvas de dosis efecto para cada fármaco individualmente y en combinación. Por ello, se realizaron en paralelo curvas de viabilidad mediante ensayos MTT de apMNKQ2 y everolimus por separado, con al menos tres concentraciones diferentes, y en combinación, utilizando una concentración de everolimus fija (100 nM) (Sigma-Aldrich) y tres concentraciones de apMNKQ2 diferentes para cada línea celular, aproximadamente 0.5, 1 y 1.5 veces la IC₅₀. Las células sembradas por triplicado en una p96 se incubaron durante 72h con everolimus 100 nM, que se añadió tras retirar el medio de transfección con apMNKQ2. Transcurrido este tiempo se realizó un ensayo MTT.

Los CI se calcularon con el programa Compusyn con los valores medios de efecto sobre la viabilidad respecto al control de 4 ensayos independientes para cada concentración.

Para los ensayos de western blot se utilizaron células MDA-MB-231 y MCF7 sembradas en placas de 6 pocillos, transfectadas con apMNKQ2 a 400 nM y 150 nM, respectivamente, e incubadas con everolimus 100 nM durante 24h tras retirar el medio de transfección.

1.8.3. TGF β

Las células MCF10A se sembraron en placas de 6 pocillos para las extracciones de proteína y mRNA y en placas de 24 pocillos para los ensayos de migración e invasión en medio reducido en suero (0.5%), ya que el suero contiene cantidades significativas de TGF β que pueden inducir una EMT parcial. Las células MCF10A se sembraron como mínimo a un 70% de confluencia (4×10^5), ya que a bajas densidades se puede inducir la EMT de forma espontánea (332,333). Tras retirar el medio de transfección con apMNKQ2, las MCF10A se trataron con TGF β a 5 ng/ml (Sigma-Aldrich) (disuelto en 4 mM HCL y 0.1% albúmina) en medio con suero de caballo al 0.5% durante 24, 48 o 72h hasta la extracción de proteína o mRNA o durante 48h hasta la siembra en el soporte Transwell. El medio se remplazó cada día para mantener la concentración de TGF β . En el sistema Transwell el TGF β se añadió a los dos compartimentos en las condiciones de células tratadas.

1.8.4. GSK-650394

Como inhibidor de SGK1/2 se utilizó GSK-650394 (SGKi) (Sigma-Aldrich) disuelto en DMSO. Durante los ensayos, SGKi se añadió al medio de cultivo una vez retirado el medio de transfección y se mantuvo durante 24h, momento en el cual se realizaron los ensayos de adhesión, cierre de heridas e inmunocitoquímica. En el caso de los ensayos de herida, la concentración de SGKi se mantuvo entre la toma de fotografías.

2. Procesamiento de muestras

2.1. Extracción de proteínas

Las extracciones de proteínas se realizaron tras el tiempo de transfección determinado para cada ensayo a partir de 5×10^5 células sembradas en placas de 6 pocillos. Las células se lisaron en tampón de lisis celular (Tris 20 mM pH 7.6, KCl 120 mM, EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich), ditiotritol

1 mM (Sigma-Aldrich), molibdato de sodio 2 mM (Sigma-Aldrich), ortovanadato de sodio 0.2 mM (Sigma-Aldrich), β -glicerofosfato 2 mM (Sigma-Aldrich), clorhidrato de benzamidina 1 mM (Sigma-Aldrich), pepstatina 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich), antipaína 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich), leupeptina 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich), 1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich)) mediante raspado con asa de siembra en hielo, realizando previamente un lavado de los pocillos con el mismo tampón sin Tritón X-100. Los lisados se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el precipitado y la concentración de proteínas del sobrenadante se evaluó utilizando el kit de determinación de proteínas BCA Pierce (ThermoFisher). Finalmente, los lisados se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

La separación de las proteínas de las fracciones citosólicas y nucleares se realizó con el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoFisher), suplementando los tampones incluidos en el kit con inhibidores de proteasas (antipaína, pepstatina, leupeptina y clorhidrato de benzamidina).

Lisados de células MDA-MB-231 transfectados con apMNKQ2 a 400 nM durante 24h y lisados control transfectados solo con lipofectamina se seleccionaron para el análisis de la expresión diferencial de proteínas mediante electroforesis bidimensional 2D-DIGE y espectrometría de masas (apartado 3.10 de materiales y métodos). Las proteínas de dichos lisados se concentraron utilizando los filtros para moléculas de 10 kDa de Centricon, que se centrifugaron a 14000 g, 30' a 4 °C (Jouan BR4). El concentrado se rescató invirtiendo el filtro y centrifugando a 1000 g 2' a 4 °C.

2.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó sobre 5×10^5 células levantadas con tripsina y centrifugadas a 400 g durante 5 min. El sedimento de células se lisó y homogeneizó en 500 μ l de NucleoZOL (Cultek) un reactivo compuesto por tiocianato de guanidina y fenol que permite aislar el RNA total. De acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante, el lisado con NucleoZOL se mezcló con 200 μ l de agua libre de RNAsas y se centrifugó durante 15 min a 12.000 g para precipitar moléculas contaminantes como el DNA, polisacáridos y proteínas. El RNA del sobrenadante se precipitó posteriormente con 500 μ l de isopropanol, 10 min de incubación y 10 min de centrifugación a 12.000 g. Tras dos lavados del RNA precipitado con 500 μ l de etanol al 75%, el RNA se resuspendió en 25 μ l de agua y cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop (ThermoFisher).

3. Técnicas de análisis

3.1. Análisis de la expresión de proteínas por Western blot

El análisis de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje de acuerdo a su peso molecular en condiciones desnaturalizantes y reductoras, la transferencia de las proteínas a membranas y su posterior inmunodetección. Para ello se emplearon 20 μ g de los lisados celulares se mezclados con tampón de carga para electroforesis 1x (Tris-HCl 180 mM pH 6.8, 9% de SDS, 6% de β -mercaptoetanol (BioRad), 15% de glicerol (Sigma-Aldrich) y 0.025% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)) y Tris

20 mM pH 7.6 hasta un volumen de 21 μ l. La mezcla se desnaturizó 5 minutos a 95 °C y se resolvió mediante SDS-PAGE en un equipo Miniprotean 2 y 3 (BioRad) a 200 V y durante aproximadamente 1h junto con el patrón de peso molecular PageRuler (ThermoFisher).

Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa (GE Healthcare) dependiendo de la proteína de interés. Para ello, se realizó una transferencia húmeda con el sistema Mini Trans-Blot (BioRad) en tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol a 100 V durante 1h. Las membranas se separaron en fragmentos de diferentes rangos de tamaño y se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 1h, para posteriormente incubar las membranas con los anticuerpos primarios en PBS-Tween 0.1% (Sigma-Aldrich) a 4 °C (Tabla 3) durante 16 horas en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario indicado en función del animal de procedencia del anticuerpo primario. Se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) (GE Healthcare) o la fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) diluidos a 1:5000 en PBS-leche al 1% o PBS-BSA al 1%, respectivamente. En el caso de los anticuerpos conjugados con HRP, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit Clarity Western ECL Substrate (BioRad) o ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), mientras que en el caso de la fosfatasa alcalina se revelaron las membranas por una reacción colorimétrica utilizando el kit AP Conjugate Substrate (BioRad).

La intensidad de las bandas se visualizó con el sistema de imagen Chemidoc (BioRad) y los valores de densidad óptica para cada banda se obtuvieron con el programa Image Lab (BioRad).

Las membranas reveladas se incubaron con Re-Blot Plus Strong Solution (Millipore) 1x durante 20 minutos para eliminar los anticuerpos unidos a sus epítomos y poder reutilizar la membrana para detectar otras proteínas.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
4EBP1	Cell Signaling	9452S	1:500
4EBP1 P (Ser 65)	Cell Signaling	9456S	1:500
4EBP1 (Thr 37/46)	Cell Signaling	9459S	1:1000
β -Actina	Merck	A5441	1:5000
β -Catenina	Cell Signaling	8480	1:2000
β -Tubulina	Sigma-Aldrich	T5201	1:500
AKT	Cell Signaling	9272	1:2000
AKT P (Ser 473)	Cell Signalling	4060S	1:2000
Anexina 2	Genetex	GTX100046	1:1000
Anti-Flag M2	Sigma-Aldrich	F3165	1:5000
CCT2	Sigma-Aldrich	WH0010576M1	1:1000
CCT5	Genetex	GTX110167	1:1000
Cdk2	Cell Signalling	2546T	1:1000
Cdk2 P (Tyr15)	Abcam	ab136810	1:1000
Ciclina D1	Abcam	ab16663	1:1000
Cofilina	Cell Signalling	5175S	1:1000
Cofilina P (Ser3)	Cell Signalling	3313S	1:500
E-cadherina (24E10)	Cell Signaling	3195	1:1000
eEF2	Cell Signaling	2332S	1:1000
eEF2 P (Thr 56)	Cell Signaling	2331S	1:1000
eIF4E	Abcam	Ab76256	1:2000
eIF4E P (Ser209)	BD Biosciences	610269	1:2000
GAPDH	ThermoFisher	AM4300	1:5000
Lamina A	Abcam	Ab26300-25	1:5000
H3 P (Ser10)	Abcam	ab136810	1:1000
hnRNP A1	Santa Cruz Biotechnology	sc32301	1:2000
MCL-1 (S-19)	SantaCruzBiotechnology	sc-819	1:200
MNK1(C4C1)	Cell Signaling	Mnk1	1:2000
MNK1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-6962	1:500
MNK2	GENETEX	GTX34078	1:1000
mTOR	Cell Signaling	2972	1:1000
N-Cadherina (D4R1H)	Cell Signaling	13116	1:1000
NDRG1	Cell Signaling	D8G9	1:1000
NDRG1 P (Thr346)	Cell Signaling	5482S	1:2000
Ocludina	GENETEX	GTX114949	1:1000
p70S6K P (Thr389)	Cell Signaling	9205	1:1000
p70S6K	Cell Signaling	2708	1:1000
S6 P (Ser 235/236).	Cell Signaling	4858	1:2000
S6	Cell Signaling	2317	1:1000
Slug (C19G7)	Cell Signaling	9585	1:1000
Snail (C15D3)	Cell Signaling	3879	1:1000
SPRY2	Cell Signaling	16714954S	1:2000
Ubiquitina	Cell Signaling	3936S	1:500
Vimentina	Cell Signaling	D21H3	1:5000
XIAP	BD Biosciences	610716	1:1000
ZEB1	GENETEX	GTX114541	1:1000
Puomicina	Millipore	12D10	1:5000

3.2. Isoelectroenfoque

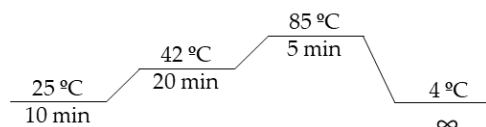
Las proteínas de los lisados tratados con apMNKQ2 se resolvieron según su punto isoelectrónico (PI) mediante un isoelectroenfoque en un gel de poliacrilamida horizontal empleando el sistema Multiphor II (GE Healthcare). Los geles se polimerizaron con urea 8.6 M (Sigma-Aldrich) y

anfolitos al 2% (pH 3-10: pH 5-7, proporción 2:1) (BioRad). Sobre los extremos del gel y separadas 10 cm se colocaron dos tiras de papel de filtro de 15.3 cm que sirven para colocar los electrodos y que están humedecidas en NaOH 20 mM (cátodo) y PO_4H_3 10 mM (ánodo). A continuación, se conectaron los electrodos y se realizó un pre-enfoque durante 30 min a 500 V. Las muestras (30 μg) y los marcadores de punto isoelectrónico (BioRad) se prepararon en urea 7 M y β -mercaptoetanol al 5% y se cargaron a 2 cm del ánodo. El isoelectroenfoque se realizó a 500 V durante 30 minutos seguidos de 2 minutos a 1000 V, 5 minutos a 1500 V y 2h a 2000 V.

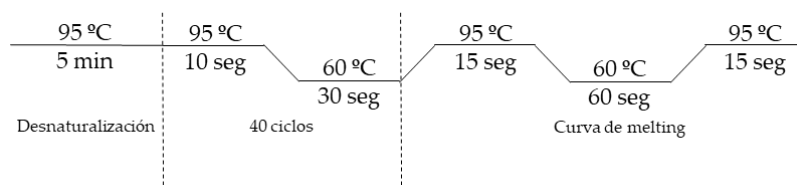
La transferencia a membrana de las proteínas se realizó en el mismo equipo mediante una transferencia semi-seca y un sistema de tampones discontinuo, utilizando papeles de filtro humedecidos en distintos tampones: 9 papeles humedecidos en solución catódica (arginina 0.1 M, SDS 0.01%) se colocaron sobre la placa del cátodo, seguidos del gel, la membrana de PVDF humedecida en solución anódica 1 (Tris 0.1 M pH 10.4), 3 papeles humedecidos en solución anódica 1 y 6 papeles humedecidos en solución anódica 2 (Tris 0.3 M pH 10.4), para finalmente colocar la placa del ánodo. La transferencia se realizó durante 2h a 0.8 mA/cm². Una vez finalizada el fragmento con los marcadores de PI se tiñeron con FastGreen (fast-green 0.1%, metanol 25%, ácido acético 10%) para determinar los sitios de corte del fragmento de membrana con muestras y los PI de las bandas. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes como se describe en el apartado 3.1.

3.3. Análisis de la expresión de mRNAs mediante qPCR

A partir del RNA total se sintetizaron las cadenas complementarias de DNA (cDNA) con el kit SensiFAST cDNA synthesis kit (Bioline) siguiendo el protocolo indicado en el kit. Los cDNAs se obtuvieron a una concentración de 50 ng/ μl con el siguiente protocolo de reacción:



Las qPCRs se realizaron por triplicado en placas ópticas de 96 pocillos en el termociclador StepOnePlus (Applied biosystems) utilizando el kit AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme Biotech). En cada pocillo de reacción se añadieron 5 μl de AceQqPCR SYBR Green Master Mix, 0,2 μl de cada cebador a 10 μM , 0,2 μl de ROX reference Dye 1 (50x) y 1 μl de cDNA (50 ng/ μl), completando con agua hasta 10 μl . Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se recogen en la Tabla 4. El programa de reacción utilizado fue el siguiente:



La cuantificación se realizó con el StepOne™ Software v2.3 (Applied biosystems) a partir de los valores de ciclo umbral (Ct) asignados por el sistema. Los Ct representan el número de ciclo para

una determinada línea base, en la cual el incremento de fluorescencia, y con ello, la amplificación del DNA, es exponencial. Los valores de Ct obtenidos para cada gen (Ct gen) se normalizaron frente al Ct obtenido para un gen de referencia (Ct referencia) utilizando la siguiente fórmula:

$$Ratio = 2^{-(Ct_{gen}-Ct_{referencia})}$$

Como genes de referencia se utilizaron la β -actina y GAPDH.

Tabla 4. Primers utilizados en los ensayos de qPCR.

Gen	Primer 5'	Primer 3'
β -actina	TGGACTTCGAGCAAGAGATG	GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG
MNK1a	AGCATCCAGGAAGGCAAGTA	GTCCCTTTTCTGGAGCTTGC
MNK1b	AGCATCCAGGAAGGCAAGTA	CTGCTGTTCCCTGCACCC
Slug	CATGCCTGTCATACCACAAC	GGTGTGAGATGGAGGAGGG
Snail	GAGGCGGTGGCAGACTAG	GACACATCGGTGAGACCAG
ZEB1	TGCACTGAGTGTGAAAAGC	TGGTGATGCTGAAAGAGACG
SGK1	GACAGGACTGTGGACTGGTG	TTTCAGCTGTGTTTCGGCTA
MCL1	AAAGCCTGTCTGCCAAAT	CCTATAAACCCACCACTC
XIAP	GGGGTTTCAGTTTCAAGGACA	CGCCTTAGCTGCTCTTCAGT
E-cadherina	ACACCAACGATAATCCTCCGA	CATCAGCATCAGTCACTTTCAG
MNK2a	TCCGTGACGCCAAGCAG	GGTCTTTGGCACAGCTG
MNK2b	TCCGTGACGCCAAGCAG	GAGGAAGTGACTGTCCAC

3.4. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de MCL1 se llevó a cabo con dos anticuerpos diferentes: MCL1 (S-19) de Santa cruz Biotechnology y MCL1 (D2W9E) de CST, ambos a una concentración de 1:100. Como inhibidor de las deubiquitininas se incluyó N-etilmaleimida (Sigma-Aldrich) 5 mM en el tampón de lisis utilizado para la extracción de proteínas y para los lavados de la resina unida al complejo inmunoprecipitado. La inmunoprecipitación se realizó con 250 μ g de lisado de células MDA-MB-231 tratadas con MG132 5 μ M durante 8h en 250 μ l de tampón de lisis. El lisado con el anticuerpo se incubó durante 2h en una noria a 4 °C.

La inmunoprecipitación del complejo mTOR-MNK1 se llevó a cabo con el anticuerpo frente a mTOR de CST (1:100). Los lisados y los lavados de la resina se realizaron con tampón de lisis con el detergente CHAPS (HEPES (pH 7.5), NaCl 120mM, glicerofosfato 10mM, 0.3% CHAPs (Sigma-Aldrich), $MgCl_2$ 15mM, DTT 1mM, ortovanadato 1.5 mM, molibdato 2 mM, cocktail inhibidores de proteasas cOmplete Mini (Roche)) de acuerdo al protocolo publicado por Brown y Gromeier (164). En este caso, la inmunoprecipitación se realizó con 250 μ g de lisado durante 16h en una noria a 4 °C.

Para ambos ensayos, el complejo inmunoprecipitado se aisló utilizando 30 μ l de resina Protein G Agarose Resin 4 Rapid Run (ABT) al 50% previamente equilibrada en tampón de lisis y se incubó durante 1h a 4 °C en rotación en una noria. Posteriormente se realizaron tres lavados con 500 μ l de tampón de lisis centrifugando a 2300 g durante 5 minutos. Para disociar los complejos unidos a la resina se añadieron 15 μ l de tampón de carga de electroforesis sobre la resina y se incubaron 5 minutos a 95 °C. Los complejos eluidos se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y western blot

con anticuerpos frente a MCL1 y ubiquitina, en el caso de las inmunoprecipitaciones de MCL1, o anticuerpos frente a MNK1a/b y mTOR, en el caso de la inmunoprecipitación de mTOR.

La inmunoprecipitación del complejo mTOR-MNK1 también se realizó utilizando la resina anti-Flag de Sigma-Aldrich en aquellos lisados en los cuales se sobreexpresó MNK1a/b. En este caso, 30 μ l de resina equilibrada al 50% y previamente pre-adsorbida con citocromo C (10 mg/ml). se añadieron directamente sobre 250 μ g de lisado y se incubaron durante 2h a 4 °C en una noria. Posteriormente se procedió con los lavados del mismo modo que para la resina Protein G.

3.5. Cromatografía de afinidad con m⁷GTP-sefarosa

La purificación del complejo eIF4E/4EBP1 se realizó con la resina m⁷GTP sefarosa (Abyntek) en células MDA-MB-231 y MCF7 transfectadas con apMNKQ2 (150 nM y 400 nM respectivamente) y tratadas con everolimus (100 nM) durante 24h. En un volumen total de 200 μ l de TLC sin Tritón X-100 y con 100 μ M GTP se mezclaron 200 μ g de lisado de células y 30 μ l de resina al 50% previamente equilibrada y se incubaron durante 1h a 4 °C en rotación en una noria. Posteriormente se realizaron tres lavados con 300 μ l de TLC-GTP centrifugando a 2300 g durante 5 minutos. Para disociar los complejos eIF4E/4EBP1 de la resina se añadieron 15 μ l de tampón de carga de electroforesis sobre la resina y se incubaron 5 minutos a 95 °C. Los complejos eluidos se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% y western blot con anticuerpos específicos de eIF4E y 4EBP1.

3.6. Zimogramas

La técnica del zimograma se basa en la cuantificación de la actividad proteasa en geles de poliacrilamida polimerizados con gelatina, la cual es degradada por las MMPs separadas de acuerdo a su peso molecular en una SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La tinción con azul de Coomassie permite marcar con colorante la gelatina del gel, por lo que los sitios donde haya habido proteólisis de la gelatina se muestran como bandas blancas sobre un fondo azul (334).

La actividad de la MMP2 y MMP9 se determinó en el medio de incubación de las células MCF10A tratadas con apMNKQ2 y TGF β . El medio de incubación se centrifugó a 210 g para el eliminar posibles restos celulares. En un gel de poliacrilamida al 7.5% polimerizado con 1 mg/ml de gelatina se cargaron 25 μ l de medio mezclado con tampón de carga sin β -mercaptoetanol que se resolvió durante 1h a 200V. Los geles se incubaron durante 30 minutos en Tritón X-100 al 2.5% a temperatura ambiente en agitación y seguidamente durante 16 horas en tampón de revelado (Tris 0.5 M pH 7.6, NaCl 2 M, CaCl₂ 0.05 M, Tween 0.2%) a 37 °C. Posteriormente el gel se tiñó con solución de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y se destiñó en una solución de ácido acético al 7% y etanol al 20% hasta que la actividad de las MMPs se mostró como bandas claras que se cuantificaron con el programa ImageLab.

3.7. Inmunocitoquímica

Sobre cristales de 12 mm de diámetro (Marienfeld Superior) previamente tratados con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) a 0.05 mg/ml, se sembraron 5x10⁴ células. Una vez transfectadas e

incubadas con apMNKQ2, se fijaron durante 10 min con PFA al 4% seguido de una permeabilización con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos. Las uniones inespecíficas se bloquearon incubando los cristales con PBS-FBS al 10% durante 1h. A continuación, se incubaron los cristales con los anticuerpos primarios frente a vimentina (1:150) y β -tubulina (1:500) diluidos en PBS-FBS al 10% durante 16h a 4 °C. Tras sucesivos lavados con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados Alexa 488-anti-IgG de ratón (1:300) (ThermoFisher) y Alexa 568-anti-IgG de conejo (1:200) (ThermoFisher) en PBS-FBS al 10% durante 1h a temperatura ambiente. En el caso del marcaje de F-actina, una vez fijadas y permeabilizadas las células, los cristales se incubaron durante 45 minutos con faloidina 1:1000 (Abcam) en PBS-BSA al 1%. En ambos casos se realizaron lavados con PBS y se procedió a montar los cristales sobre portaobjetos con medio de montaje Prolong (ThermoFisher) con Hoechst a 30 μ M para teñir los núcleos. Transcurridas 24 h se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia a 20 aumentos.

3.8. Actividad fosfoglicerato mutasa (PGAM) en lisados celulares

La actividad de la PGAM se determinó mediante el acoplamiento de la formación de 3-fosfoglicerato con las reacciones catalizadas por la enolasa, la piruvato quinasa y la lactato deshidrogenasa (Figura 6) (335,336). La conversión de NADH a NAD⁺ por la lactato deshidrogenasa permite medir la actividad catalítica como una reducción de la absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo, ya que solo el NADH absorbe luz a esta longitud de onda. Por tanto, la actividad se representa como el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo y se calcula como la pendiente en la parte lineal de la curva de actividad (337).

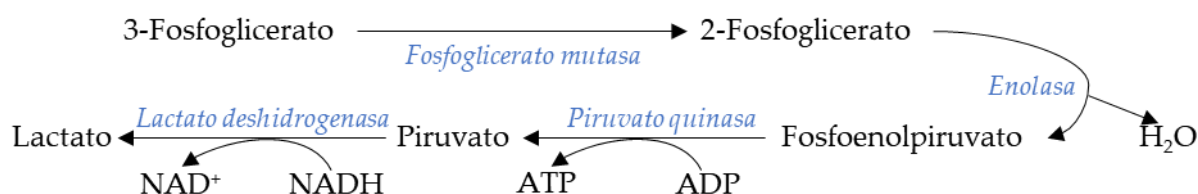


Figura 6. Acoplamiento de reacciones enzimáticas para determinar la actividad PGAM.

Los lisados de células transfectadas con y sin aptámero se prepararon a las 24h con el tampón descrito en el apartado 2.1 con y sin ortovanadato. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en los que se añadieron 100 μ l de mezcla de reacción (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 4mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0.4 mM NADH, 3 mM ADP, 20 μ M 2,3-bifosfoglicerato, 1.2 U/ml lactato deshidrogenas, 1 U/ml piruvato quinasa, 0.6 U/ml enolasa (Sigma-Aldrich) y 20 μ g de lisado en un volumen total de 50 μ l de 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, que se incubaron durante 15 min a 37 °C. Finalmente se añadieron 50 μ l del sustrato 3-fosfoglicerato en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 para iniciar la reacción. La absorbancia se midió a 340 nm a temperatura ambiente cada 15 segundos durante 20-30 minutos en el lector de placas. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se incluyeron controles positivos, en los que se incubó la mezcla de reacción con distintas unidades de PGAM1 recombinante (ThermoFisher) y 3 μ l de tampón de lisis con o sin ortovanadato, y controles negativos sin lisado celular.

3.9. Valoración de la síntesis global de proteínas

La valoración de la síntesis global de proteínas se llevó a cabo por el método SUnSET (*Surface sensing of traslation*) que se basa en la incorporación de puromicina, un antibiótico análogo al tRNA, a las cadenas polipeptídicas que se están sintetizando y su posterior cuantificación mediante inmunodetección con un anticuerpo específico frente a puromicina. Por tanto, la incorporación de puromicina a las proteínas sintetizadas de *ново* refleja directamente el ratio de traducción global de mRNAs (338). A los tiempos correspondientes tras la transfección con apMNKQ2 se incubaron las células con puromicina (Sigma-Aldrich) a 2 μ M durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se realizó un lavado con medio y se incubaron las células con medio fresco durante 1h a 37 °C antes de proceder con la lisis celular. Como control positivo de la inhibición de la síntesis de proteínas se introdujeron lisados tratados con cicloheximida (Sigma-Aldrich) a 1 μ g/ml durante 5 minutos antes de añadir la puromicina.

3.10. Análisis de la expresión diferencial de proteínas por técnicas proteómicas

El análisis de la expresión diferencial de proteínas de células tratadas con apMNKQ2 mediante electroforesis bidimensional 2D-DIGE y la posterior identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) fue realizada en colaboración con la unidad de proteómica del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS).

3.10.1. Electroforesis bidimensional 2D-DIGE

La electroforesis diferencial en dos dimensiones (2D-DIGE) es una forma modificada de la electroforesis bidimensional que permite comparar dos o tres muestras de proteínas simultáneamente en el mismo gel y separarlas en función de su punto isoelectrico y su peso molecular. Para ello, las proteínas de cada muestra se marcan covalentemente con fluorocromos que emiten a distinta longitud de onda, de manera que en cada *spot* de proteínas que aparece en el gel, el ratio de fluorescencia de los fluoróforos es constante para proteínas con la misma expresión en las muestras, mientras que proteínas que difieran en su expresión presentarán mayor emisión de fluorescencia de un fluoróforo respecto al otro (339).

El análisis diferencial de la expresión de proteínas entre lisados concentrados de células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 durante 24h o con lipofectamina (control) se realizó utilizando los fluoróforos Cy3, Cy5 y Cy2 (CyDye DIGE Fluors (minimal dyes, Cytiva) y la técnica de marcaje “mínimo” de lisinas. Los tres Cys poseen una masa molecular y estructura similar y se unen covalentemente a las proteínas a través de la reacción de su grupo éster N-hidroxisuccinimida con el grupo amino de los residuos de lisina. En la reacción de marcaje “mínimo” el ratio fluoróforo:proteína es bajo, de manera que menos del 5% de cada tipo de proteína queda marcado (340).

La reacción de marcaje se llevó a cabo en un volumen final de 12 μ l con 1000 pmol de Cy y 100 μ g de muestra en urea 7 M y tiourea 2 M durante 30 minutos en oscuridad a 4 °C. Para detener la reacción se añadió lisina 10 mM y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a 4 °C. Las muestras se congelaron a -80 °C y posteriormente se realizó su análisis mediante 2D-DIGE.

Los fluoróforos Cy3 y Cy5 se utilizaron alternativamente para marcar las muestras control y apMNKQ2 de cuatro replicados, de tal manera que de los cuatros geles 2D-DIGE realizados, dos incluyeron muestras control marcadas con Cy3 y muestras apMNKQ2 marcadas con Cy5 y los otros dos, muestras control marcadas con Cy5 y muestras apMNKQ2 marcadas con Cy3. De esta forma se compensan las diferencias en el marcaje de proteínas con ambos fluoróforos, ya que se ha demostrado que algunas proteínas se marcan preferencialmente con uno de los fluoróforos respecto al otro (340). En cada uno de los geles se incluyó, además, una mezcla de las 8 muestras marcadas con Cy2 como estándar interno, lo que permite normalizar las señales de fluorescencia frente a la señal Cy2 y así, aumentar la reproducibilidad entre geles (341).

Las muestras marcadas con Cys se resolvieron en una electroforesis bidimensional. En la primera dimensión las proteínas se separaron de acuerdo a su punto isoelectrico a lo largo de un gradiente de pH utilizando una tira de gradiente de pH inmovilizado de 11 cm de largo y un rango de pH de 3-10 (BioRad). Las tiras se rehidrataron durante 16h con 200 µl de tampón de rehidratación (urea 8 M, CHAPS 2%, solución de hidratación DeStreak 97mM, anfólitos 0.5% (pH 3-10) (Bio-Lyte 3/10 Ampholyte) y azul de bromofenol 0.001%).

El isoelectroenfoque horizontal se realizó en el equipo Ettan IPGphor3, colocando la tira en la bandeja del equipo con dos papeles humedecidos en agua sobre cada extremo de la tira. Se mezclaron 100 µg de muestra control con 100 µg de muestra apMNKQ2 y con 100 µg del control interno en β-mercaptoetanol al 0.5% y se cargaron en el polo positivo mediante un sistema de copas. Finalmente, se colocaron los electrodos en los extremos de la tira en contacto con los papeles y se desarrolló el protocolo de isoelectroenfoque a 20 °C con un incremento gradual de voltaje de hasta 6000V y una intensidad máxima de 50 µA, alcanzando un voltaje acumulativo de 10500 Vh en aproximadamente 5-6h.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque, la tira del gel se incubó durante 15 minutos en tampón de equilibrado (Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol 30%, SDS 2%, urea 6 M, azul de bromofenol 0.004%). A continuación, se realizó la separación de proteínas en la segunda dimensión de acuerdo a su peso molecular en un gel SDS-PAGE al 12%. Para ello, la tira de isoelectroenfoque se colocó sobre el gel concentrador y se desarrolló la electroforesis a 200 V durante 1h, de manera que las proteínas migraron desde la tira de gradiente hacia el gel de acrilamida.

La señal de fluorescencia de los geles se captó en el sistema de detección ChemiDoc (BioRad), adquiriendo imágenes con láser de excitación de 488 nm para visualizar Cy2, 532 nm para Cy3 y 633 nm para Cy5. Las imágenes se capturaron a una resolución de 100 mm/pixel y se realizó el análisis de variación biológica (BVA) de los *spots* fluorescentes utilizando el software PDQuest 2-D (BioRad). El BVA se basa en un análisis cuantitativo de la señal diferencial de fluorescencia basada en la relación entre las señales normalizadas Cy5/Cy2 y Cy3/Cy2 de cada *spot*. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico mediante el test de la t de Student para determinar si existen diferencias entre los niveles de expresión de las proteínas en las condiciones experimentales estudiadas. Los *spots* seleccionados para la identificación de proteínas fueron aquellos con unos valores de $p < 0.1$ y/o unos niveles de expresión alterados superiores a 1.5 veces el control.

Tras la captura de las imágenes, los geles se tiñeron con solución Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) durante 1.5 h en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se destiñó realizando sucesivos lavados en una solución de ácido acético al 5% y etanol al 20% hasta observar un gel con múltiples *spots* definidos, cada uno correspondiente a una proteína. Los geles se conservaron en etanol al 10% hasta que se procedió a la extracción de los *spots*.

3.10.2. Digestión de proteínas

La identificación de proteínas se llevó a cabo mediante el análisis de la huella peptídica, basado en la hidrólisis de las proteínas desconocidas por acción de proteasas en pequeños péptidos cuyas masas pueden determinarse mediante espectrometría de masas y compararse, posteriormente, con una base de datos de las masas teóricas de los péptidos que genera cada proteína conocida (342). Para ello, se realizó una digestión con tripsina de las proteínas contenidas en cada *spot* de acuerdo al método descrito por Shevchenko et al. (343).

Los *spots* seleccionados para la identificación de las proteínas en la 2D-DIGE se extrajeron del gel con la punta cortada de una pipeta de 1 ml y se depositaron en tubos eppendorf. Los trozos de gel se trataron con DTT 10 mM en bicarbonato amónico (BA) 50 mM durante 30 minutos a 56 °C para reducir las cisteínas de las proteínas. Tras realizar un lavado con BA 50 mM durante 5 min, los *spots* se trataron con iodoacetamida 55 mM en BA 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad para carbamidometilar las cisteínas y se lavaron dos veces con BA 50 mM y BA 25 mM. Los *spots* se deshidrataron y destiñeron con una mezcla de BA 25 mM y acetonitrilo al 50% (v/v) incubada durante 20 minutos y con otra incubación con acetonitrilo al 100% durante 10 minutos. Los *spots* se secaron al vacío en la centrífuga Speed-vac y se procedió a la digestión con 30 ng de tripsina (Promega) en BA 25 mM, incubando las muestras durante 45 minutos a 4 °C. A continuación, se retiró el volumen de exceso de la solución de tripsina, se añadió BA 25 mM y se incubó a 30 °C durante toda la noche. Para la extracción de los péptidos digeridos se añadió acetonitrilo al 15 % (v/v) y se incubó 15 minutos a 37 °C. Por último, se añadió ácido trifluoroacético a una concentración final de 0.1% (v/v) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido, que contiene los péptidos eluidos, se traspasó a un nuevo eppendorf para proceder con el análisis de por espectrometría de masas.

3.10.3. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La espectrometría de masas se basa en la ionización de un compuesto en moléculas cargadas y la posterior determinación de su ratio masa/carga (m/z). En la espectrometría de masas por desorción por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), las muestras se cristalizan con una matriz que se irradia con un láser de luz UV, lo que permite la desorción e ionización de los péptidos tras la adición de un protón. Los iones cargados positivamente son acelerados con un alto voltaje y se separan unos de otros en un tubo de vuelo al vacío, llegando a un detector con distintos tiempos de vuelo en función de su ratio m/z . En base a la información del tiempo de vuelo se genera un espectro característico en el que se representa la abundancia relativa de los péptidos respecto a su ratio m/z (344).

Para la identificación de las proteínas contenidas en los *spots* se mezcló 1 μ l del digerido triptico con 1 μ l de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, utilizado como matriz, en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 0.1%. Se depositó 1 μ l de la mezcla anterior en la placa comercial AnchorChip standard (800 μ m, PAC 384) (Bruker) y se dejó cristalizar al aire en cabina. La muestra de la placa se lavó con una gota de fosfato monoamónico 10 mM y ácido trifluoroacético 0.1% y de nuevo se dejó secar a temperatura ambiente.

Los datos de espectrometría de masas se obtuvieron en el espectrómetro Autoflex III Smartbeam (Bruker) equilibrado internamente utilizando como referencia señales de masa de una muestra que contiene una mezcla peptídica con rango de masas entre 700 y 3500 Da (Bruker) para garantizar un error menor de ± 3 ppm en la medida de las masas peptídicas.

El espectro de huella peptídica obtenido, en el cual se incluyen las masas moleculares de todos los fragmentos tripsinizados detectados y su abundancia relativa, se transfirió con el programa MS Biotoools a la base de datos SwissProt y se utilizó el programa de búsqueda Mascot (Matrix Science). Las búsquedas en la base de datos se restringieron a la clase mamífero, permitiendo hasta 1 salto en la secuencia de corte por tripsina, una diferencia en la masa de ± 50 -100 ppm, modificaciones por carboamidometilación y como potencial modificación, metioninas oxidadas. Las identificaciones de proteínas con un *score* superior a 50 se consideraron significativas.

La identificación de cada proteína se confirmó mediante el análisis de fragmentación por espectrometría de masas en tándem MS/MS MALDI-TOF/TOF, que consiste en el acoplamiento de dos espectrómetros de masas (345). Uno de los péptidos obtenidos con mayor abundancia en una primera identificación por MS MALDI-TOF se selecciona y fragmenta en otros péptidos que son analizados en un segundo espectrómetro de masas para dar lugar a un nuevo espectro de masas que se cotejó igualmente en las bases de datos.

3.11. Análisis del perfil de ribosomas (Riboseq)

El análisis del conjunto de proteínas traducidas en presencia de apMNKQ2 (translatoma) se analizó mediante un perfil de ribosomas, basado en la secuenciación masiva de los fragmentos de mRNA unidos a los ribosomas. Esta técnica de secuenciación también se denomina riboseq, por analogía con secuenciación del RNA total (RNAseq). De forma general, el perfil de ribosomas consiste en la digestión del RNA total de un lisado celular con RNAsas a excepción de aquellos fragmentos de mRNA que están unidos a ribosomas (RPFs) y, por tanto, protegidos de la digestión. Posteriormente, los RPFs se concentran y son seleccionados de acuerdo a su tamaño para elaborar una librería de DNA y ser secuenciados (346,347).

3.11.1. Extracción de fragmentos de RNA protegidos por ribosomas

La secuenciación del conjunto de RPFs proporciona información cuantitativa acerca de la tasa de traducción de cada proteína. La estimación de la traducción de una proteína se basa en la densidad de lecturas que se produzcan de un determinado transcrito, de tal manera que un mRNA con una baja tasa de traducción tendrá menos ribosomas unidos, es decir, un menor número de RPFs y por ello, un menor número de lecturas en la secuenciación que coincidan con el transcrito de ese

gen, teniendo en cuenta que el número de veces que una secuencia es leída en los experimentos de secuenciación se relaciona cuantitativamente con su abundancia en la librería (348).

El número de RPFs viene determinado también por la abundancia de cada mRNA y de forma general, aquellos mRNAs más abundantes tienden a producir más RPFs (346). Para diferenciar cambios producidos sobre la tasa de traducción y sobre los niveles de mRNA, que podrían verse modificados por efecto de apMNKQ2, se realizó en paralelo un análisis del mRNA total mediante RNAseq para las mismas condiciones experimentales (apartado 3.11). La comparación de los resultados de ambos ensayos permite obtener la eficiencia de traducción para cada proteína. Los ensayos se realizaron en células MDA-MB-231 transfectadas solo con lipofectamina (control) o con apMNKQ2 (400 nM) y lisadas a dos tiempos: 4h, para observar cambios directos sobre la traducción que precedan a una alteración en la síntesis *de novo* de proteínas o a mecanismos compensatorios que se pudieran producir, y un tiempo posterior de 8h, para ver la evolución de los cambios. Se realizaron tres réplicas para cada tiempo.

El perfil de ribosomas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Ingolia et al (347) con algunas modificaciones (Figura 7). De forma resumida, 3.5×10^6 células MDA-MB-231 sembradas en una p10 y transfectadas con apMNKQ2 400 nM durante 4 u 8h se lisaron en la placa con 400 μ l de tampón con cicloheximida para mantener los ribosomas unidos al mRNA inmovilizados (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 μ g /ml cicloheximida, 1% Tritón X-100, 25 U/ml DNAsa I (Thermo Fisher)). Después de centrifugar el lisado a 20.000 g durante 10 min a 4 °C una alícuota de 300 μ l se digirió con 7.5 μ l de RNAsa I (100 U/ μ l) durante 45 min a temperatura ambiente y en agitación. La reacción se detuvo con la adición de 10 μ l del inhibidor de RNAsas SUPERase-In (20 U/ μ l). Los ribosomas unidos a los RPFs se concentraron mediante ultracentrifugación sobre un “colchón” de sacarosa 1 M en tubos de policarbonato de 16 mm x 76 mm. La ultracentrifugación se realizó en el rotor 70.1 Ti (Beckman) y en la ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman) a 265000 g durante 2h a 4 °C. El precipitado de ribosomas se resuspendió en 700 μ l de reactivo Quiazol (Quiagen) y se procedió a la extracción del RNA utilizando el kit miRNeasy (Quiagen) siguiendo a las instrucciones de la casa comercial para purificar RNA total y RNAs pequeños. El RNA eluido en 50 μ l de agua libre de RNAsas se precipitó añadiendo 1.5 μ l del coprecipitante GlycoBlue (ThermoFisher), 10 μ l de acetato sódico 3 M (pH 5.5), 38.5 μ l de agua y 150 μ l de isopropanol (Sigma-Aldrich). La precipitación se realizó durante 16 h a -80 °C. Transcurrido este tiempo, el RNA se centrifugó durante 30 min a 20000 g a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 5 μ l de Tris 10 mM (pH 8).

El RNA aislado se separó de acuerdo a su tamaño en una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% TBE (ThermoFisher) y urea 3 M durante 1 h a 200 V. Como tampón de carga se utilizó una mezcla de formamida al 98% (vol/vol), 10 mM EDTA y 300 μ g/ml de azul de bromofenol. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó durante 20 min con 20 μ l de SYBR Green (1000x) (ThermoFisher) en 50 ml de agua en agitación. El gel se visualizó en el transiluminador de luz azul Fas-Digi Pro (Nippon Genetics) y se escindieron los fragmentos del gel que contenían RNA de entre 26 y 34 nt (longitud habitual de los RPFs), utilizando como marcadores dos oligonucleótidos de RNA de dicho tamaño (Biomers). El RNA se extrajo del gel durante 16 h en 400 μ l de tampón de extracción (300 mM acetato de sodio pH 5.5, 1 mM EDTA,

0.25% SDS) a temperatura ambiente y agitación y se precipitó añadiendo 1.5 µl de GlycoBlue y 500 µl de isopropanol. La precipitación se realizó durante 16 h a -80 °C para posteriormente centrifugar el RNA durante 30 min a 20000 g a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 5 µl de Tris 10 mM (pH 8) y se conservaron a -80 °C hasta obtener las tres réplicas del ensayo.

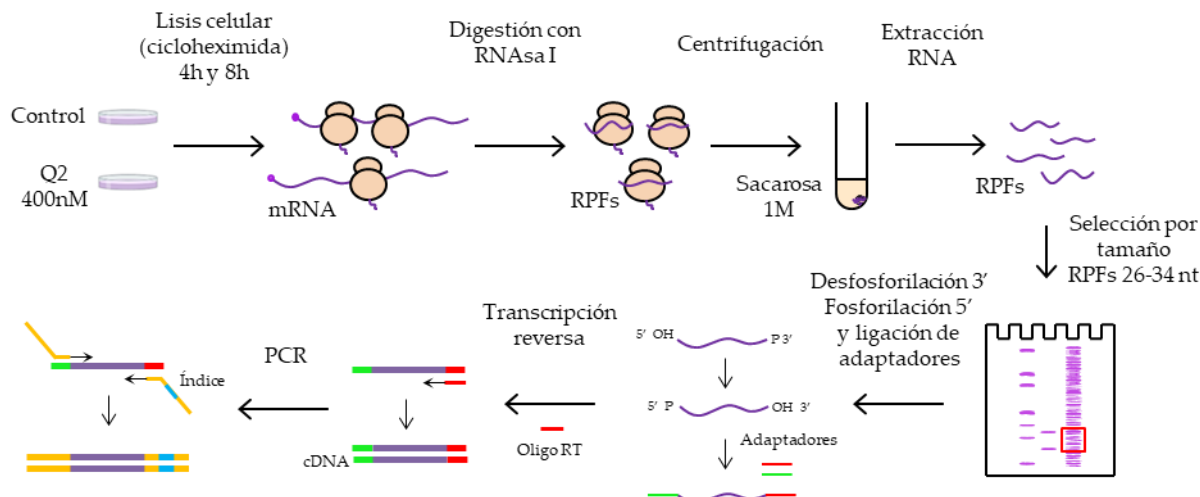


Figura 7. Representación esquemática de la extracción de RPFs y la generación de librerías.

3.11.2. Generación de librerías y secuenciación

La preparación de las librerías y su secuenciación se llevó a cabo en la Unidad Central de Apoyo de Genómica Traslacional (UCA-GT) del IRYCIS. Las librerías de DNA se prepararon utilizando el kit TruSeq Small RNA Library Prep (Illumina). Este protocolo permite ligar adaptadores en los extremos de cada molécula de RNA y obtener una librería de DNA complementario mediante transcripción reversa. El kit TruSeq de Illumina utilizado se basa en la ligación de adaptadores sobre RNAs que presentan extremos 5' P y 3' OH con una T4 RNA ligasa, ya que originalmente está diseñado para la generación de librerías a partir de microRNAs, que presentan esta característica en sus extremos 5' y 3' (349). Sin embargo, la RNasa I utilizada para digerir el RNA total degrada los RNA dejando extremos 5' OH y 3' P, por lo que antes de utilizar el kit los RPFs se desfosforilaron en su extremo 3' y se fosforilaron en su extremo 5' utilizando la T4 PNK, que presenta actividad 5' quinasa y 3' fosfatasa.

En primer lugar, se procedió con la desfosforilación del extremo 3'. Para ello, el RNA se desnaturalizó durante 90 segundos a 80 °C en un volumen final de 43 µl de agua. Posteriormente, el RNA se incubó 1h a 37 °C con 10 U de T4 PNK (New England BioLabs), tampón T4 PNK (1x) y 20 U de SUPERase-In. La enzima se inactivó incubando la mezcla 20 min a 65 °C. El RNA se precipitó con GlycoBlue, acetato de sodio e isopropanol como se ha descrito previamente. A continuación, se procedió con la fosforilación del extremo 5' utilizando el mismo protocolo que para la desfosforilación, pero incluyendo en la reacción 5 µl de ATP (10 mM). De nuevo, el RNA se precipitó y se resuspendió en 10 µl de Tris 10 mM pH 8.5 para proceder con la preparación de las librerías siguiendo el protocolo del kit TruSeq Small RNA Library Prep. Previamente se analizó la integridad del RNA en el Bioanalyzer Agilent 2100 con el chip Agilent Small RNA reagents y se cuantificó en el fluorímetro Qubit con kit de ensayo para RNA. Se utilizaron 50 ng de RNA

para elaborar las librerías. De forma resumida, la generación de la librería consiste en la ligación de un adaptador en el extremo 5' y otro en el 3', que servirá de molde para el *primer* de la transcripción reversa. A continuación, las cadenas de DNA complementario se amplifican por PCR. Los *primers* utilizados en la PCR introducen en cada fragmento una serie de secuencias que permitirán llevar a cabo la secuenciación posterior y un índice de 6 nucleótidos diferente para cada muestra para identificar la procedencia de cada lectura en la secuenciación. Finalmente, la librería se purificó utilizando las esferas magnéticas Ampure XP beads (Beckman). El análisis de calidad y distribución de tamaños de la librería se realizó en el analizador Agilent TapeStation 4150 con el ensayo High Sensitivity D1000 DNA ScreenTape y su concentración se cuantificó en el fluorímetro Qubit con el kit de ensayos para dsDNA. Las librerías se mezclaron de forma equimolar y se secuenciaron en el equipo MiSeq de Illumina y el kit de reactivos MiSeq Reagent Kit v2.

3.12. Análisis de la expresión diferencial de mRNAs (RNAseq)

El RNAseq es una técnica basada en la secuenciación masiva que permite el estudio del transcriptoma y la cuantificación de la expresión diferencial de genes entre condiciones experimentales. De forma general, se basa en la extracción del RNA, su conversión en DNA complementario y la preparación de librerías y posterior secuenciación (350). Al igual que en la secuenciación de los RPFs, el resultado del RNAseq son un conjunto de lecturas que se corresponden con cada fragmento de RNA presente en la librería, de manera que el número de lecturas asignadas a cada gen dependerá de la abundancia de su mRNA.

El análisis de la expresión de mRNAs se realizó en paralelo a las extracciones de los RPFs, en células MDA-MB-231 sembradas a la misma densidad y transfectadas simultáneamente con apMNKQ2 a 400 nM. La extracción del RNA total se realizó a las 4 y 8h con el kit Total RNA purification (NORGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. El análisis de la calidad y cuantificación del RNA extraído se realizó en el sistema Agilent TapeStation 4150 con el kit RNA ScreenTape Sample Buffer y RNA ScreenTape, obteniendo valores del parámetro de integridad RIN (RNA integrity number) superiores a 8.5 en todas las muestras. En este caso, la librería se realizó con 500 ng de RNA total utilizando el Stranded mRNA Prep, Ligation Kit (Illumina) que se basa en el aislamiento del mRNA total mediante la purificación de moléculas de RNA con una cola poliA. Posteriormente, el mRNA se fragmenta aleatoriamente y se genera la cadena de DNA complementario por transcripción reversa con *primers* aleatorios. A continuación, se sintetiza la hebra complementaria a ésta, se ligan adaptadores a ambos extremos de las hebras y se amplifican las secuencias por PCR, incluyendo *primers* que introduzcan en cada fragmento los índices para identificar las muestras y regiones para proceder con su secuenciación. La concentración de las librerías se determinó con el fluorímetro Qubit con el kit de ensayos para dsDNA y el análisis de calidad y tamaño se realizó en el analizador Agilent TapeStation 4150 con el kit High Sensitivity D1000 DNA ScreenTape. Con el objetivo de obtener un elevado número de lecturas (en torno a 40 millones por muestra), la secuenciación se llevó a cabo en el equipo Novaseq 6000 por la empresa IMAGEN a partir de la mezcla equimolar de las librerías.

3.13. Análisis de datos

3.13.1. Procesamiento de datos de RNAseq/riboseq

El análisis de datos de RNAseq/Riboseq se basa, de forma general, en el procesamiento de archivos en formato FASTQ, que contienen las lecturas obtenidas tras la secuenciación, el alineamiento de las lecturas con un genoma de referencia, la cuantificación de la expresión de cada gen en base al número de lecturas alineadas por cada transcrito y el análisis de la expresión diferencial génica entre las condiciones experimentales. El análisis primario de los datos se llevó a cabo con la colaboración de la Unidad de Bioinformática del IRYCIS.

El análisis de la calidad, el filtrado, el alineamiento con el transcriptoma humano y la cuantificación de lecturas de cada transcrito se realizó con *nf-core/rnaseq*, un *pipeline* que incorpora diversas herramientas de análisis y que está desarrollada en el entorno NextFlow con el objetivo de estandarizar el análisis primario de las lecturas de RNAseq (351). Este *pipeline* incluye herramientas para eliminar el RNA ribosómico (rRNA) (SortMeRNA), las secuencias de baja calidad y pequeño tamaño, las secuencias de los adaptadores introducidos en la generación de la librería (TrimGalore) y contaminaciones genómicas (BBSplit) o para la identificación de índices añadidos a los fragmentos de cDNAs durante la generación de las librerías (UMI-tools), entre otras. En el caso del alineamiento y la cuantificación se seleccionaron las herramientas STAR y Salmon, respectivamente.

El resultado final del *pipeline* es una matriz de expresión de genes que estructura los genes en filas y las muestras en columnas e incluye la cuantificación del número de lecturas que se alinean de forma única con cada gen en cada una de las muestras. A partir de esta matriz se realizó el análisis de la expresión diferencial de cada transcrito entre las muestras control y apMNKQ2 utilizando el paquete DESeq2 en la plataforma R (352).

Antes de proceder con el análisis de la expresión diferencial se realizó un estudio de la distribución de las réplicas experimentales y una normalización de las muestras. La homogeneidad de las réplicas y grupos experimentales se evaluó mediante un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), realizado con el paquete mixOmics en R (353). Este análisis permitió visualizar en un diagrama de dispersión la distribución de las réplicas de las muestras reduciendo la variabilidad en la expresión de genes a dos componentes que recogen la mayoría de las diferencias entre los datos y que se representan en los ejes X e Y. Mediante un test PERMANOVA se comprobó que la homogeneidad de los grupos era significativa.

La normalización se realizó con DESeq2 y se basa en la división de los conteos de cada gen en una muestra entre el número total de lecturas de dicha muestra, con el objetivo de mitigar las diferencias en la profundidad de secuenciación de cada muestra. Para el análisis de expresión diferencial, DESeq2 realiza una transformación logarítmica en base 2 de los datos de conteo de genes, de manera que muestra el cambio en la proporción de lecturas como la comparación de la condición apMNKQ2 respecto al control en función del log2 (log2FoldChange). Así, valores

positivos indican transcritos con mayor expresión respecto al control y valores negativos indican una expresión disminuida en apMNKQ2. El test estadístico incluido en este paquete es el test paramétrico de Wald. El valor de p resultante se ajusta (p adj) por el método de Benjamini-Hochberg para la corrección de comparaciones múltiples. Los genes con un valor de p ajustado inferior a 0.01 y un $\log\text{foldchange} > 1.5$ o $\log\text{foldchange} < -1.5$ se consideraron como diferencialmente expresados.

El análisis de los datos obtenidos en el Riboseq se realizó usando un *pipeline* a medida. Las lecturas fueron filtradas y recortadas usando fastp (354). Posteriormente se alinearon las lecturas frente al transcriptoma humano (gencode v43) usando el software bowtie2 v2.2.6 (355).

3.13.2. Análisis de enriquecimiento

El enriquecimiento funcional de los las proteínas identificadas en los ensayos 2D-DIGE y de los mRNAs identificados por RNAseq y que presentaron una expresión diferencial entre control y apMNKQ2 se realizó con la herramienta Enrichr (356) que integra diversas bases de datos como Gene Ontology (GO) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) o Reactome, entre otras. Se consideró enriquecimiento para aquellas categorías con una p ajustada mediante el método de Benjamini-Hochberg inferior a 0.05.

3.13.3. Análisis de interacciones entre proteínas

El análisis de las interacciones entre proteínas identificadas en la 2D-DIGE se realizó en la plataforma STRING versión 11.5. La base de datos STRING integra todas las asociaciones conocidas entre proteínas tanto físicas como funcionales a partir de diferentes fuentes, entre las que se encuentran interacciones descritas en artículos científicos, bases de datos de experimentos de interacción de proteínas y rutas de señalización y predicciones computacionales (357). Para el análisis de las interacciones se utilizaron los parámetros por defecto del programa (nivel de confianza medio y seleccionando todas las fuentes de interacción).

En el caso de los mRNAs diferencialmente expresados identificados por RNAseq el análisis de las interacciones se empleó la herramienta web NetworkAnalyst, que permite el análisis e interpretación visual de datos de expresión génica, así como los grados e intermediación de los genes centrales (358). Se empleó como base de datos The International Molecular Exchange (IMEx), que incluye la información de varias bases de datos entre las que se encuentra STRING (359). Los genes diferencialmente expresados se representaron en una red de orden mínima que emplea los genes semilla (la lista de genes introducidos en el programa) y genes conectores introducidos por el propio programa que mantienen las conexiones de la red. En la representación, los nodos (genes) se distribuyeron mediante el algoritmo ForceAtlas (360) para facilitar su visualización. Con el objetivo de ajustar el tamaño de la red y simplificar la interpretación de las conexiones se realizó una red de orden cero que solo emplea aquellos genes semilla que interaccionan unos con otros. En la distribución de nodos y aristas de esta representación se usó el algoritmo de Fruchterman-Reingold (361), que organiza los vértices de

tal manera que cuanto mayor sea el grado de conexión entre dos genes, menor será la distancia entre los nodos vinculados y mayor los de menor vinculación.

4. Mutagénesis dirigida del gen de NDRG1 en el plásmido pcDNA3

La secuencia codificante de NDRG1 *wild type* se subclonó en los sitios XbaI y EcoRI del plásmido Myc-pcDNA3 a partir del plásmido pCMV3-N-His (Sino biological) utilizando los primers 5'NDRG1 XbaI y 3'NDRG1 EcoRI (Tabla 5). Sobre el plásmido pcDNA3-NDRG1 se realizó mutagénesis dirigida para obtener los mutantes T346E y T346A mediante la generación de fragmentos de PCR solapantes (362). Este método se basa en la realización de dos PCRs que amplifiquen el gen en dos fragmentos con una región común en la cual se introducen las mutaciones deseadas. El solapamiento de los productos de las PCRs sirve como molde y cebador de una tercera PCR, cuyo producto de amplificación será la combinación de ambos fragmentos que equivale al gen original con las mutaciones introducidas (Figura 8).

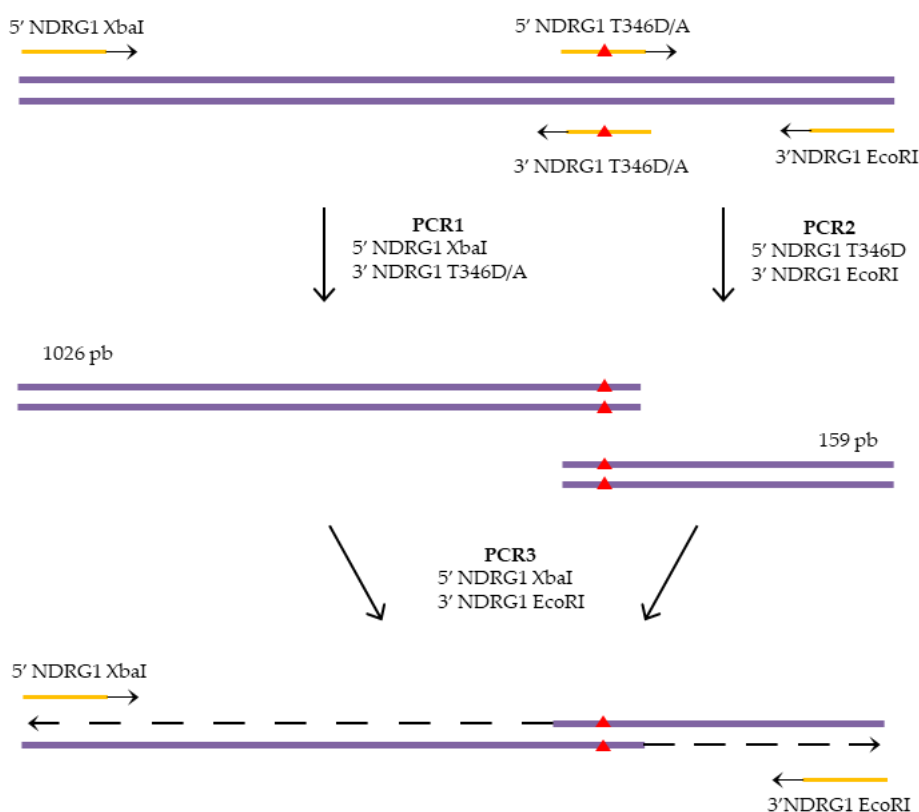
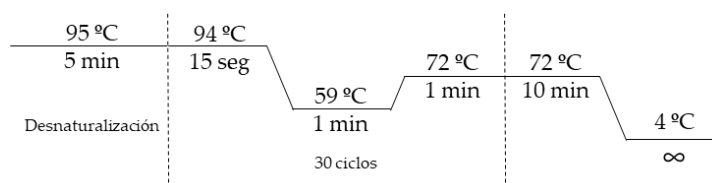


Figura 8. Representación esquemática del proceso de mutagénesis dirigida mediante la generación de fragmentos solapantes.

Tabla 5. *Primers* utilizados en los ensayos de mutagénesis dirigida.

Nombre	Primer 5'
5' NDRG1 EcoRI	GGGTCTAGATCTCGGGAGATG
3' NDRG1 XbaI	GGGGAATTCGCAGGAGACCTC
5' NDRG1 T346A	CGCTCCCACGCCAGCGAGGGC
3' NDRG1 T346A	GCCCTCGCTGGCGTGGGAGCG
5' NDRG1 T346D	CGCTCCCACGACAGCGAGGGC
3' NDRG1 T346D	GCCCTCGCTGTCGTGGGAGCG

En la primera PCR se utilizó un primer complementario al extremo 5' del gen de NDRG1 que incorpora el sitio de restricción de XbaI y otro primer complementario a la región T346 que incluye la mutación por alanina o aspártico (Tabla 5). En la segunda PCR se utilizó un primer complementario frente al otro extremo del gen de NDRG1 que incorpora el sitio de restricción de EcoRI y otro primer que incluye la mutación de la T346. En la tercera PCR se utilizaron los *primers* complementarios a los extremos del fragmento. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la polimerasa de DNA Q5 HotStar HiFidelity (New England BioLabs) de acuerdo al protocolo de la casa comercial y 10 ng de molde (plásmido NDRG1 o fragmentos de las PCRs 1 y 2). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:



Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich) a distintos porcentajes según el tamaño del DNA en tampón TAE 1x (AccuGENE) y GelRed 1:1000 (Biotium) para la detección de los fragmentos de DNA. La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1x a un voltaje de 100 V durante 1h aproximadamente y se visualizó en el transiluminador de luz azul. Las bandas de 1026 pares de bases (pb) de la primera PCR y de 159 pb de la segunda PCR se extrajeron de los geles de agarosa utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la tercera PCR se purificó un fragmento de aproximadamente 1200 pb. Los insertos se eluyeron en 20 µl de agua y se cuantificó su concentración en el Nanodrop.

4.1. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Tanto el vector (pcDNA3-myc) como el inserto aislado se digirieron con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI FastDigest (ThermoFisher), utilizando 1 µg de vector o 1 µg de inserto, 10 U de cada enzima y 1x del tampón de reacción FastDigest (ThermoFisher). La reacción se incubó durante 10 minutos a 37 °C y durante 20 minutos a 80 °C para inactivar las enzimas. Los fragmentos digeridos se purificaron de un gel de agarosa.

4.2. Ligación de DNA

La ligación del inserto y el vector digeridos se realizó con 1 µl de enzima T4 ligasa (New England BioLabs), 1x tampón T4 DNA Ligasa y manteniendo un ratio molar vector inserto de 1:3 (50 ng de vector y 33 ng de inserto) en un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó durante 16h a 4 °C.

4.3. Transformación de bacterias y purificación de plásmidos

Las bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa JM109 se transformaron con la mezcla de ligación obtenida en el apartado anterior. Para llevar a cabo la transformación se incubaron 50 µl de bacterias con 5 µl de la mezcla de ligación durante 30 minutos en hielo. A continuación, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 30 segundos a 42 °C en agitación seguidos de 90 segundos en hielo. Las bacterias se mezclaron con 250 µl de medio LB (ThermoFisher) sin ampicilina y se incubaron durante 1h a 37 °C en agitación. Por último, las bacterias se centrifugaron durante 1 min a 5000 rpms, se resuspendieron en 50 µl de LB y se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina (Sigma-Aldrich) a 50 µg/ml. El crecimiento de colonias individuales se comprobó tras 16h de incubación a 37 °C.

La presencia del plásmido en las colonias se determinó mediante una PCR utilizando como *primers* los oligonucleótidos diseñados frente los extremos del inserto de NDRG1. Para ello, una fracción de la colonia se lisó en una mezcla de reacción de PCR (0,4 U de DNA polimerasa (Biotools), tampón de PCR 1x (Biotools), 3 mM MgCl₂ (Biotools), 1 µM *primers* 5' y 3' a, 0.2 mM dNTPs (Biotools)), y se llevó a cabo la PCR con 40 ciclos. El producto de la amplificación, de un tamaño aproximado de 1200 pb para las colonias positivas que han incorporado el plásmido con el inserto, se visualizó en un gel de agarosa. Las colonias positivas se amplificaron en 4 ml de LB ampicilina durante 16h a 37 °C. Una fracción de bacterias (800 µl) se mezcló con glicerol (200 µl) y se conservó a -80 °C. A partir del volumen restante de bacterias se purificó el plásmido mediante una Miniprep, utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega). La concentración del plásmido se determinó en el Nanodrop.

Los plásmidos se secuenciaron mediante secuenciación Sanger en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, lo que permitió comprobar la presencia de las mutaciones en la T346.

5. Estadística

Los datos presentados se muestran como el valor medio junto con el error estándar de la media (SEM). Con el objetivo de determinar diferencias significativas entre los promedios de los diferentes grupos experimentales se realizó un análisis estadístico de la *t* de *Student* en ensayos con dos grupos experimentales y mediante *One-way* ANOVA seguido del test de Tukey en aquellos casos en los que se comparaban más de dos grupos experimentales. El *t* test de una muestra (*One Sample t test*) se realizó para determinar la significancia en muestras normalizadas frente al control. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa Graphpad Prism 8.0 y se consideraron diferencias significativas con valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre MNK1 y sus sustratos

1.1. Efecto de apMNKQ2 sobre la fosforilación de sustratos de MNK

El efecto de apMNKQ2 sobre la actividad quinasas de MNK se evaluó a través de la fosforilación de su sustrato eIF4E a distintos tiempos y dos concentraciones de aptámero en la línea MDA-MB-231 (140 nM, correspondiente con la IC₅₀ y 400 nM, aproximadamente 3 veces la IC₅₀) (Figura 9). A las 4 h, tanto P29 como apMNKQ2, producen un incremento temporal de la fosforilación de eIF4E, que se aproxima a los valores del control a partir de las 8 h. A las 16 y 24 h, apMNKQ2 reduce la fosforilación de eIF4E de forma significativa a las dos concentraciones usadas, de acuerdo con una inhibición de MNK1.

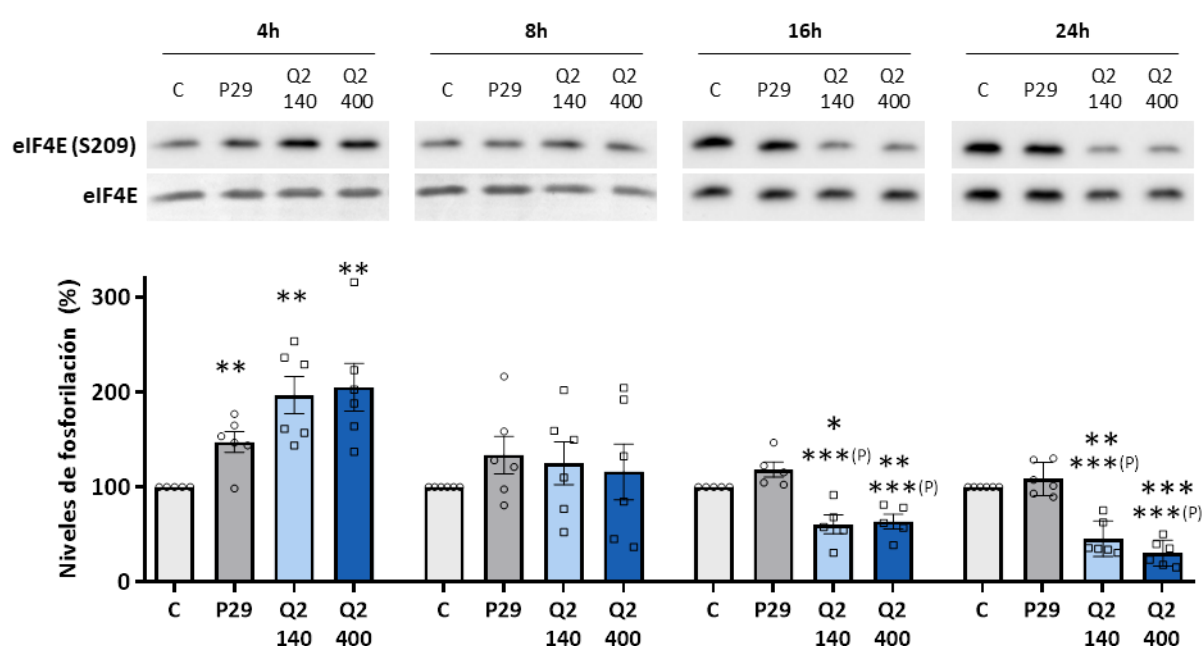


Figura 9. La fosforilación de eIF4E se incrementa temporalmente a las 4 h tras la transfección con los aptámeros y se reduce a partir de las 16 h en células tratadas con apMNKQ2. La fosforilación de eIF4E se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes (140 y 400 nM) y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. Las gráficas representan la media ± SEM de entre 5 y 6 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de eIF4E totales y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control, **^(P) $p < 0.01$, ***^(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectada con P29).

Puesto que no existen anticuerpos fosfoespecíficos para los otros sustratos de MNK, la actividad de apMNKQ2 sobre sprouty2 y hnRNPA1 se estudió mediante otras estrategias. En el caso de sprouty2, el efecto de apMNKQ2 se evaluó a partir del cambio en la movilidad electroforética de las formas fosforiladas de la proteína y a partir de sus niveles totales, ya que la fosforilación por MNK regula la estabilidad de spry2. La separación de los extractos de proteína en geles de poliacrilamida al 12% permite detectar dos formas de spry2 con distinta movilidad electroforética, siendo las fosforilaciones en residuos de Ser y Thr de la región de aminoácidos 108-132 las

responsables de las bandas que migran más lentamente (363), entre los cuales se encuentran los residuos fosforilados por MNK (S112/121). El porcentaje de spry2 fosforilado respecto al total tiende a disminuir de forma no significativa a lo largo del tiempo en todas las condiciones (Figura 10A). Contrario a lo que cabría esperar, apMNKQ2 produce una tendencia al incremento de la forma fosforilada de spry2 respecto al total en cada tiempo estudiado, siendo significativa a las 24 h (Figura 10A). Los niveles totales tienden a incrementarse con apMNKQ2 a tiempos largos, aunque en ningún caso de forma significativa, lo que sugiere que el estado de fosforilación estabiliza los niveles de spry2 (Figura 10B).

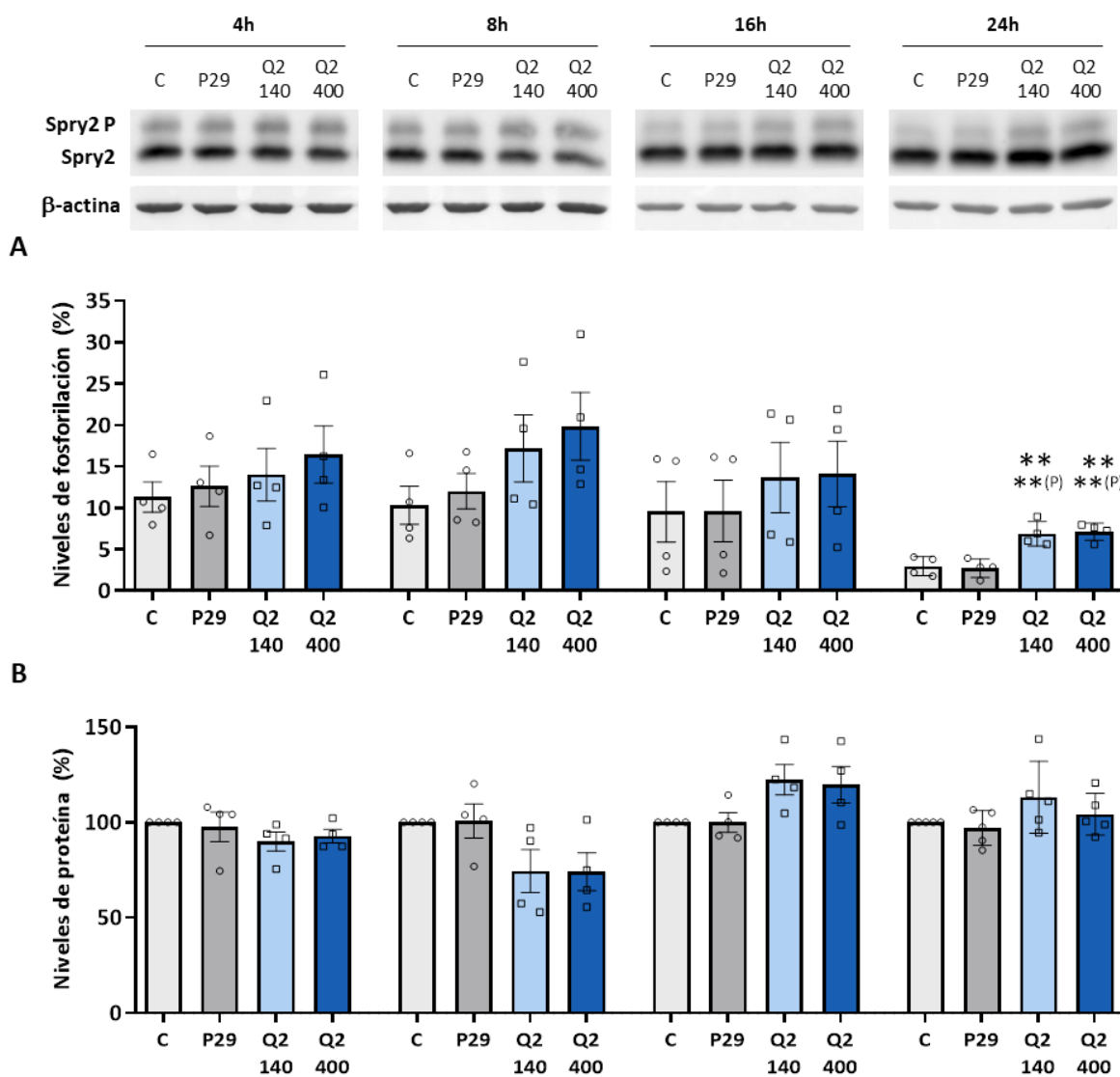


Figura 10. ApMNKQ2 afecta a la movilidad electroforética de spry2. El estado de fosforilación de spry2 (A) y sus niveles (B) se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes (140 y 400 nM) y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. Los niveles de spry2 fosforilado (banda superior) se expresan en porcentaje respecto a los niveles totales, mientras que los niveles totales de spry2 se han normalizado frente a β-actina. Las gráficas representan la media ± SEM de 4 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control en el caso de los niveles totales de spry2 (** p < 0.01, respecto al control, **^(E) p < 0.01, respecto a célula transfectadas con P29).

Los niveles y el estado de fosforilación de hnRNPA1 se determinó mediante isoelectroenfoque, mientras que su actividad se evaluó estudiando su distribución entre núcleo y citoplasma. Los niveles de hnRNPA1 permanecen estables a lo largo de los tiempos estudiados en células transfectadas con apMNKQ2, aunque tienden a disminuir a las 24 h (Figura 11A). En los ensayos de isoelectroenfoque se observó una banda mayoritaria a un PI de aproximadamente 9, que se corresponde con un estado desfosforilado de hnRNPA1. De forma minoritaria se observaron dos bandas a un PI más ácido (8.2 y 8.0), que se corresponden con formas fosforiladas de hnRNPA1 y que no cambian a lo largo del tiempo en la situación control, pero se incrementan ligeramente a las 24 h con apMNKQ2 a 400 nM (Figura 11B). Por otro lado, la localización subcelular de hnRNPA1 es totalmente nuclear, independientemente de la presencia de apMNKQ2 (Figura 11C).

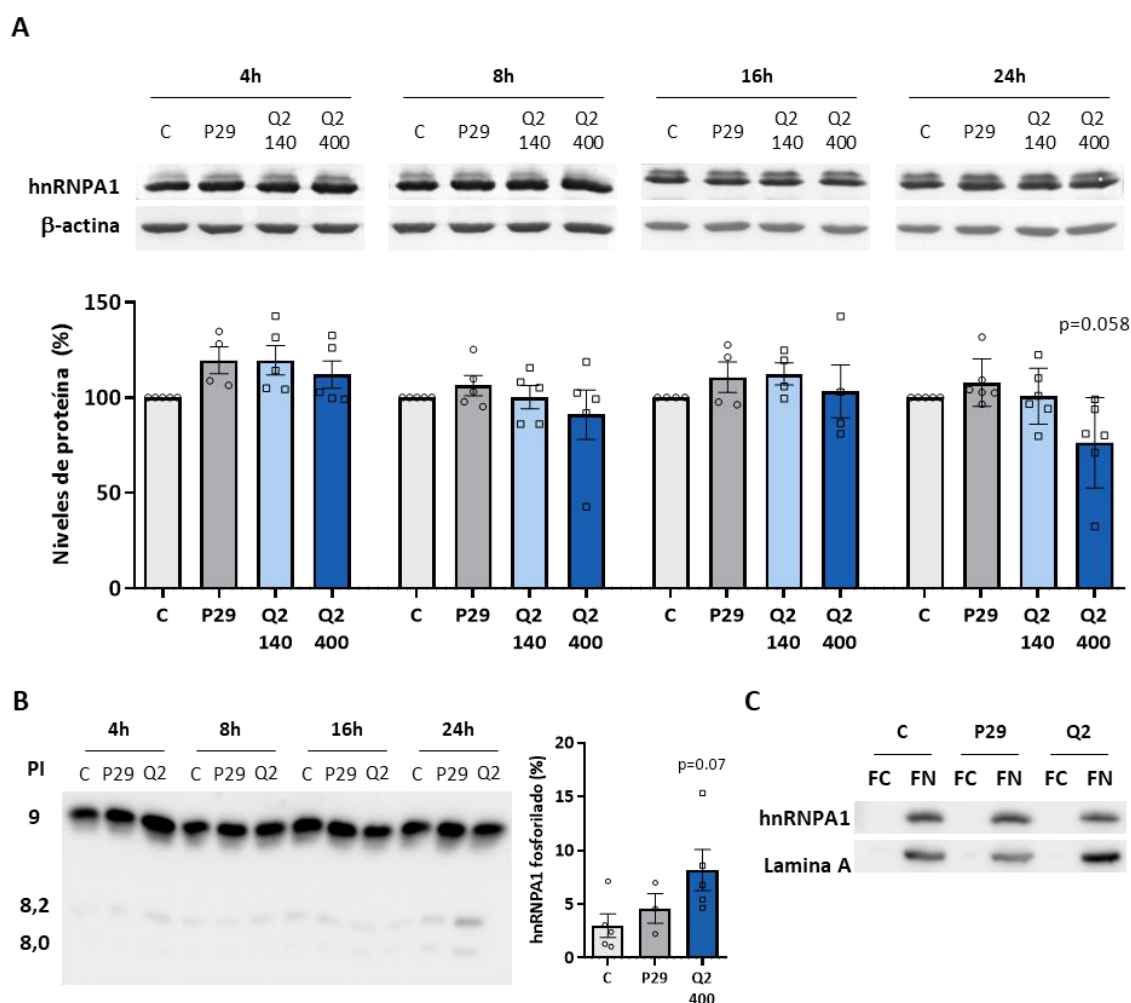


Figura 11. ApMNKQ2 no afecta a la expresión, localización y fosforilación de hnRNPA1. Los niveles de hnRNPA1 (A) y su estado de fosforilación. (B) se cuantificaron mediante western blot e isoelectroenfoque respectivamente, en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a una o dos concentraciones diferentes (140 y 400 nM) y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 5 ensayos independientes normalizados frente a la β -actina y expresados en porcentaje respecto al control en el caso de los niveles de hnRNPA1 (A), mientras que la gráfica referente al isoelectroenfoque (B) representa el porcentaje de hnRNPA1 fosforilado respecto al total a 24 h para 5 ensayos independientes. (C) Imagen representativa de la distribución entre núcleo (FN) y citoplasma (FC) a las 24 h de la transfección de las células MDA-MB-231 con apMNKQ2 a 400 nM.

1.2. Efecto de apMNKQ2 sobre las isoformas de MNK1

Los cambios observados en el sustrato eIF4E podrían asociarse tanto con una inhibición de la actividad quinasa de MNK como con una modulación de los niveles de MNK1. La expresión de MNK1a a nivel de proteína se determinó a las 4, 8, 16 y 24 h tras la transfección con apMNKQ2 a 140 y 400 nM, observándose disminuciones significativas a partir de las 16 h a las dos concentraciones de aptámero (Figura 12A). El anticuerpo frente a MNK M20 de Santa Cruz, capaz de detectar la isoforma MNK1b, fue descatalogado durante el desarrollo de esta tesis, por lo que la expresión de MNK1b solo pudo ser cuantificada en células transfectadas con apMNKQ2 a 400 nM y a las 24 h. Aunque en menor porcentaje respecto a MNK1a, la expresión de MNK1b también se reduce en presencia de apMNKQ2 a las 24 h (Figura 12B). Por tanto, la disminución de los niveles de MNK1 coincide temporalmente con la bajada en la fosforilación de eIF4E. A nivel de mRNA, ninguna de las dos isoformas de MNK presenta cambios a las 24 h, lo que indica que la modulación por apMNKQ2 se produce a nivel postranscripcional (Figura 12C).

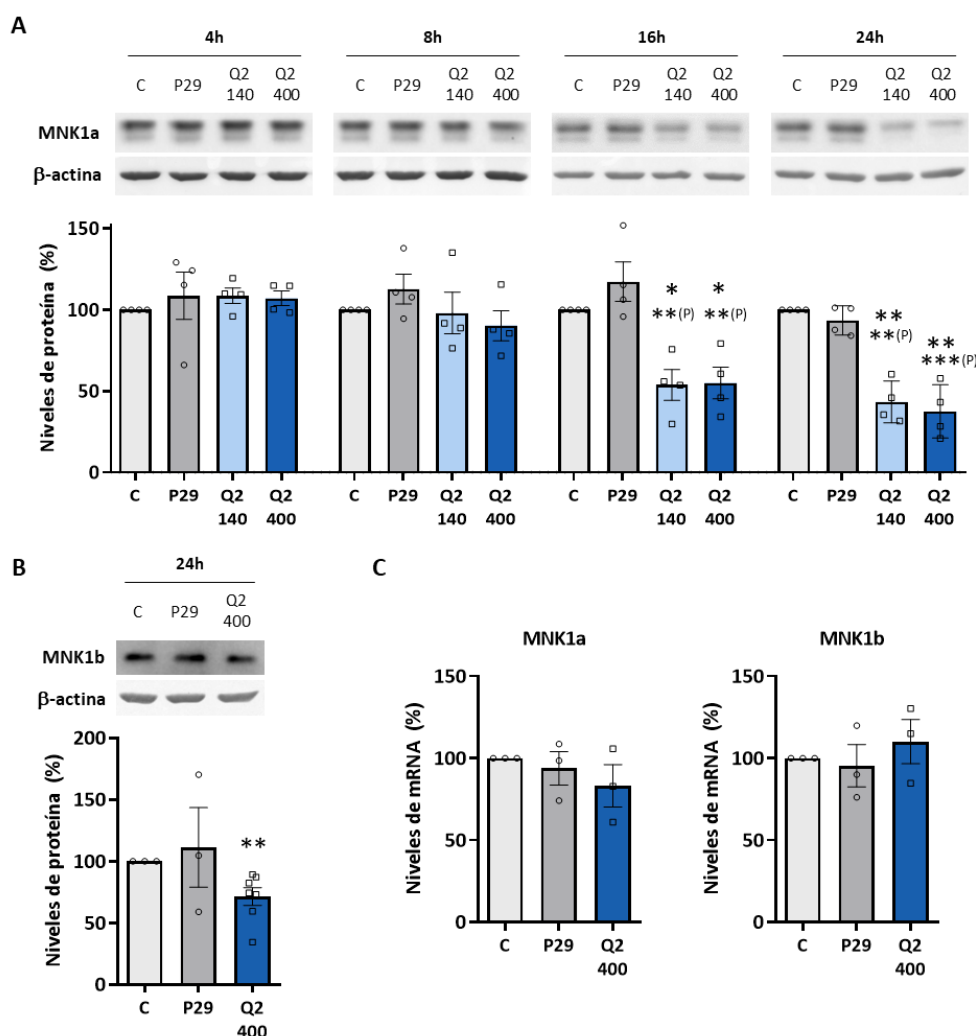


Figura 12. ApMNKQ2 disminuye MNK1a y MNK1b a nivel de proteína. La expresión de MNK1a (**A**) y MNK1b (**B**) se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a 140 y/o 400 nM y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h, en el caso de MNK1a, o a las 24 h para MNK1b. (**C**) Los niveles de

mRNA de MNK1a y MNK1b se determinaron por qPCR a las 24 h en células transfectadas a 400 nM de apMNKQ2. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 5 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control, **^(P) $p < 0.01$, ***^(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

1.2.1. Regulación de MNK1 por miRNAs en presencia de apMNKQ2

El miRNA miR-7-5p tiene como diana MNK1 y a través de la unión a la región 3'UTR de su mRNA reduce su expresión (173). La transfección de una secuencia de RNA que mimetiza a miR-7-5p (miRNA mimic) reduce la expresión de MNK1a en las células MDA-MB-231, mientras que la transfección con otra secuencia que se une al miR-7-5p endógeno y evita que pueda reprimir la expresión de sus dianas (miRNA inhibidor), incrementa ligeramente los niveles de MNK1a (Figura 13A). Además, al combinar ambas secuencias se contrarrestan sus efectos sobre la expresión de MNK1a (Figura 13B), lo que demuestra que MNK1a está regulado por miR-7-5p. Sin embargo, en presencia de apMNKQ2, el miRNA inhibidor no es capaz de recuperar la expresión de MNK1a (Figura 13C), por lo que la modulación de los niveles de MNK1 por apMNKQ2 no parece estar mediada por cambios en los niveles de miR-7-5p.

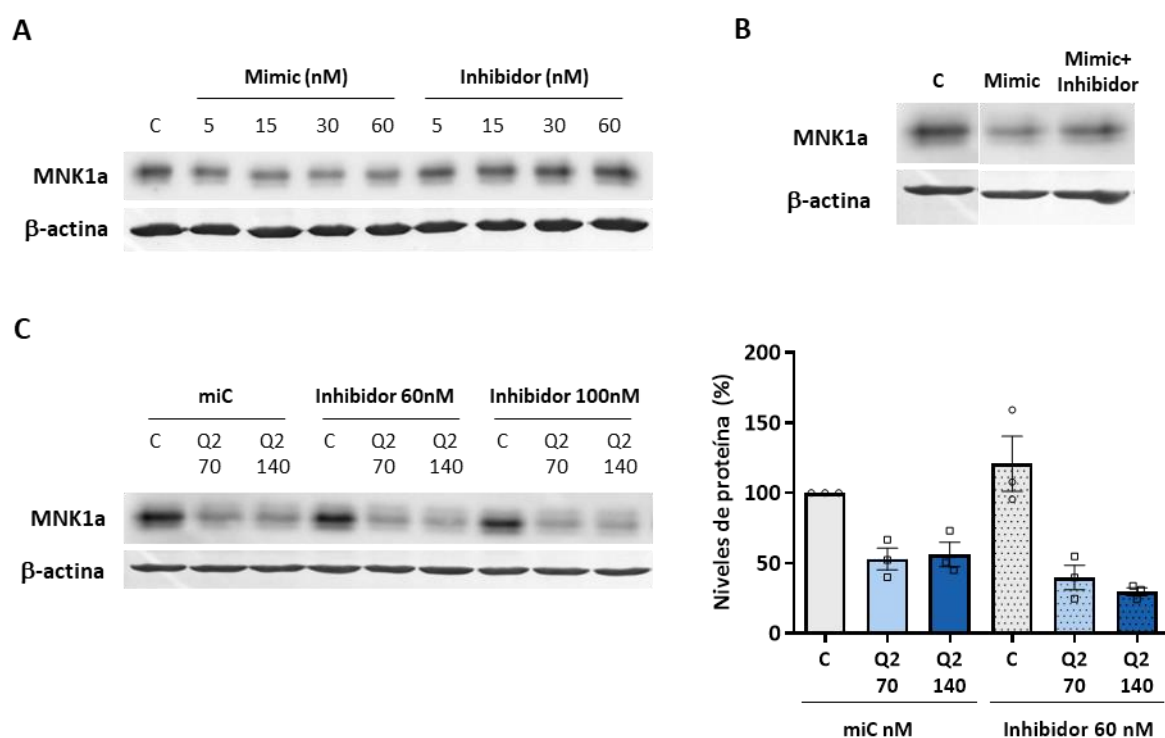


Figura 13. El efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de MNK1a no depende de la actividad de miR-7-5p. Los niveles de MNK1a se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con un miRNA control (miC), un miRNA mimic de miR-7-5p (mimic) y un inhibidor de miR-7-5p (inhibidor) a distintas concentraciones durante 24 h, individualmente (**A**) o combinando mimic e inhibidor a 100 nM (**B**). Imagen representativa de la expresión de MNK1a 24 h después de la transfección con la combinación de miRNA inhibidor (60 y 100 nM) y apMNKQ2 (70 y 140 nM) y correspondiente cuantificación para 60 nM de miRNA inhibidor (**C**). La gráfica representa la media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control.

1.2.2. Estudio de la degradación de MNK1 por el proteasoma en presencia de apMNKQ2

La interacción de apMNKQ2 con MNK1 podría promover la degradación de la proteína mediada por el proteasoma. Para determinar si los efectos observados se corresponden con una potenciación de la degradación de MNK1a se cuantificaron sus niveles en células tratadas con apMNKQ2 a 140 nM y con el inhibidor del proteasoma MG132. Sorprendentemente, MG132 reduce los niveles de MNK1a a 18 h (Figura 14A), mientras que, en los ensayos combinados, apMNKQ2 no disminuye la expresión de MNK1a (Figura 14B). Puesto que la reducción de MNK1 inducida por apMNKQ2 se elimina en presencia de MG132, este mecanismo podría ser dependiente del proteasoma.

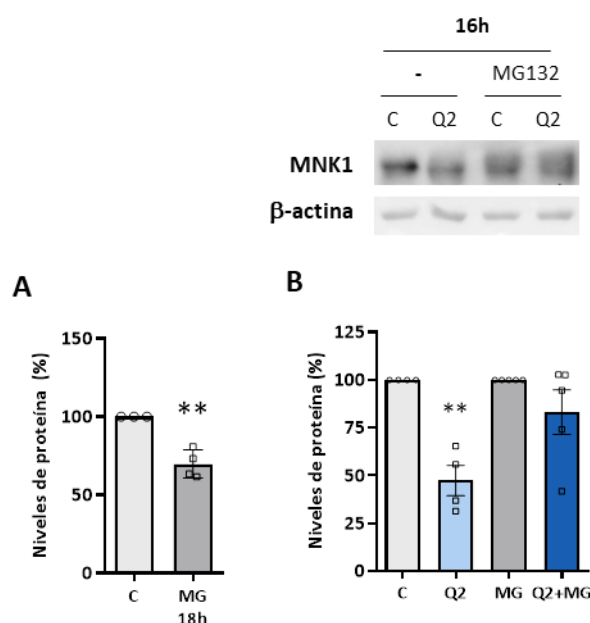


Figura 14. La expresión de MNK1 en presencia de apMNKQ2 podría estar regulada a nivel del proteasoma. Los niveles de MNK1a se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 pretratadas con MG132 5 μ M durante 2h y transfectadas con apMNKQ2 a 140 nM. Las células se lisaron a las 16 h tras el inicio de la transfección, manteniendo en todo momento la presencia de MG132 5 μ M en el medio de cultivo. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 4 y 5 ensayos independientes normalizados frente a la expresión de β -actina y expresados en porcentaje respecto a células control (A, B) o a células tratadas solo con MG132 en el caso de la combinación MG132 y apMNKQ2 (B) (** $p < 0.01$, respecto al control).

2. Efecto de apMNKQ2 tras la modulación de la expresión de MNK1

2.1. Efecto de apMNKQ2 tras la sobreexpresión de MNK1a

Con el objetivo de determinar si la disminución de la expresión de MNK1a se relaciona directamente con los efectos inhibitorios de apMNKQ2 sobre la viabilidad celular o la capacidad de migración celular (321), MNK1a se sobreexpresó de forma transitoria a través de un plásmido

pcDNA3 que contiene el DNA codificante de MNK1a unido al tag Flag a una concentración de plásmido que permitiera igualar los niveles de MNK1a en células co-transfectadas con apMNKQ2 a los del control. La transfección con el plásmido pcDNA3-Flag-MNK1a, a pesar de recuperar parcialmente los niveles de MNK1a en presencia de apMNKQ2 a 140 nM (Figura 15A), no revierte el efecto inhibitorio de apMNKQ2 sobre la viabilidad celular (Figura 15B) o sobre la migración celular estudiada en ensayos de heridas (Figura 15C).

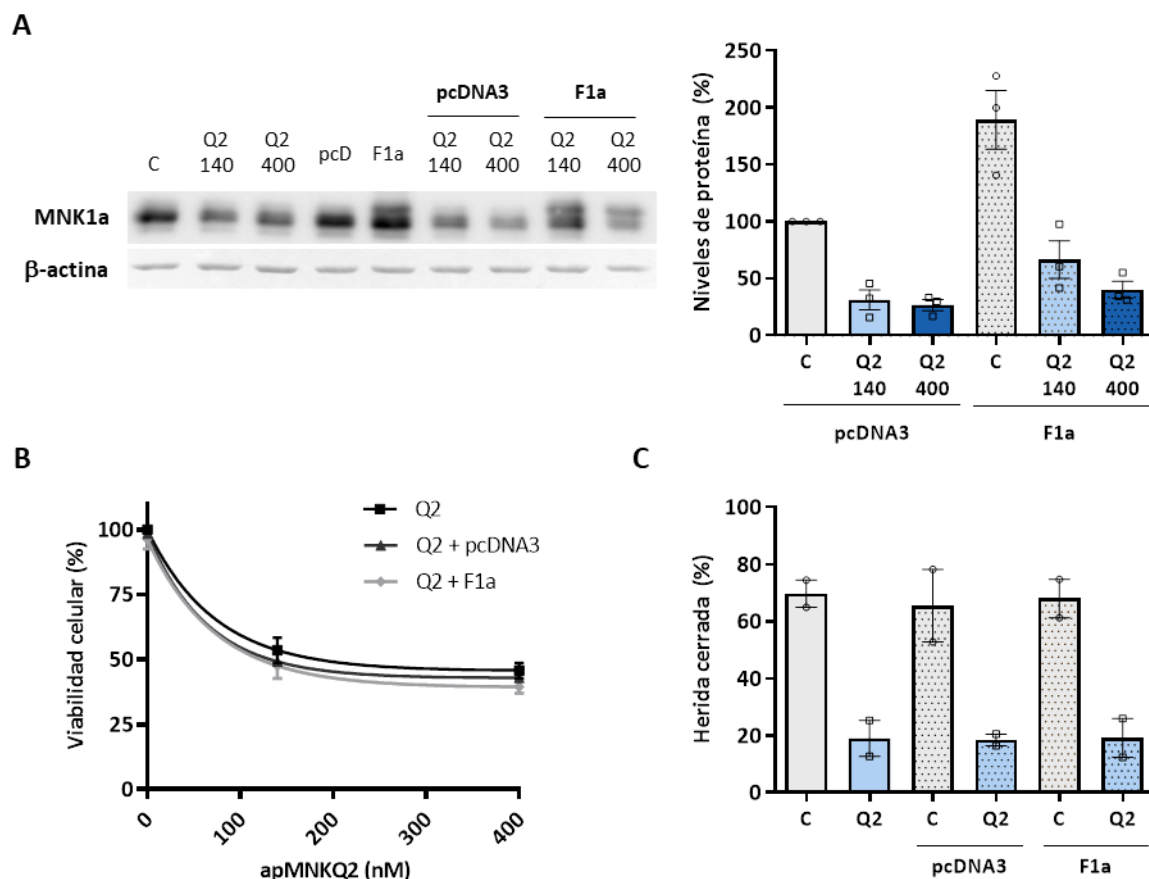


Figura 15. La variación de los niveles de MNK1a inducida por apMNKQ2 no parece ser responsable de la inhibición de la viabilidad celular y capacidad de migración. La expresión de MNK1a se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 sembradas en una p6, co-transfectadas con apMNKQ2 (140 y 400 nM) y 40 ng de pcDNA3-Flag-MNK1a (F1a) o del vector vacío (pcDNA3) y lisadas a las 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto células transfectadas con pcDNA3 (**A**). La viabilidad celular se analizó en paralelo mediante ensayos MTT 48 h después de la transfección. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control de células transfectadas con lipofectamina (**B**). La migración celular se evaluó en ensayos de herida realizados 24 h después de la co-transfección de los plásmidos y apMNKQ2 (140 nM), tomando fotos a 0h y 12h tras la realización de la herida. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM del porcentaje de herida cerrada en 2 ensayos independientes (**C**).

2.2. Efecto de apMNKQ2 tras el silenciamiento de MNK1 y MNK2

La relevancia de las MNKs en la viabilidad celular se estudió mediante la transfección de siRNAs específicos de MNK1 y MNK2 en dos líneas tumorales de mama, las MDA-MB-231 y las MCF7.

En primer lugar, se comprobó la eficacia de los silenciamientos cuantificando a las 48 h los niveles de proteína de MNK1a (Figura 16A) y MNK1b (Figura 16B) y de mRNA de MNK2a (Figura 16C) y MNK2b (Figura 16D), ya que los anticuerpos comerciales de MNK2 fallan a la hora de reconocer las formas endógenas (25,49). En ambas líneas celulares se alcanza un silenciamiento de MNK1a cercano al 50% pero solo se observó disminución de los niveles de MNK1b en las MCF7. Respecto a MNK2a, se observó una disminución leve de los niveles de mRNA en las dos líneas celulares, mientras que el silenciamiento de la isoforma MNK2b se produjo de forma más pronunciada. En la línea MDA-MB-231 se observó, además, un incremento del mRNA de las dos isoformas de MNK2 tras el silenciamiento de MNK1.

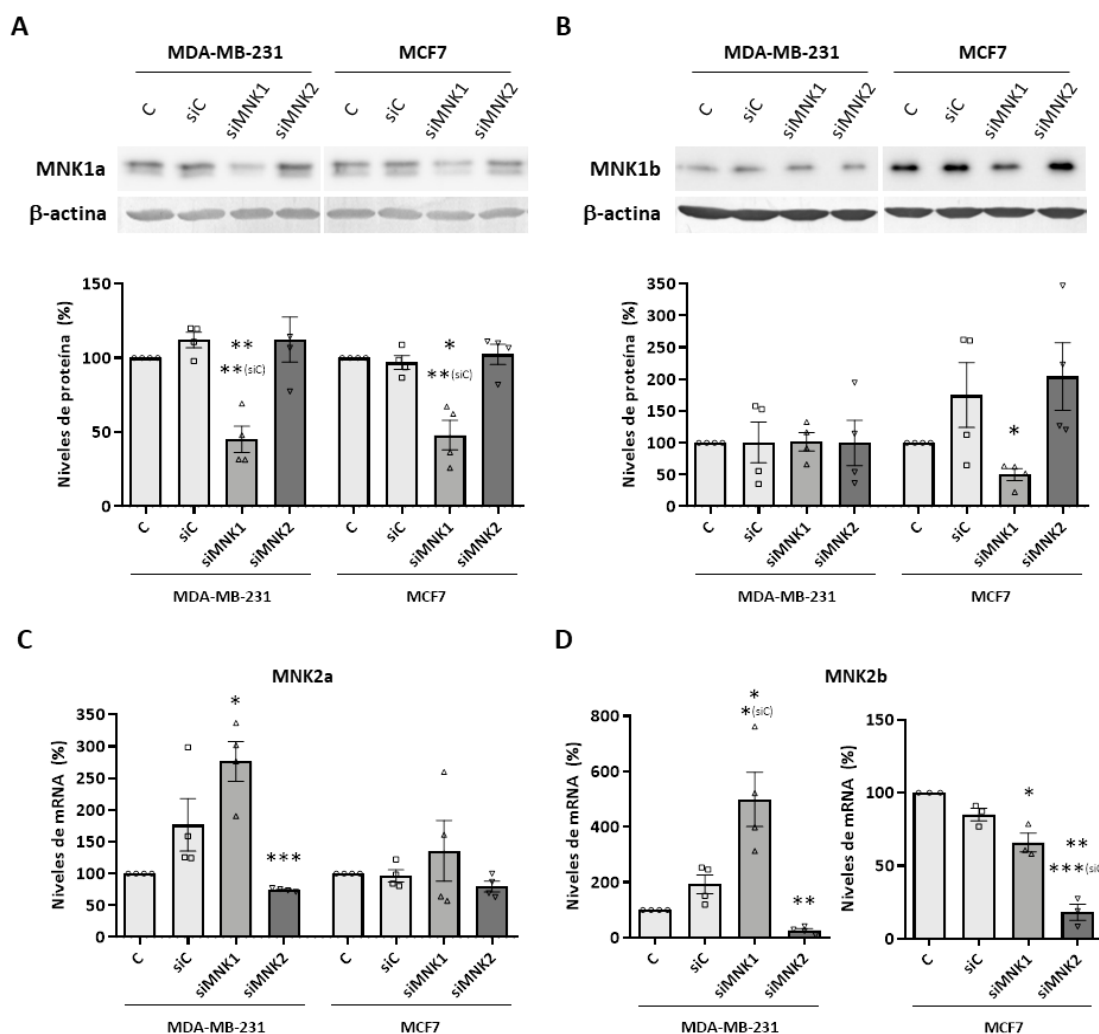


Figura 16. Cuantificación de los niveles de las isoformas de MNK1 y MNK2 tras el silenciamiento con siRNAs. Los niveles de MNK1a (A) y MNK1b (B) se cuantificaron mediante western blot y la expresión de MNK2a (C) y MNK2b (D) mediante qPCR. En ambos casos, las células MDA-MB-231 y MCF7 se transfectaron con 75 pmol de siRNA control (siC) y siRNAs específicos de MNK1 (siMNK1) y MNK2 (siMNK2) y se lisaron a las 48 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 o 4 ensayos independientes normalizados frente a la β -actina y expresados en porcentaje respecto al control transfectado con lipofectamina. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al control, *(siC) $p < 0.05$, **(siC) $p < 0.01$, ***(siC) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con siC).

La viabilidad de la línea MDA-MB-231 no disminuye tras el silenciamiento de MNK1 y MNK2 respecto al siRNA control (Figura 17A) y en las MCF7 únicamente se afecta la viabilidad celular con el silenciamiento de MNK1 (Figura 17B). Por tanto, en el caso de las MDA-MB-231 la disminución de la expresión de MNK1a por sí sola no parece ser relevante para la supervivencia de esta línea celular. En combinación con los siRNAs de MNK1 o MNK2, apMNKQ2 mantiene el mismo efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular respecto al siRNA control en la línea MDA-MB-231, mientras que en la línea MCF7 se observa una potenciación de la inhibición de la viabilidad celular cuando se combina apMNKQ2 con el silenciamiento de MNK1.

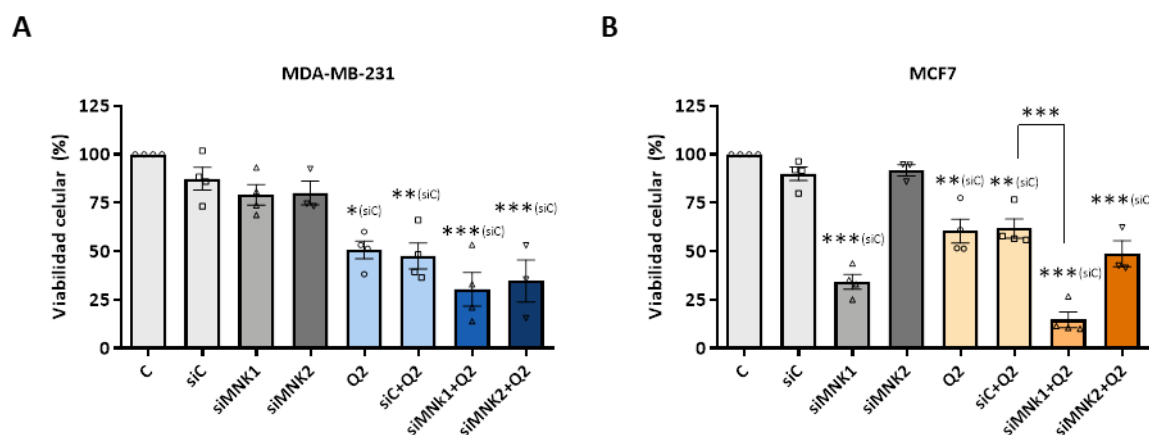


Figura 17. El silenciamiento de MNK1 no reduce la viabilidad de las células MDA-MB-231 y no potencia el efecto del aptámero, al contrario de lo que ocurre en las células MCF7. La viabilidad celular se analizó en células MDA-MB-231 (A) y MCF7 (B) mediante ensayos MTT 48 h después de la transfección con apMNKQ2 a 400 nM y 150 nM, respectivamente, y 72 h después de la transfección con los siRNAs. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 o 4 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control. El análisis estadístico se realizó frente SiC, ya que en todos los casos se observó una ligera reducción de la viabilidad a incorporar un siRNA respecto al control sin siRNA (*_(siC) $p < 0.05$, **_(siC) $p < 0.01$, ***_(siC) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con siC).

3. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la apoptosis de células de mama

3.1. Efecto de apMNKQ2 sobre proteínas antiapoptóticas reguladas por MNK

En líneas de cáncer de mama apMNKQ2 induce apoptosis mediada por caspasa 3, como demuestran los incrementos de los fragmentos cortados de PARP y α -espectrina. Estos eventos ocurren en paralelo a una disminución de dos de las proteínas antiapoptóticas reguladas por MNK: MCL1 y XIAP (321,322). El efecto de apMNKQ2 sobre la expresión de estas proteínas antiapoptóticas se observó a lo largo del tiempo en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes. A las 4 h se produce una disminución significativa de MCL1 a las dos concentraciones usadas, que se mantiene a lo largo de todos los tiempos estudiados (Figura 18A). En el caso de XIAP la reducción de los niveles comienza a las 8 h a 400 nM y se mantiene hasta las 24 h para las dos concentraciones de aptámero (Figura 18B). No se observaron cambios significativos en la expresión del mRNA de XIAP y MCL1 a 4 y 8 h a 400 nM

(Figura 18C). Estos resultados nos indican que la inducción de la apoptosis por apMNKQ2 es un evento temprano dentro de su mecanismo de acción.

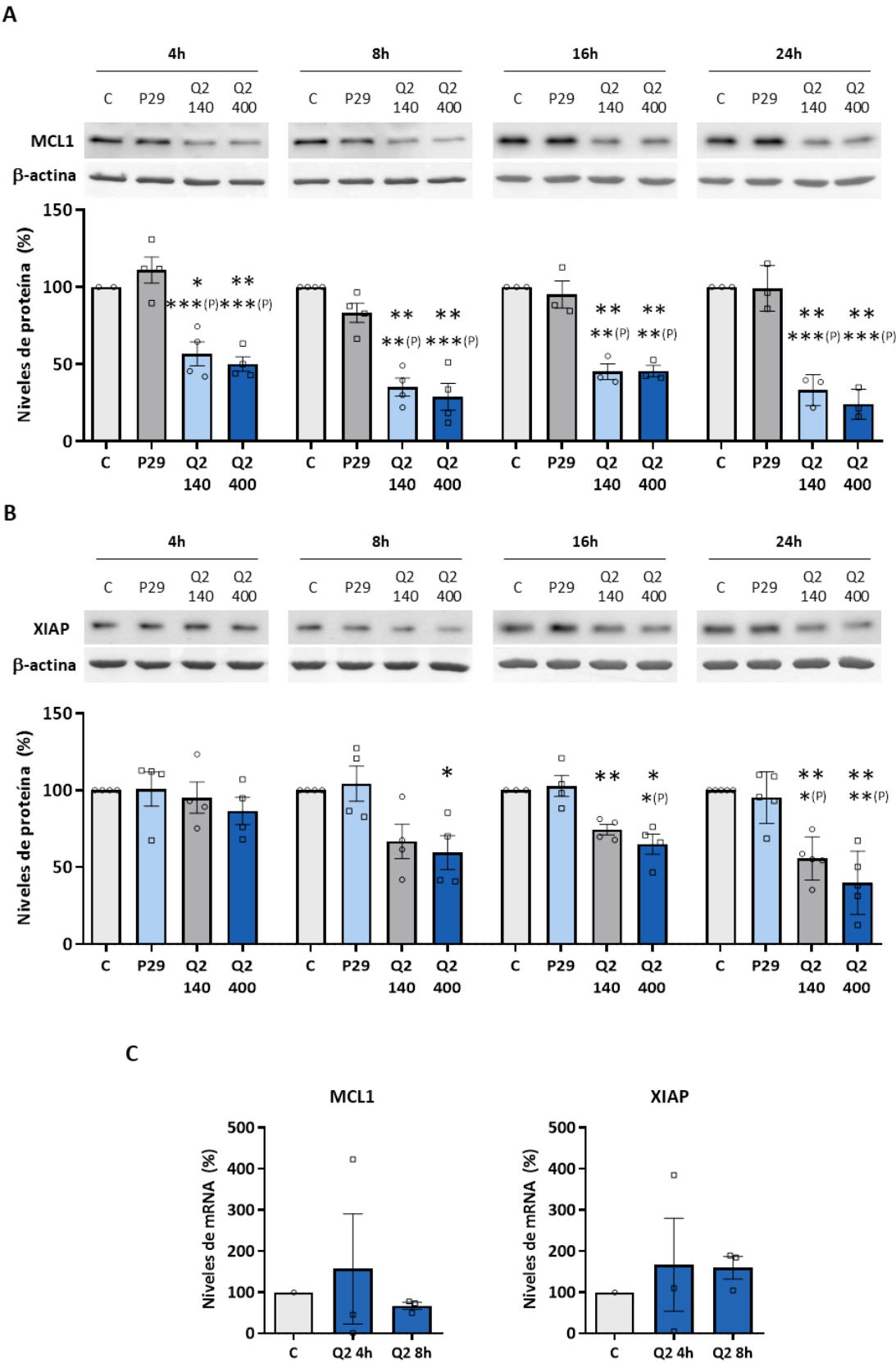


Figura 18. ApMNKQ2 disminuye los niveles de MCL1 y XIAP a tiempos cortos. Los niveles de MCL1 (A) y XIAP (B) se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes (140 y 400 nM) y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. (C) Los niveles de mRNA se cuantificaron a las 4 y 8 h en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a 400 nM. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 5 ensayos independientes normalizados frente a la expresión de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control, ^(P) $p < 0.05$, ^(P) $p < 0.01$, ^(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

3.2. Estudio de la degradación de MCL1 y XIAP por el proteasoma en presencia de apMNKQ2

Los efectos de apMNKQ2 sobre los niveles de las proteínas reguladas por MNK observados por WB podrían estar causados por una regulación de su transcripción, de su traducción o de su degradación por el proteasoma. Para estudiar la posible modulación de la ruta del proteasoma por apMNKQ2 se transfectaron células MDA-MB-231 en presencia del inhibidor del proteasoma MG132.

MCL1 es una proteína con una vida media corta (243) y sus niveles son altamente dependientes de la actividad del proteasoma, de tal manera que su inhibición produce un rápido incremento de MCL1 (364,365). En la línea MDA-MB-231 la inhibición del proteasoma incrementa los niveles de MCL1 a los dos tiempos estudiados (Figura 19A). En células transfectadas con apMNKQ2 y tratadas con MG132 se elimina casi totalmente la reducción de MCL1 inducida por apMNKQ2 a las 4 h y parcialmente a las 16 h, lo que sugiere que el efecto de apMNKQ2 sobre los niveles de MCL1 depende parcialmente del proteasoma (Figura 19A). La fosforilación de MCL1 en diferentes residuos puede favorecer su degradación o estabilización dependiendo del contexto celular. En células tumorales, a diferencia de lo que ocurre en fibroblastos, la fosforilación en la Thr163 mediada por ERK o JNK estabiliza MCL1 (366,367). Como se muestra en la figura 19B, la fosforilación en el residuo Thr163 únicamente se detectó en células MDA-MB-231 tratadas con MG132. En presencia de apMNKQ2 se produce una disminución de la fosforilación de MCL1, lo que concuerda con una degradación de MCL1 dependiente del proteasoma inducida por apMNKQ2.

La degradación de MCL1 depende de la ubiquitinización de residuos de lisina, que está regulada por diferentes ubiquitina ligasas E3 y deubiquitinasas (368). El estado de ubiquitinización de MCL1 en presencia de apMNKQ2 se trató de determinar por inmunoprecipitación de MCL1 con dos anticuerpos diferentes y mediante la detección de ubiquitina por western blot pero no se logró detectar ubiquitina en el MCL1 precipitado, a pesar de realizar los ensayos en células tratadas con MG132 y en presencia del inhibidor de deubiquitinasas N-etilmaleimida,. Estos resultados sugieren que ninguno de los anticuerpos utilizados es capaz de reconocer e inmunoprecipitar las formas ubiquitinizadas de MCL1.

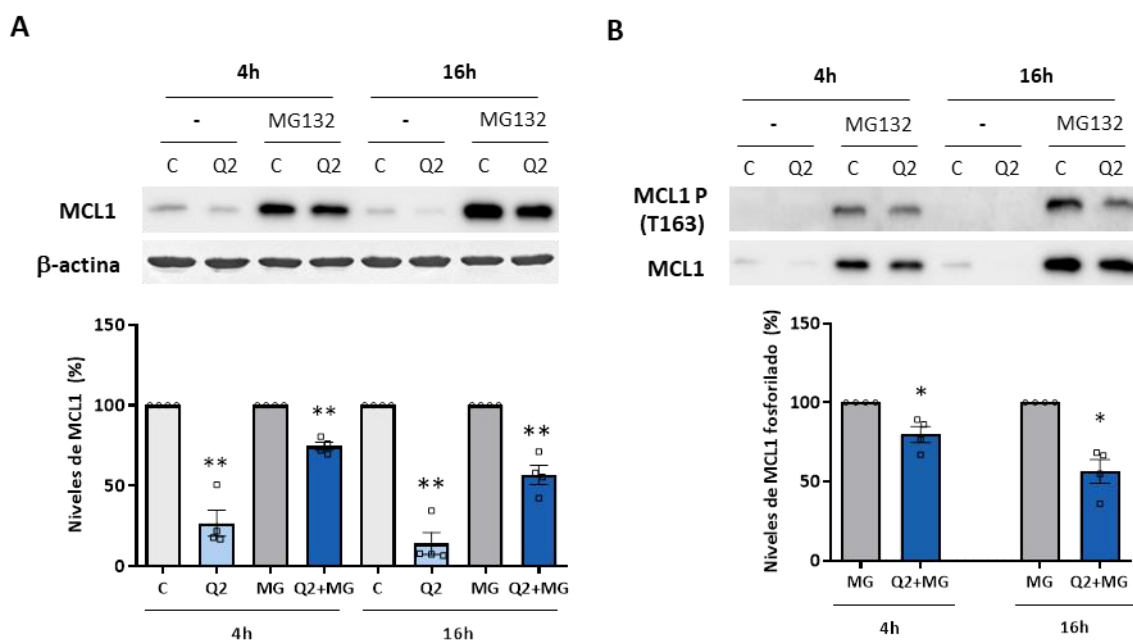


Figura 19. ApMNKQ2 regula la expresión de MCL1 a nivel del proteasoma de forma parcial. Los niveles de MCL1 (A) y MCL1 fosforilado (Thr163) (B) se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 pretratadas con MG132 5 μ M durante 2h y transfectadas con apMNKQ2 a 140 nM. Las células se lisaron a las 4 o 16 h tras el inicio de la transfección, manteniendo en todo momento la presencia de MG132 5 μ M en el medio de cultivo. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes normalizados frente a la expresión de β -actina, en el caso de MCL1, o frente a los niveles totales de MCL1, en el caso de MCL1 fosforilado, y expresados en porcentaje respecto al control o respecto a células tratadas solo con MG132 en el caso de la combinación MG231 y apMNKQ2 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control).

El proteasoma regula los niveles de XIAP, pero al contrario de lo que ocurre con otras proteínas anti-apoptóticas como MCL1, los inhibidores del proteasoma reducen su expresión (369–371). De acuerdo con estas publicaciones, en la línea MDA-MB-231, MG132 reduce los niveles de XIAP a las 18 h (Figura 20A), lo cual podría relacionarse con la inducción de apoptosis por este compuesto (369,371). En presencia de MG132, apMNKQ2 mantiene su reducción sobre los niveles de XIAP (Figura 20B), lo que indica que ambos compuestos actúan por mecanismos complementarios sobre la expresión de XIAP en la inducción de la apoptosis.

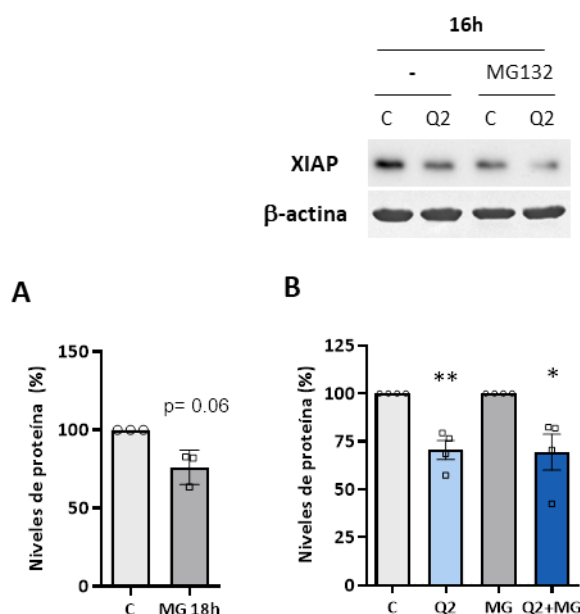


Figura 20. ApMNKQ2 disminuye los niveles de XIAP independientemente de la inhibición del proteasoma. La expresión de XIAP se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 pretratadas con MG132 5 μ M durante 2h y transfectadas con apMNKQ2 a 140 nM. Las células se lisaron a las 16 h tras el inicio de la transfección, manteniendo en todo momento la presencia de MG132 5 μ M en el medio de cultivo. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 4 ensayos independientes normalizados frente a la expresión de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control (A,B) o respecto a células tratadas solo con MG132 en el caso de la combinación MG132 y apMNKQ2 (B) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control).

4. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la proliferación de células de mama

4.1. Efecto de apMNKQ2 sobre proteínas reguladas por MNK en proliferación

En líneas de cáncer de mama apMNKQ2 afecta a la viabilidad celular y reduce la proliferación celular, induciendo parada del ciclo celular en fase S en la línea MDA-MB-468 (321). La expresión de dos de las proteínas reguladas por MNK y relacionadas con proliferación, ciclina D1 y β -catenina, se estudió en células MDA-MB-231 a diferentes tiempos y a dos concentraciones de apMNKQ2. El aptámero produce una disminución leve pero significativa de ciclina D1 (Figura 21A) y β -catenina (Figura 21B) a las 24 h a las dos concentraciones utilizadas.

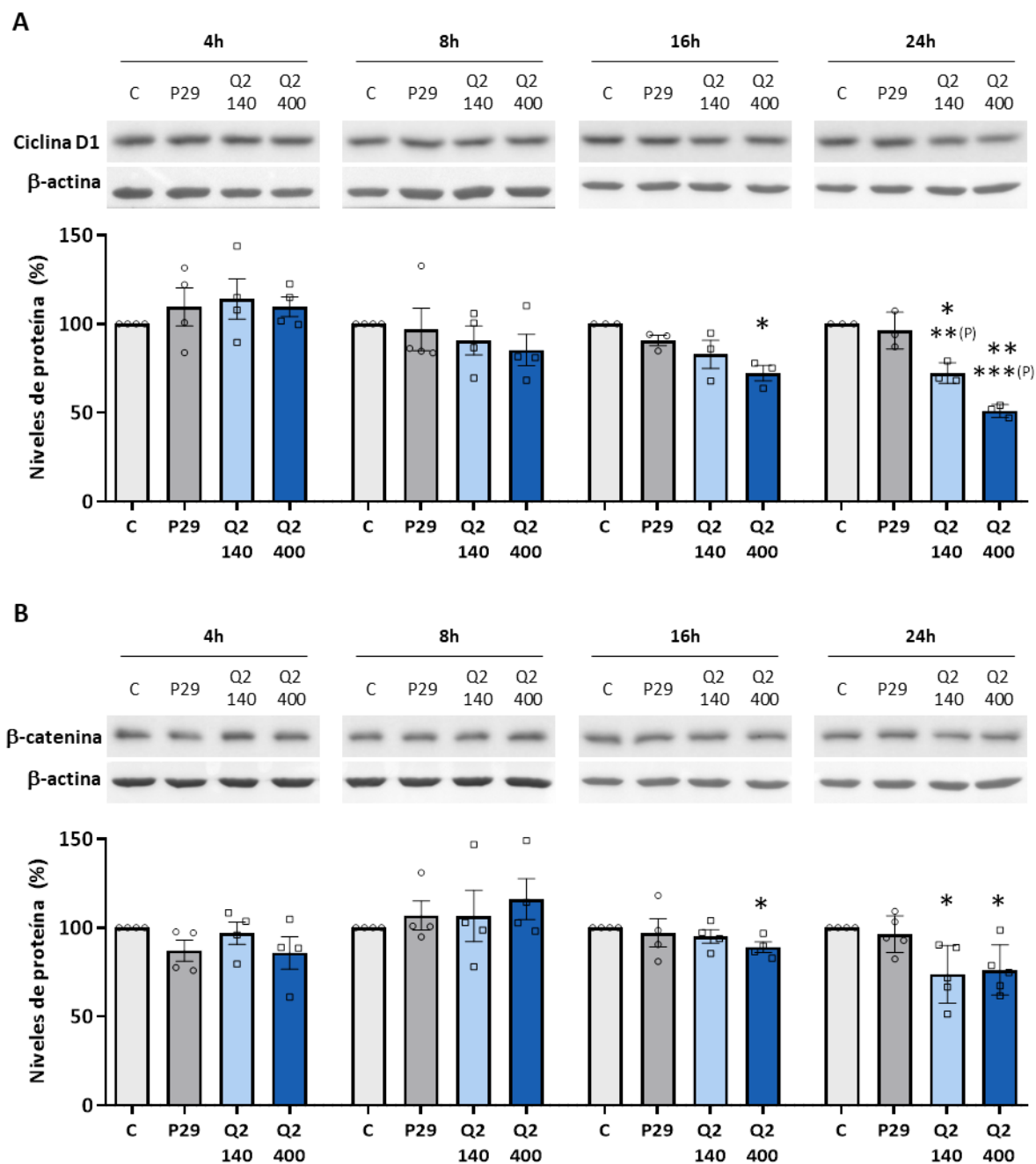


Figura 21. ApMNKQ2 disminuye la expresión de ciclina D1 y β-catenina a tiempos largos. Los niveles de ciclina D1 (**A**) y β-catenina (**B**) se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes (140 y 400 nM) y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. Las gráficas representan la media ± SEM de entre 3 y 4 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de β-actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control, ***(P) $p < 0.01$, ****(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

Para determinar la distribución del ciclo celular en células asincrónicas en cultivo transfectadas con apMNKQ2, se analizaron por western blot dos marcadores moleculares de ciclo celular: la fosforilación en la Tyr15 de CDK2 y la fosforilación en la Ser10 de la histona H3. La fosforilación en la Tyr15 de CDK2, que inhibe su actividad quinasas, se encuentra incrementada durante las fases S y G2 reduciéndose en la fase de mitosis (372,373). Por otro lado, la fosforilación de H3 se

correlaciona con la condensación de cromosomas que ocurre al inicio de la etapa de mitosis (374) y su incremento se asocia con una parada del ciclo en fase M (375). Respecto a la fosforilación de CDK2, se observó una reducción significativa a las 8 h y 16 h y una reducción de sus niveles de proteína a partir de las 16 h (Figura 22). La fosforilación de la H3 no pudo cuantificarse correctamente mediante inmunodetección, aunque se detectó en algunas muestras tratadas con apMNKQ2 a las 24 h. Estos resultados indican que apMNKQ2 produce una alteración de proteínas del ciclo celular que podrían corresponder con una parada mitótica.

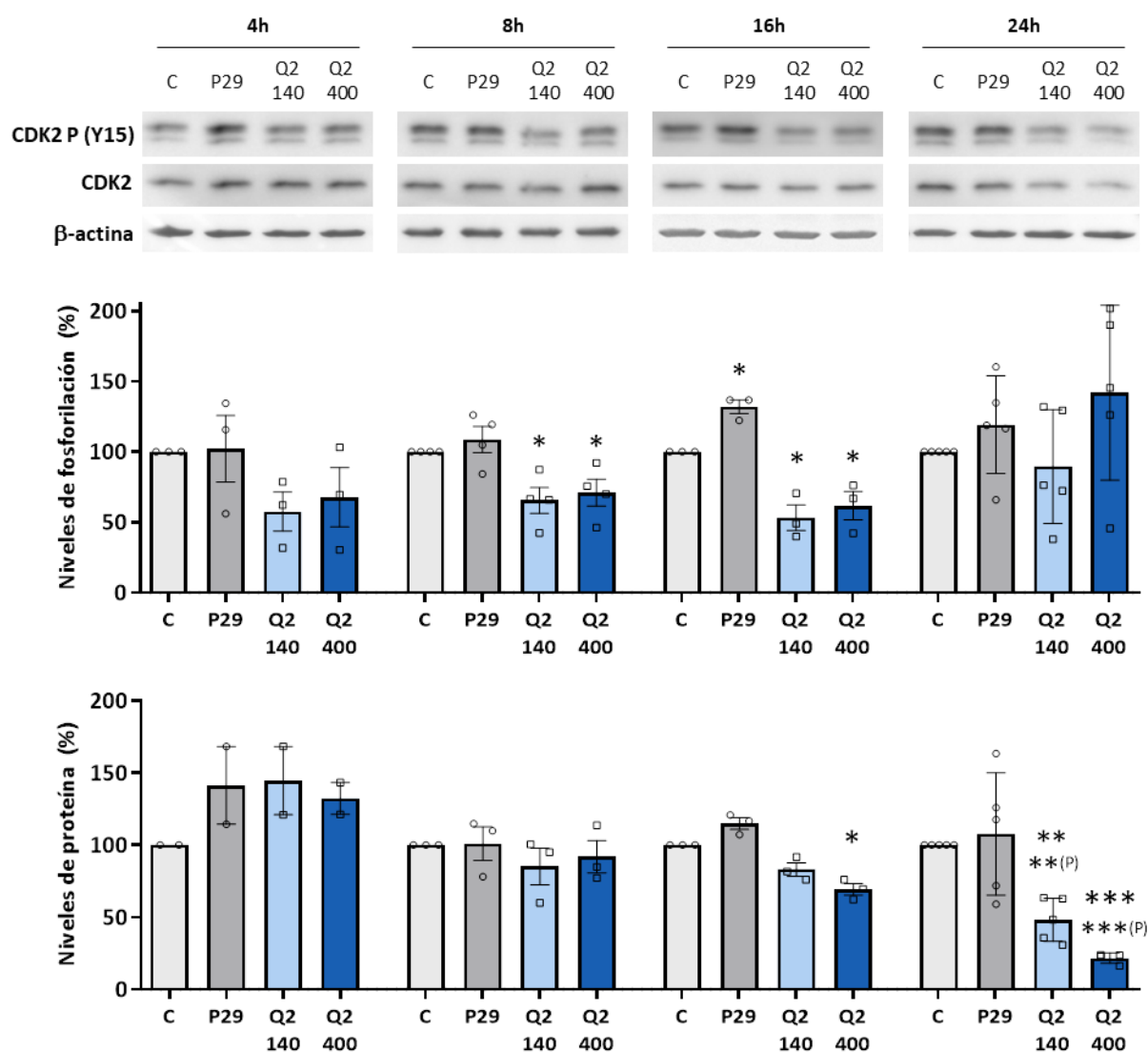


Figura 22. ApMNKQ2 reduce la fosforilación y expresión de CDK2. La fosforilación de CDK2 (Tyr15) y sus niveles de proteína se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes (140 y 400 nM) y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 4 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de CDK2, en el caso de la fosforilación en Tyr15 de CDK2, o frente a la expresión de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control, ***^(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

4.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la ruta de mTORC1 en presencia de everolimus

La actividad antitumoral de everolimus se ha demostrado en pacientes con cáncer de mama metastásico (376) y su uso está aprobado por la FDA para el tratamiento de varios tipos tumorales (11). Sin embargo, su eficacia se ve limitada por la generación de mecanismos de resistencia, entre los que se encuentran la activación de MNK. Con el objetivo de comprobar si la combinación de apMNKQ2 con everolimus potencia la inhibición de la viabilidad celular en líneas de cáncer de mama se realizaron ensayos MTT combinando ambos compuestos. En primer lugar, se determinó la viabilidad celular de cuatro líneas de mama diferentes en presencia de cantidades crecientes de everolimus (Figura 23A). Las líneas MCF7 y MDA-MB-468 son las más sensibles a everolimus, mientras que la viabilidad de las MDA-MB-231 y SUM159 se ve menos afectada en presencia del inhibidor, aunque en ninguna de las líneas se llega a alcanzar una IC50 para las concentraciones utilizadas. Por ello, en los ensayos de combinación de fármacos se utilizó una concentración con efecto máximo sobre la viabilidad (100 nM). De acuerdo a los índices de combinación (CI) calculados, la combinación de everolimus y apMNKQ2 tiene un efecto sinérgico ($CI < 0.9$) sobre la inhibición de la viabilidad celular en todas las líneas de cáncer de mama utilizadas y a distintas concentraciones de apMNKQ2 (Figura 23B).

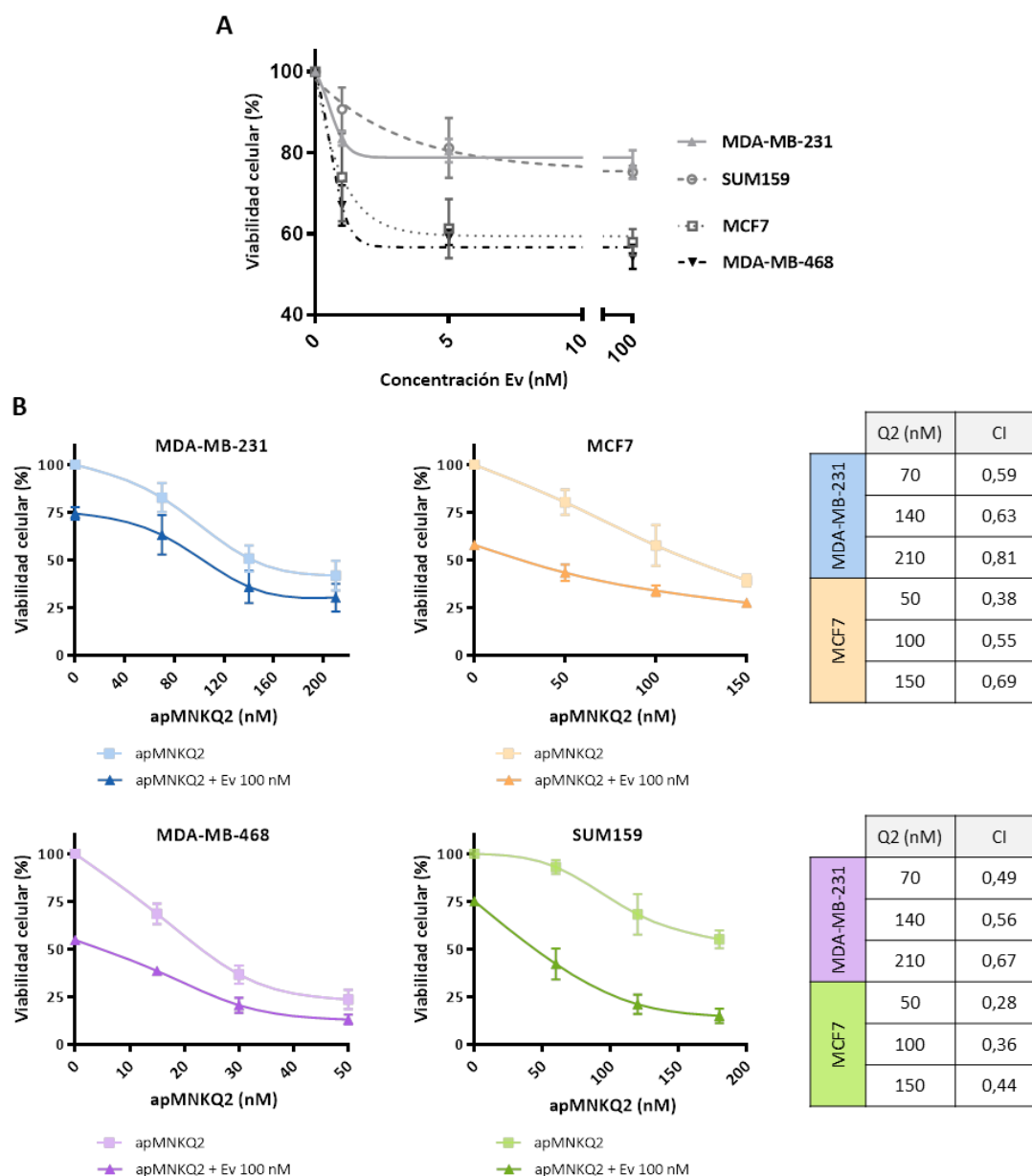


Figura 23. ApMNKQ2 y everolimus ejercen un efecto sinérgico sobre la viabilidad celular. (A) La viabilidad celular se determinó mediante ensayos MTT en cuatro líneas celulares de cáncer de mama tratadas con everolimus (Ev) y (B) en células transfectadas con apMNKQ2 a tres concentraciones diferentes tratadas con o sin everolimus (100 nM) durante 72 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 o 4 ensayos independientes realizados en triplicados en porcentaje respecto al control. En las tablas se muestran los índices de combinación (CI) para cada punto de la curva calculados mediante el método de Chou y Talalay (330) utilizando el programa CompuSyn (CI < 0.9 efecto sinérgico, CI = 0.9-1.1, efecto aditivo, CI > 1.1 efecto antagónico).

Los efectos de la combinación de apMNKQ2 y everolimus se estudiaron a nivel molecular en una línea resistente a everolimus (MDA-MB-231) (Figura 24A) y en otra más sensible (MCF7) (Figura 24B). La inhibición de mTORC1 se corroboró con la disminución de fosforilaciones sensibles a rapamicina en los sustratos 4EBP1 (Ser65) y p70S6K (Thr389) (377) y su sustrato S6 (Ser 235/236). La combinación con apMNKQ2 no incrementó en mayor medida la disminución de la fosforilación de p70S6K, 4EBP1 o S6 inducida por everolimus pero individualmente redujo la

fosforilación de S6 en ambas líneas celulares. El efecto de apMINKQ2 sobre los mecanismos de resistencia a everolimus se determinó a partir de los cambios en la fosforilación de AKT (Ser473) y de eIF4E (Ser209). En ambas proteínas se produce un incremento de la fosforilación con everolimus, que disminuye significativamente al incluir apMINKQ2 en el tratamiento en las dos líneas. Curiosamente se produce un incremento leve pero significativo en la fosforilación de AKT en las MDA-MB-231.

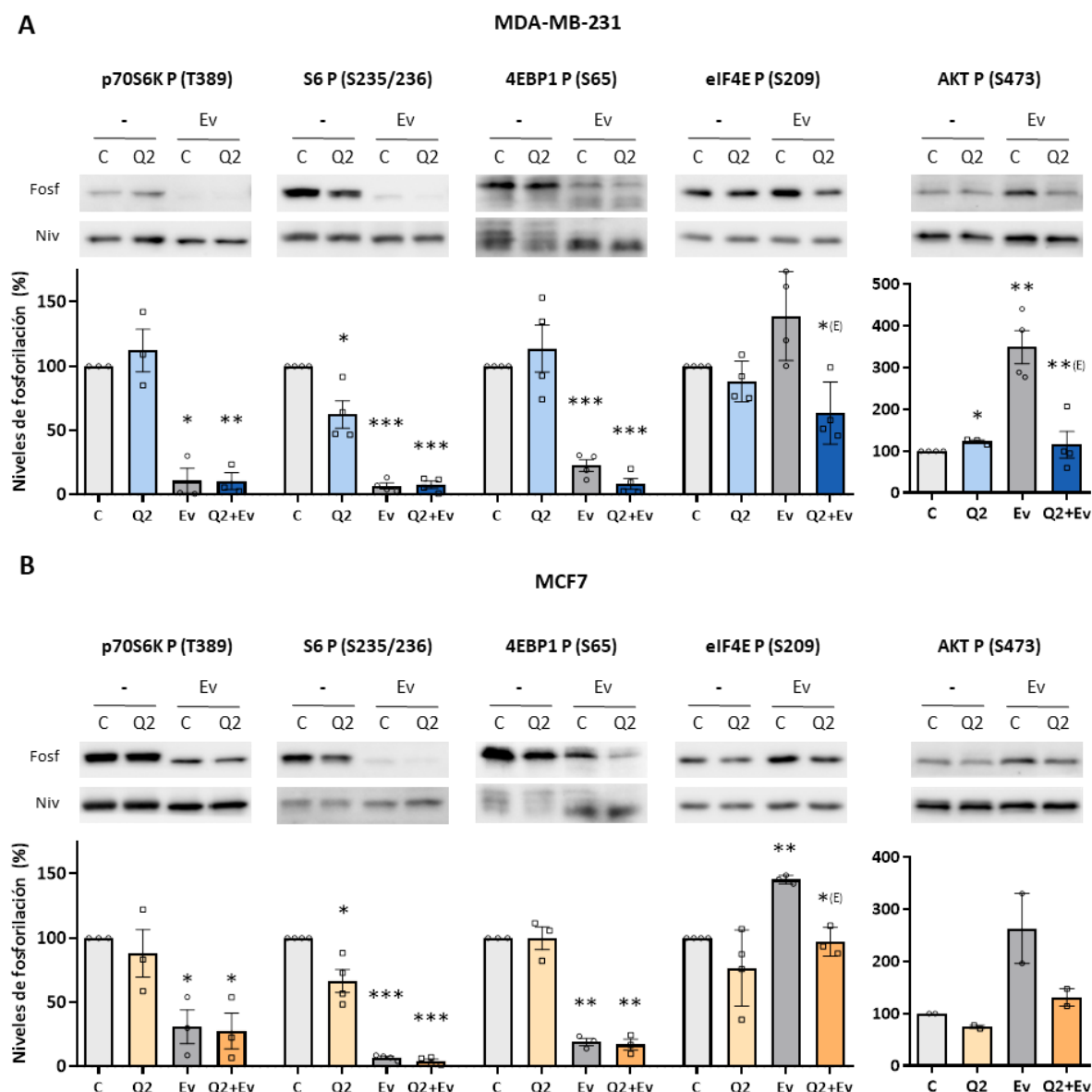


Figura 24. Estado de fosforilación de sustratos de mTORC1 y proteínas relacionadas con resistencia a la inhibición de mTORC1. La fosforilación de 4EBP1 (Ser65), p70S6K (Thr389), S6 (Ser 235/236), AKT (Ser473) y eIF4E (Ser209) se cuantificó mediante western blot respecto a los niveles totales de cada proteína en células MDA-MB-231 (**A**) y MCF7 (**B**) transfectadas con apMINKQ2 a 400 nM y 150 nM, respectivamente, y tratadas con everolimus 100 nM durante 24 h. Los gráficos de barras representan la media $\pm$ SEM de 3 o 4 ensayos independientes en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control, *(E) $p < 0.05$, *(E) $p < 0.01$, respecto a célula tratadas con everolimus).

En la línea MDA-MB-231 se analizaron los niveles de proteínas cuya traducción podría estar mediada por MNK de forma dependiente de IRES tras la inhibición de mTORC1, como la ciclina D1 o XIAP (Figura 25). La expresión de XIAP y ciclina D1 se ve incrementada en presencia de everolimus, lo que podría constituir otro mecanismo de resistencia al fármaco. La combinación de everolimus con apMNKQ2 bloquea el incremento de los niveles de XIAP de forma significativa y muestra una tendencia a disminuir los de ciclina D1.

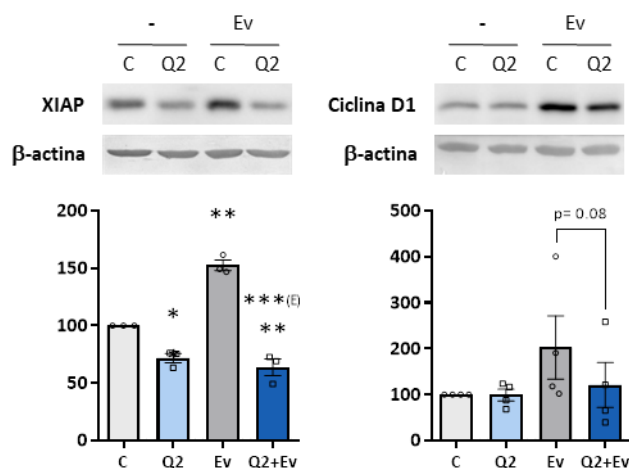


Figura 25. Expresión de proteínas pro-supervivencia (XIAP) y proliferación (ciclina D1) en presencia de everolimus y apMNKQ2. Inmunodetección en células MDA-MB-231 24 h después del tratamiento con apMNKQ2 y everolimus. Los gráficos de barras representan la media $\pm$ SEM de 3 o 4 ensayos independientes normalizados frente a β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control, ***^(E) $p < 0.001$, respecto a células tratadas con everolimus).

Por último, se determinó la asociación entre eIF4E y 4EBP1 en células tratadas con apMNKQ2 y everolimus mediante la purificación de eIF4E con el análogo de cap ⁷mGTP-sefarsa (Figura 26). En ambas líneas celulares se observa un incremento de la asociación entre eIF4E y 4EBP1 con everolimus, lo que concuerda con un estado menos fosforilado de 4EBP1. El tratamiento combinado con apMNKQ2 potencia la unión entre eIF4E y 4EBP1, que también se encuentra incrementada, aunque de forma más leve, con la transfección individual del aptámero.

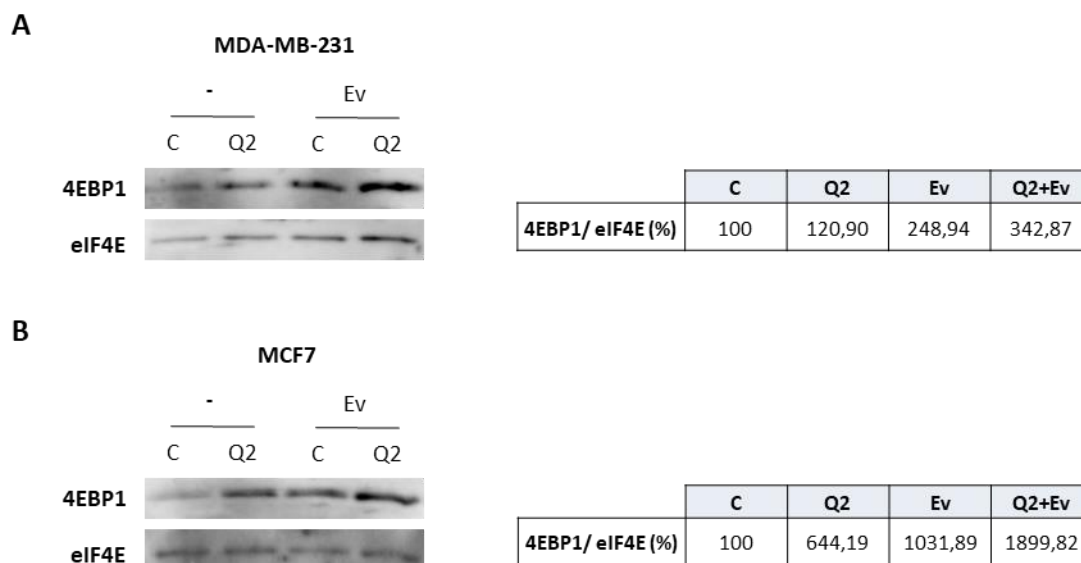


Figura 26. ApMNKQ2 y everolimus incrementan la formación de complejos 4EBP1-eIF4E. Los complejos eIF4E/4EBP1 se purificaron con m⁷GTP-sefarosa en lisados de células MDA-MB-231 (A) y MCF7 (B) transfectadas con apMNKQ2 y tratadas con everolimus durante 24 h y se analizaron por SDS-PAGE y western blot. En la imagen se muestra un ensayo representativo de los complejos eIF4E/4EBP1 en ambas líneas y los porcentajes de asociación eIF4E-4EBP1 en un conjunto de cuatro ensayos diferentes.

Puesto que la actividad de mTORC1 se encuentra directamente regulada por MNK (164) y la fosforilación de eIF4E no interfiere en la interacción con 4EBP1 (47), apMNKQ2 podría estar afectando a otras fosforilaciones de 4EBP1. La fosforilación de 4EBP1 en las Thr37/46 en presencia de apMNKQ2 se cuantificó a distintos tiempos. No se observaron cambios significativos, aunque si existe una tendencia a la disminución de la fosforilación para la concentración más alta de apMNKQ2 a 16 y 24 h (Figura 27A), lo que indica que apMNKQ2 no afecta significativamente a ninguno de los sustratos de mTORC1 estudiados. Además, la disminución de la fosforilación de S6 con apMNKQ2 se ve limitada a las 24 h (Figura 27B) y no coincide con una afectación de la fosforilación de p70S6K (Figura 24), por lo que apMNKQ2 probablemente esté afectando a otras quinasas que participan en la fosforilación de la Ser235/236 en un mecanismo independiente de mTORC1, como las proteínas quinasa A, C y G (PKA, PKC, PKG) o las RSKs, las cuales están reguladas por las MAPKs (378).

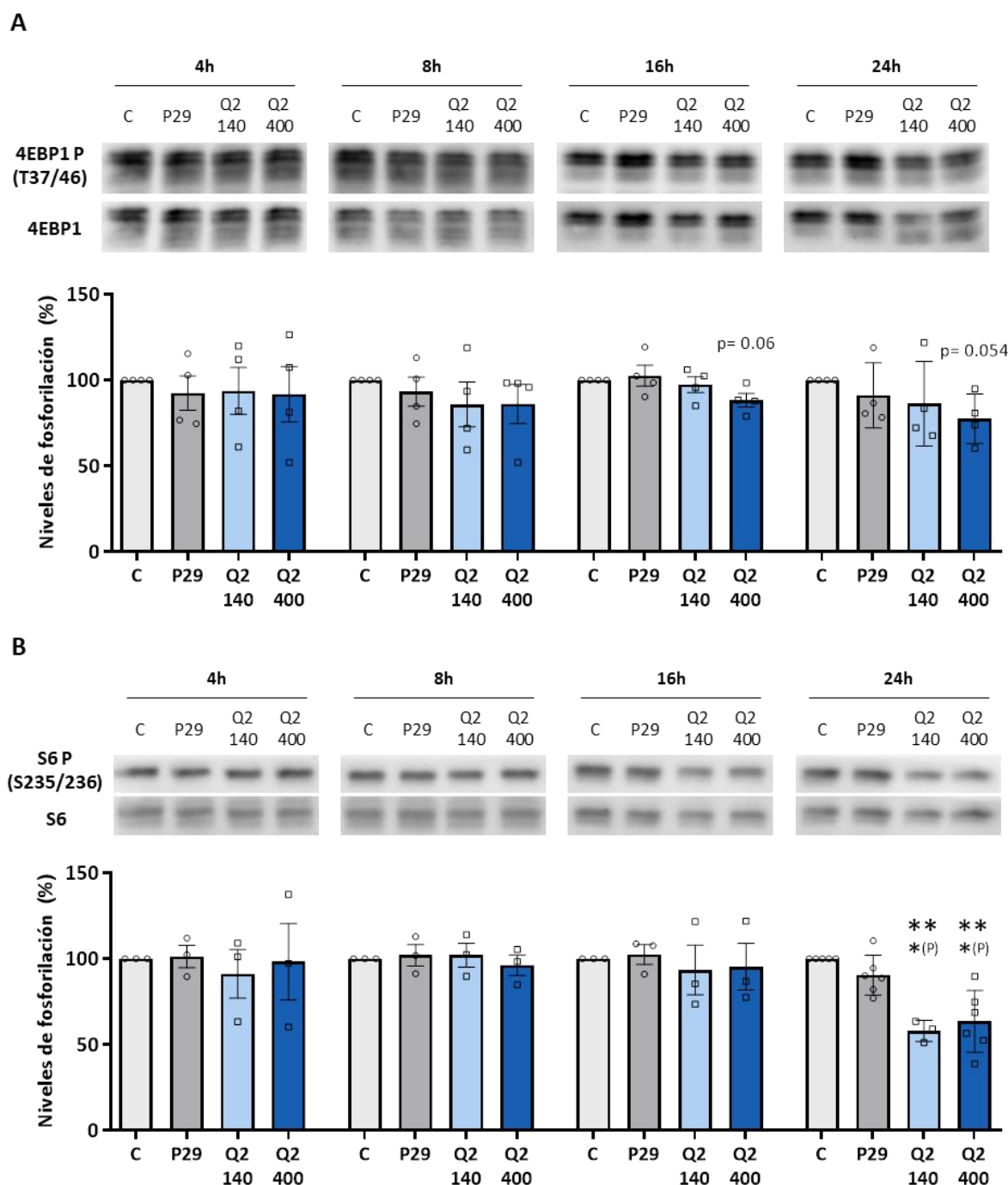


Figura 27. ApMNKQ2 no afecta a la fosforilación de 4EBP1. (A). Cinética de la fosforilación en las Thr37/46 de 4EBP1 y las Ser235/236 de S6 en células MDA-MB-231 lisadas 4, 8, 16 y 24 h después de la transfección con apMNKQ2. Los gráficos de barras representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 4 ensayos independientes en porcentaje respecto al control (** $p < 0.01$, respecto al control, $^{(P)}$ $p < 0.05$, respecto a células transfectadas con P29).

El efecto de apMNKQ2 sobre la interacción directa entre mTORC1 y MNK se trató de estudiar mediante distintas estrategias basadas en la inmunoprecipitación de mTOR y de MNK1b y MNK1a sobreexpresadas. Los ensayos se realizaron de acuerdo al protocolo publicado por Brown y Gromeier (164) en las líneas MDA-MB-231, MCF7 y HEK293T, aunque en ninguno de los casos

se logró observar dicha interacción. Por tanto, los estudios realizados hasta el momento no permiten demostrar una modulación directa de la actividad de mTORC1 por parte de apMNKQ2.

5. Estudio del efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad metastásica de células de mama

5.1. Efecto de apMNKQ2 sobre la transición epitelio mesénquima (EMT) inducida por TGF β

El TGF β es uno de los principales inductores de la EMT (271) y su ruta de señalización se encuentra interconectada con MNK a varios niveles (69,125). La inducción de la EMT se caracteriza a nivel molecular por una disminución de marcadores epiteliales y un incremento de marcadores mesenquimales y de los factores de transcripción EMT, que dan lugar a una serie de cambios en la estructura celular que potencian la capacidad de migración e invasión (Figura 28A) (267). El efecto de apMNKQ2 sobre la EMT inducida por este morfógeno se evaluó a nivel de las capacidades de migración e invasión y expresión de marcadores EMT en un modelo basado en el tratamiento continuado de la línea inmortalizada no tumoral de células epiteliales mamaria humana MCF10A con TGF β . En el caso de las MCF10A, la transformación hacia el fenotipo mesenquimal es completa e irreversible a los 6-7 días de tratamiento con TGF β (332,379,380), pero múltiples estudios señalan que los cambios en los EMT-TFs y algunos marcadores son apreciables en este modelo desde las primeras 24-48 h (380–382).

En primer lugar, se comprobó la transición hacia el fenotipo mesenquimal tras la incubación con TGF β a dos tiempos a nivel morfológico (Figura 28B) y de expresión de los marcadores EMT (Figura 28C). A los 3 días se observó un incremento claro de los factores de transcripción ZEB1, Snail y Slug, que se atenúa a los 6 días, mientras que los cambios en la expresión de los marcadores vimentina, E-cadherina y N-cadherina son más pronunciados a los 6 días. Respecto a su morfología, las células sin tratar muestran características típicas de células epiteliales; tienen un aspecto redondeado y se encuentran formando una monocapa con estrechas interacciones entre sí. Tras la inducción de la EMT, las células MCF10A adquieren una morfología alargada que se aprecia de forma evidente pasados los 3 días. Estas observaciones confirman que TGF β induce la EMT en la línea MCF10A.

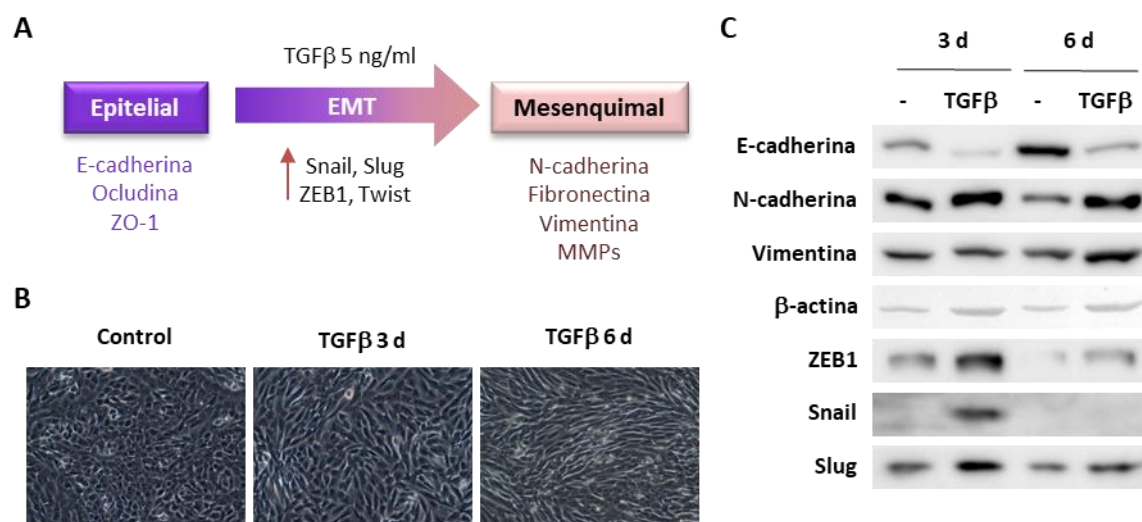


Figura 28. Modelo de inducción de EMT por TGFβ. (A) Representación esquemática de los cambios moleculares durante la EMT. (B) Imágenes representativas de los cambios morfológicos de células MCF10A estimuladas con TGFβ durante 3 o 6 días adquiridas con microscopía de contraste de fase a 10x. (C) Inmunodetección representativa de los cambios en los marcadores mesenquimales y epiteliales y en los EMT-TF tras la estimulación con TGFβ a 3 y 6 días.

Para observar el efecto de apMNKQ2 sobre los factores de transcripción EMT y los marcadores E-cadherina y N-cadherina por inmunodetección, las células MCF10A se trataron simultáneamente con apMNKQ2 y TGFβ y se lisaron a las 24, 48 y 72 h (Figura 29A). Se obtuvieron resultados similares a los tres tiempos, con los cambios más destacables a las 48 h. No se determinaron los efectos sobre la vimentina, ya que no se observaron cambios en su expresión tras el tratamiento con TGFβ en los tiempos utilizados y como control de carga se utilizó GAPDH, dado que los niveles de β-actina se ven alterados con TGFβ (Figura 28C) (383). El aptámero apMNKQ2 produce una disminución significativa de los niveles de N-cadherina (Figura 29B), tanto en las MCF10A tratadas con TGFβ como en las no tratadas, y, sorprendentemente, también disminuye los niveles de E-cadherina (Figura 29C). Respecto a los EMT-TFs, apMNKQ2 disminuye la expresión de Slug (Figura 29D) y ZEB1 (Figura 29E) en células tratadas y no tratadas con TGFβ, pero aumenta los niveles de Snail, potenciando el incremento que tiene lugar con TGFβ (Figura 29F).

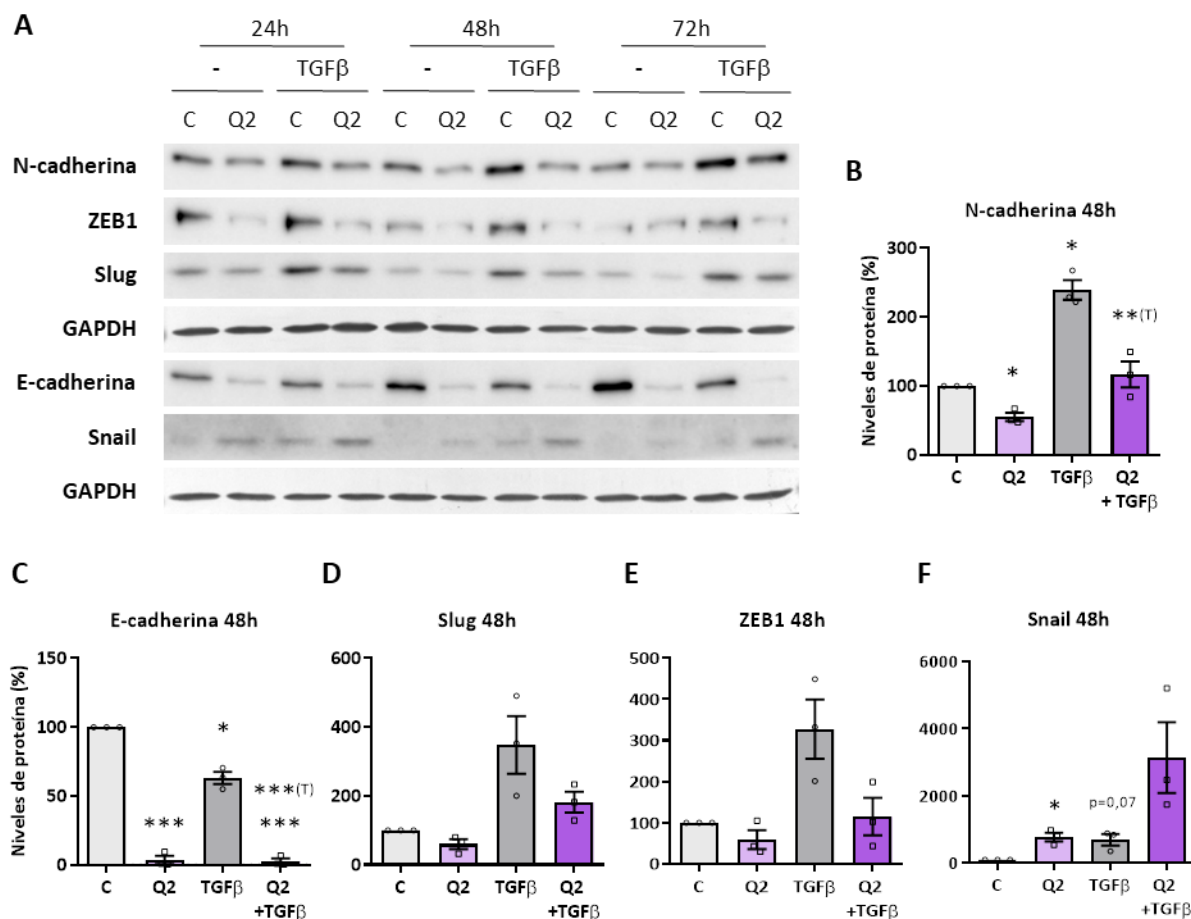


Figura 29. Niveles de marcadores EMT y EMT-TFs en presencia de apMKNKQ2 y TGFβ. (A) La expresión de marcadores EMT se analizó en lisados de células MCF10A tratadas con apMKNKQ2 (100 nM), TGFβ y la combinación de ambos a las 24, 48 y 72 h mediante western blot. Cuantificación de los niveles de N-cadherina (B), E-cadherina (C), Slug (D), ZEB1 (E), y Snail (F) a 48 h. (C) Las gráficas de barras representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes normalizados frente a GAPDH y representados en porcentaje frente al control de células sin tratar (* p < 0.05, *** p < 0.001 respecto al control, **^(T) p < 0.01, ***^(T) p < 0.001 respecto a células tratadas con TGFβ).

El análisis de los niveles de mRNA indica que las disminuciones de Slug y ZEB1 inducidas por apMKNKQ2 no tienen lugar a nivel transcripcional, mientras que el incremento de Snail sí podría estar produciéndose a este nivel, al igual que la disminución de la expresión de E-cadherina (Figura 30).

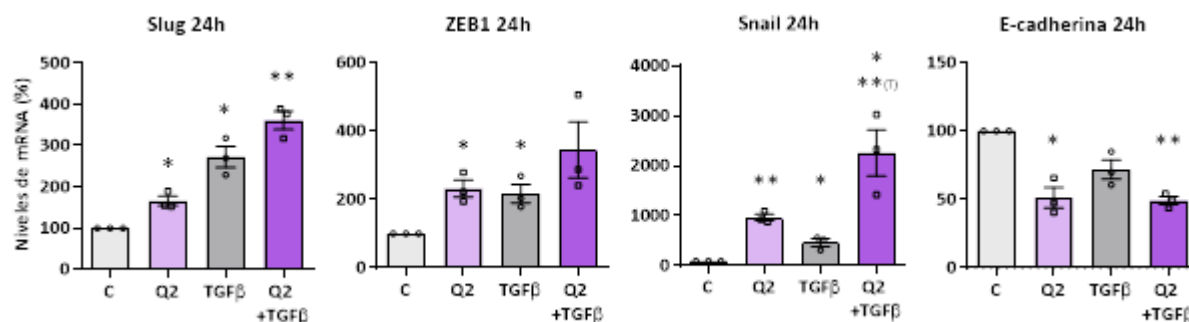


Figura 30. Expresión del mRNA de marcadores EMT y EMT-TFs en presencia de apMNKQ2 y TGFβ. La expresión de marcadores EMT se analizó en extracciones de RNA de células MCF10A tratadas con apMNKQ2 (100 nM), TGFβ y la combinación de ambos a las 24 h mediante qPCR. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes normalizados frente a GAPDH y representados en porcentaje frente al control de células sin tratar (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control, **^(T) $p < 0.01$, respecto a células tratadas con TGFβ).

El efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad migratoria e invasiva de las MCF10A tratadas con TGFβ se determinó mediante ensayos en el sistema Transwell a las 48 h, ya que las variaciones a nivel de los marcadores EMT y EMT-TFs se producen de forma más clara a este tiempo. Como se observa en las Figuras 31A y 31B, apMNKQ2 inhibe el incremento en la migración e invasión inducido por TGFβ sin afectar a las MCF10A que no fueron tratadas con TGFβ.

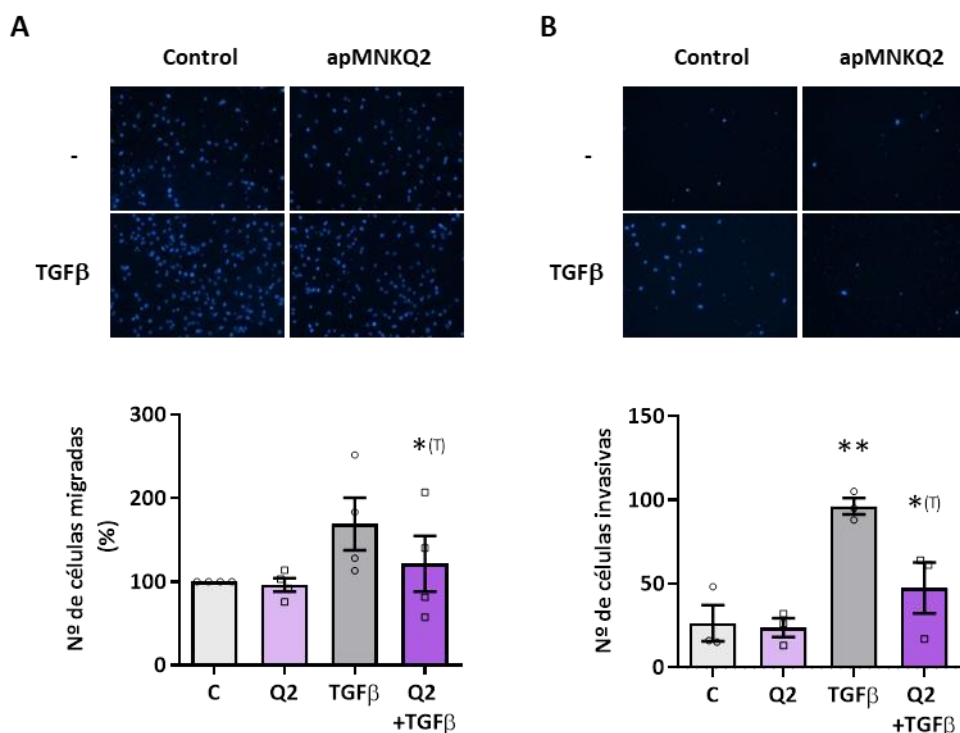


Figura 31. ApMNKQ2 modula la capacidad migratoria e invasiva inducida por TGFβ. Las células MCF10A se transfretaron con apMNKQ2 y se incubaron con TGFβ durante 48 h. Posteriormente se sembraron sobre la membrana semipermeable del soporte Transwell en ausencia de matrigel para evaluar la migración (A) o en presencia de matrigel a 0,5 mg/ml para evaluar la invasión (B). Las células que migraron o invadieron a través de la membrana tras 24 h se tiñeron con Hoechst, se visualizaron mediante microscopia de

fluorescencia (imágenes superiores en A y B) y se cuantificaron (gráficos de barras en A y B). Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 o 4 experimentos independientes en porcentaje frente al control **(A)** o en como el número total de células cuantificadas **(B)**. (** $p < 0.01$ respecto al control, $^{(T)}$ $p < 0.05$, respecto a células tratadas con TGF β).

La capacidad invasiva se ha relacionado con la expresión de MMPs que permiten la degradación de la matriz extracelular. La actividad de la MMP2 y MMP9 se evaluó mediante zimogramas a 24, 48 y 72 h (Figura 32), con resultados más pronunciados a las 48 h. La actividad de la MMP9 no se vio afectada en ninguna de las condiciones, a diferencia de la de MMP2, que se incrementa a partir de las 48 h con TGF β y se reduce en presencia de apMNKQ2, tanto en células tratadas con TGF β como en células no tratadas.

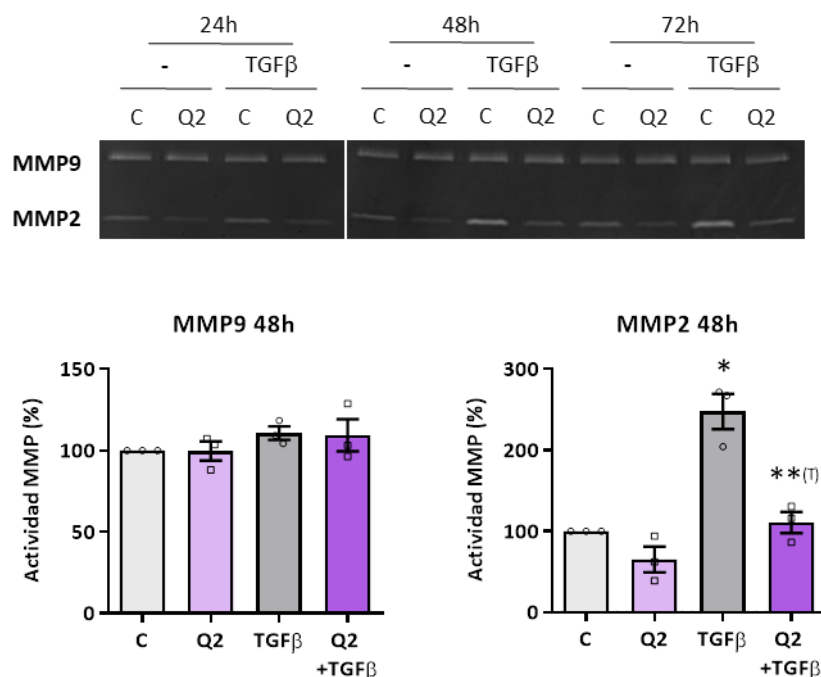


Figura 32. ApMNKQ2 reduce la actividad de la MMP2. La actividad de la MMP2 y MMP9 se evaluó por zimogramas a partir de los medios de incubación de las células MCF10 tratadas con apMNKQ2, TGF β y la combinación de ambos durante 24, 48 y 72 h. Las gráficas de barras representan la media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes normalizados frente al control de células sin tratar (* $p < 0.05$, respecto al control, $^{(T)}$ $p < 0.01$ respecto a células tratadas con TGF β).

5.2 Efecto de apMNKQ2 sobre marcadores EMT en la línea MDA-MB-231

ApMNKQ2 disminuye la capacidad de migración e invasión en líneas de cáncer de mama alterando la expresión de dos marcadores EMT: reduce FSP1, marcador mesenquimal, a nivel de mRNA, e incrementa ocludina, marcador epitelial, a nivel de mRNA y proteína (321). De forma complementaria, se determinó el efecto de apMNKQ2 en la línea MDA-MB-231 sobre los niveles de los marcadores EMT y EMT-TFs estudiados en la línea MCF10A. Los cambios observados a las 24 h tras la transfección con el aptámero fueron similares en ambas líneas. El aptámero apMNKQ2 disminuye los niveles de proteína de ZEB1 e incrementa Snail, sin afectar a Slug (Figura 33A), mientras que los niveles de mRNA de las tres proteínas se ven incrementados tras el tratamiento

con apMNKQ2 a las 24 h (Figura 33B). Los niveles de E-cadherina y N-cadherina no pudieron determinarse en esta línea celular debido a su baja expresión y la vimentina presentó una alta variabilidad entre ensayos.

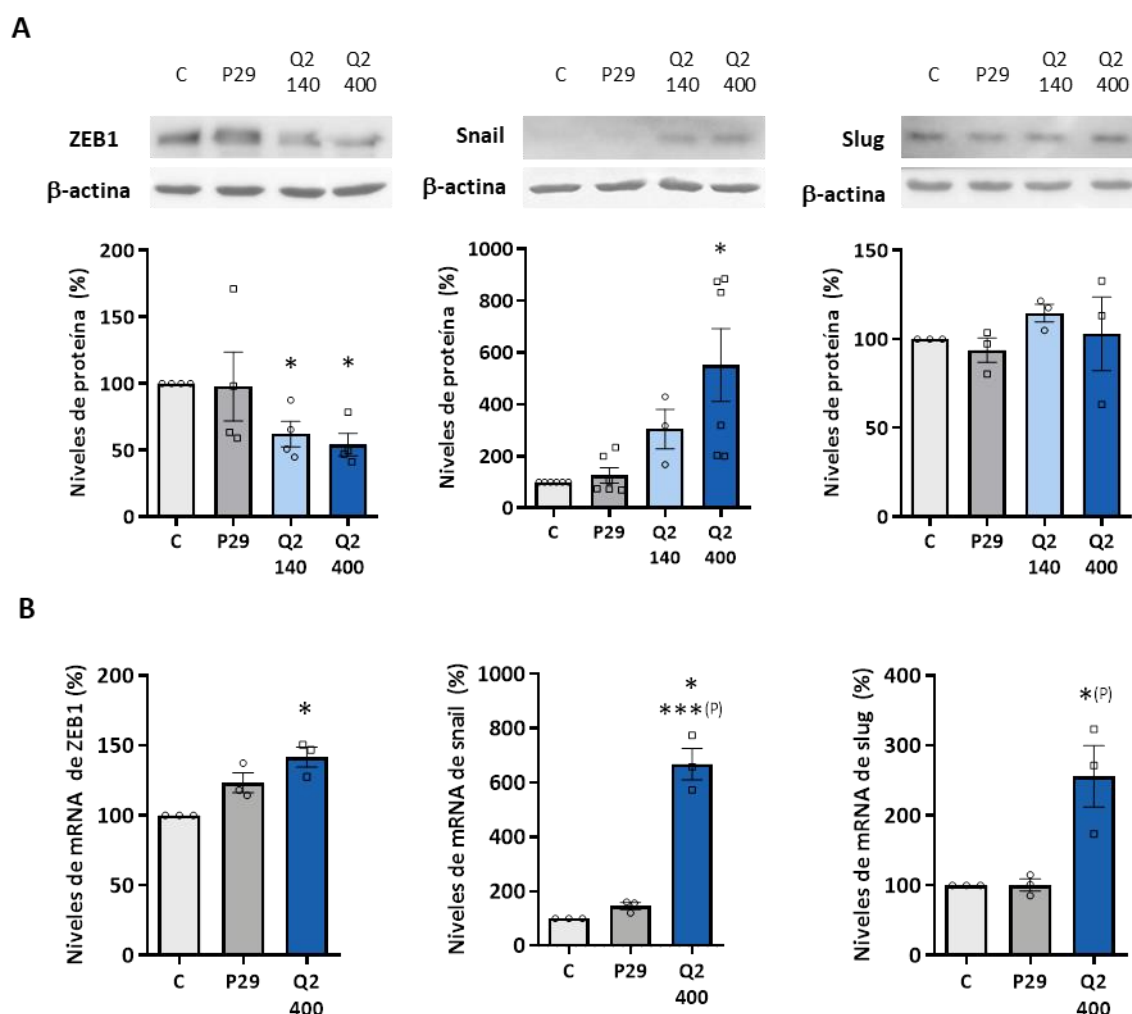


Figura 33. Niveles de marcadores EMT y EMT-TFs en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2. Los niveles de proteína de ZEB1, Snail y Slug se cuantificaron mediante western blot (**A**) y la expresión de su mRNA se determinó por qPCR (**B**) en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a 140 y 400 nM y lisadas a las 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 6 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (** $p < 0.01$, respecto al control, **^(P) $p < 0.01$, ***^(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

5.3 Efecto de apMNKQ2 sobre NDRG1 y su implicación en la migración celular

Las MNKs se han relacionado con la modulación de la actividad de diversas proteínas con un papel relevante en migración y metástasis, como NDRG1 (24). Para determinar la posible implicación de NDRG1 en el mecanismo de acción de apMNKQ2 se cuantificaron, en primer lugar, los cambios en su expresión y fosforilación en la Thr346 a distintos tiempos tras la transfección con el aptámero a 140 y 400 nM. Se observó un incremento significativo de la

fosforilación entre las 8 y las 24 h (Figura 34A), mientras que los niveles de NDRG1 se mantuvieron constantes a los tiempos estudiados (Figura 34B).

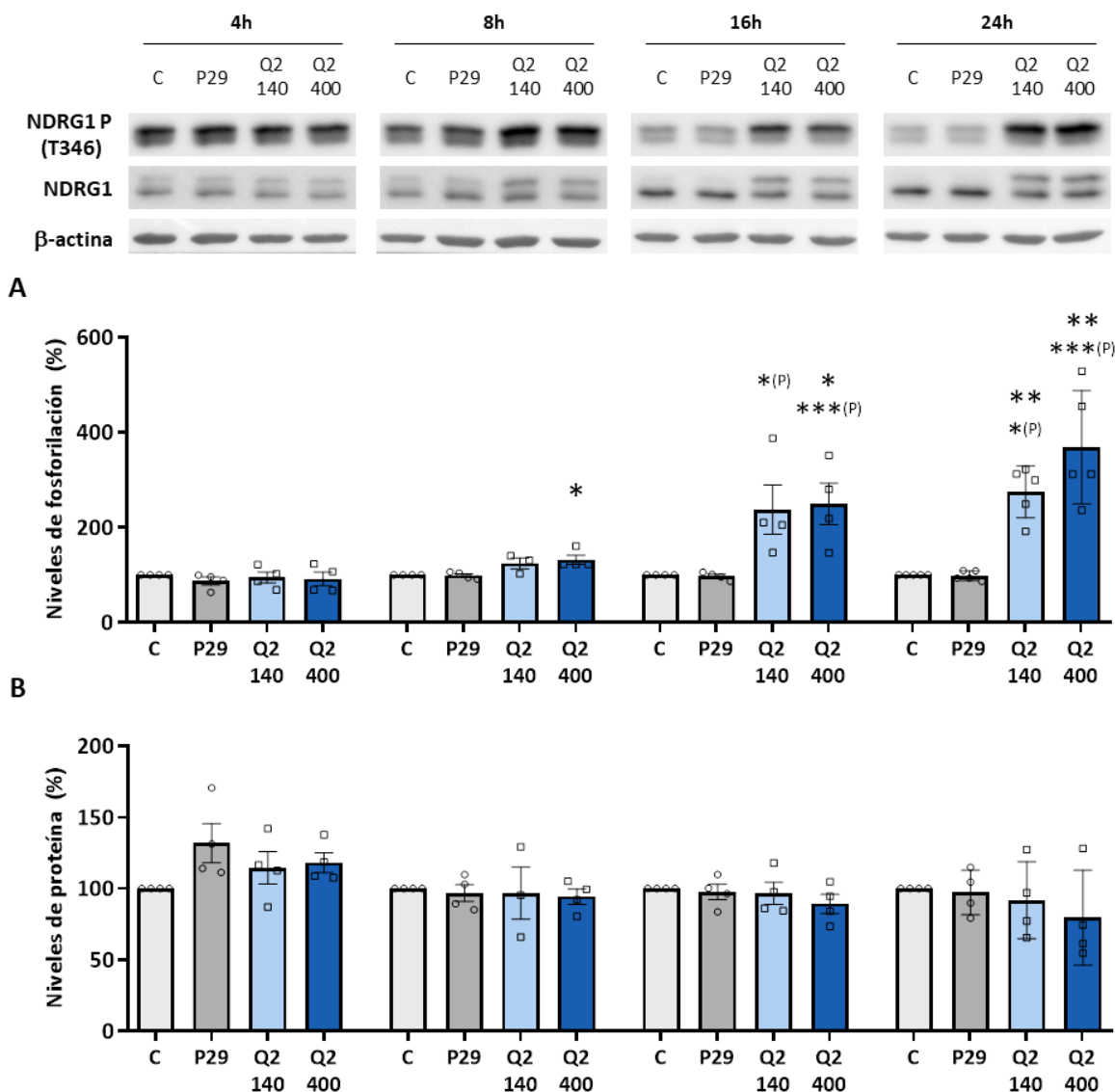


Figura 34. ApMNKQ2 incrementa la fosforilación de NDRG1 sin afectar a sus niveles. La fosforilación de NDRG1 (Thr346) (A) y sus niveles (B) se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a 140 y 400 nM y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 4 y 5 ensayos independientes normalizados frente a los niveles totales de NDRG1 o de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control, *(P) $p < 0.05$, ***(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

Los niveles de SGK1, quinasa encargada de fosforilar a NDRG1 en la Thr346 (384), se cuantificaron en las mismas condiciones tras la transfección con apMNKQ2. Coincidiendo con el incremento en la fosforilación de NDRG1, apMNKQ2 produce un aumento en la expresión de SGK1 a las 8 h que se mantiene hasta las 24 h (Figura 35A). El incremento en la expresión se produce también a nivel del mRNA a las 24 h (Figura 35B). Estos estudios sugieren que el incremento en la fosforilación de NDRG1 podría estar causado por un incremento en la expresión de SGK1.

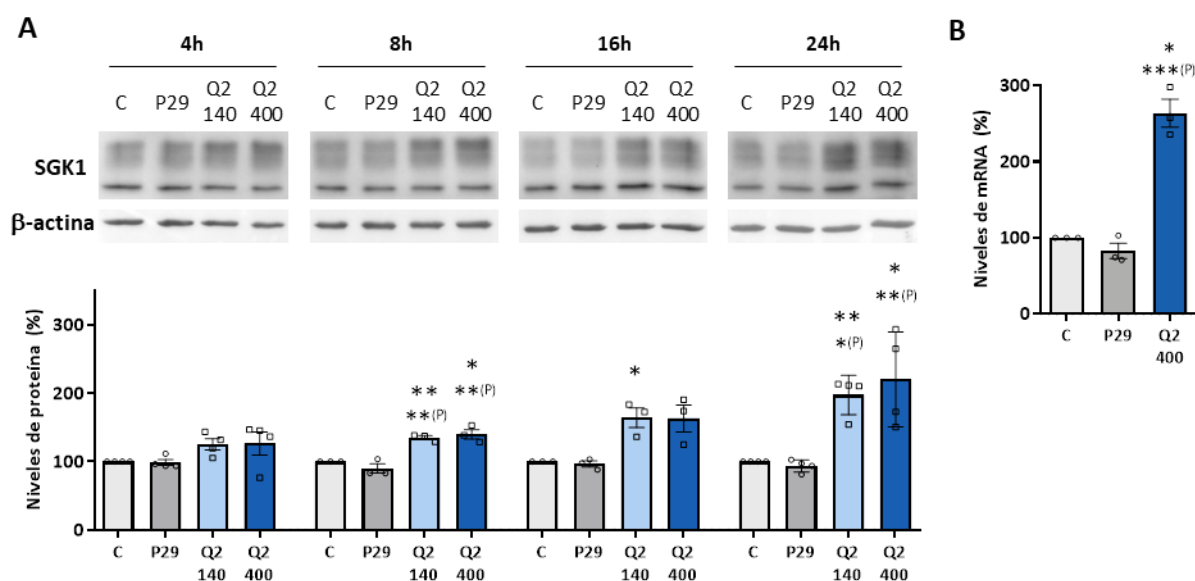


Figura 35. ApMNKQ2 incrementa los niveles de proteína y mRNA de SGK1. Los niveles SGK1 se cuantificaron mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a 140 y 400 nM y lisadas a las 4, 8, 16 y 24 h (A). A las 24 h se determinó la expresión del mRNA de SGK1 mediante qPCR en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 a 400 nM (B). Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 4 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control, *(P) $p < 0.05$, *(P) $p < 0.01$, *(P) $p < 0.001$, respecto a célula transfectadas con P29).

5.3.1. Modulación de la fosforilación de NDRG1 en presencia de apMNKQ2

La implicación de SGK1 y la fosforilación de NDRG1 en el mecanismo antitumoral de apMNKQ2 se estudió mediante dos estrategias: la inhibición de la actividad quinasa de SGK1/2 con GSK650394 (SGKi) (385) y la expresión transitoria de la forma mutada no fosforilable de NDRG1 T346A.

5.3.1.1. Inhibición de SGK1

En primer lugar, se determinó la capacidad de SGKi para bloquear el incremento de la fosforilación de NDRG1 que tiene lugar tras la transfección con apMNKQ2. Como se muestra en la Figura 36, SGKi reduce la fosforilación de NDRG1 en células sin transfectar y en células transfectadas con apMNKQ2 a dos concentraciones diferentes sin afectar a los niveles de SGK1, lo que demuestra que la actividad de esta quinasa está implicada en el efecto causado por apMNKQ2.

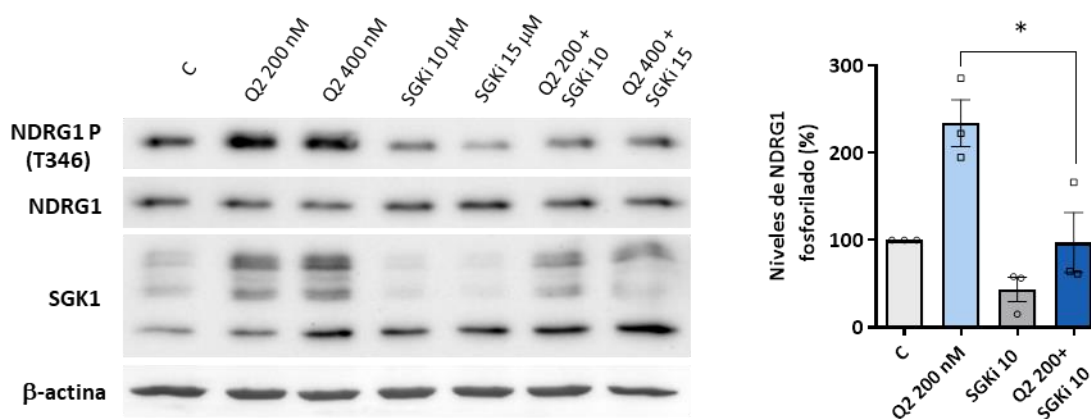


Figura 36. SGKi reduce la fosforilación de NDRG1 en presencia de apMNKQ2. La fosforilación de NDRG1 se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 (200 nM y 400 nM) y tratadas con SGKi (10 μ M y 15 μ M) durante 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes normalizados frente a los niveles totales de NDRG1 y expresados en porcentaje respecto al control (* $p < 0.05$, respecto a apMNKQ2 200 nM).

El inhibidor SGKi tiene un efecto inhibitorio leve sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 a las concentraciones usadas dentro de su rango de solubilidad (Figura 37A) y a 10 μ M no modifica la inhibición de la viabilidad causada por apMNKQ2 (Figura 37B), por lo que la actividad quinasa de SGK1 y la fosforilación de NDRG1 no estarían implicadas en los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de apMNKQ2.

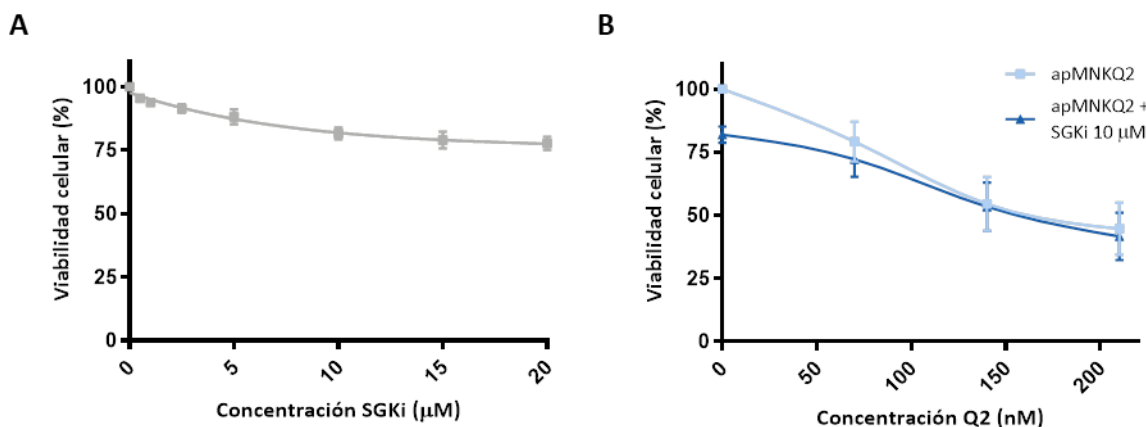


Figura 37. SGKi afecta levemente a la viabilidad celular. La viabilidad celular se determinó mediante ensayos MTT en células MDA-MB-231 tratadas durante 48 h con SGKi a diferentes concentraciones (A) o con la combinación apMNKQ2 y SGKi 10 μ M (B). Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 4 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control.

Respecto a las capacidades metastásicas, SGKi no afecta por sí solo a la migración de la línea MDA-MB-231 pero sí reduce levemente la inhibición de la migración que produce apMNKQ2 en ensayos de cierre de herida (Figura 38A). De forma similar, SGKi elimina la inhibición de la adhesión que ejerce apMNKQ2 (Figura 38B).

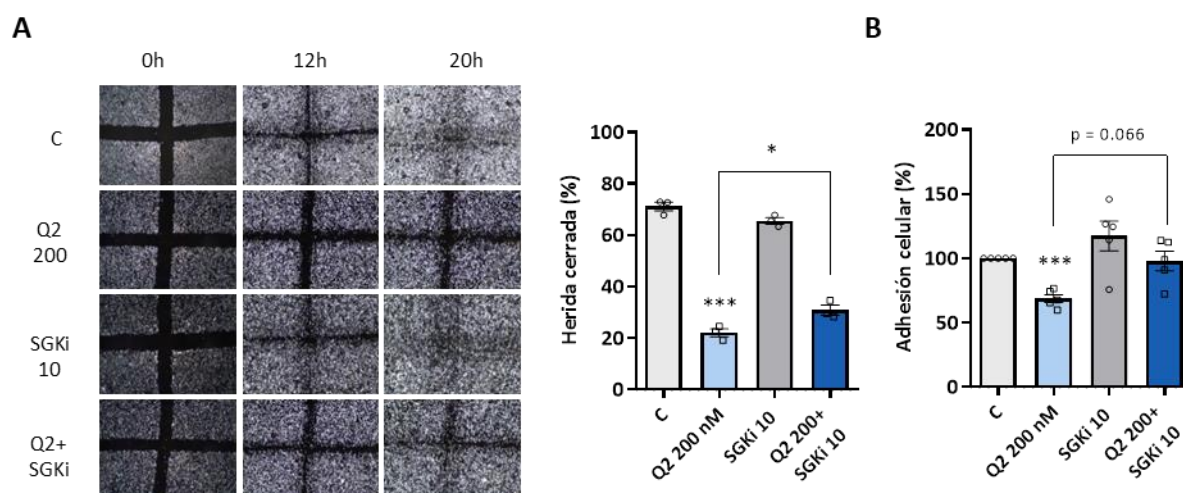


Figura 38. SGKi reduce los efectos inhibitorios de apMNKQ2 sobre la migración y la adhesión celular. La migración celular se evaluó mediante ensayos de cierre de herida realizados en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 y tratadas con SGKi 10 μ M durante 24 h, tomando fotos a 0h, 12 y 20 h tras la realización de la herida. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM del porcentaje de herida cerrada en 3 ensayos independientes a las 12 h (**A**). Los ensayos de adhesión celular se realizaron en placas tratadas con colágeno tipo I a 10 μ g/ml con células transfectadas con apMNKQ2 y tratadas con SGKi 10 μ M durante 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 5 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control (**B**) (***) $p < 0.001$, respecto al control, * $p < 0.05$, respecto a apMNKQ2 200 nM).

De forma cualitativa, se evaluó el efecto de SGKi y apMNKQ2 sobre la morfología celular y algunas proteínas estructurales del citoesqueleto, como los filamentos de F-actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios de vimentina mediante inmunocitoquímica y microscopía óptica y de fluorescencia. ApMNKQ2 produce cambios morfológicos en las células MDA-MB-231, que pasan de una estructura alargada a una circular (Figura 39A). De acuerdo con estos cambios morfológicos se produce una redistribución de los filamentos de actina, de vimentina y microtúbulos (Figura 39B). Estos cambios se han observado incluso a concentraciones que afectan levemente la viabilidad celular (70 nM), lo que sugiere que no son consecuencia de la inducción de apoptosis (datos no mostrados). Curiosamente, el tratamiento simultáneo de las células con apMNKQ2 y SGKi evita parcialmente la adquisición de estos cambios morfológicos y la reorganización del citoesqueleto inducida por apMNKQ2 (Figura 39A y 36B), lo que podría estar relacionado con la reducción de sus efectos antimigratorios.

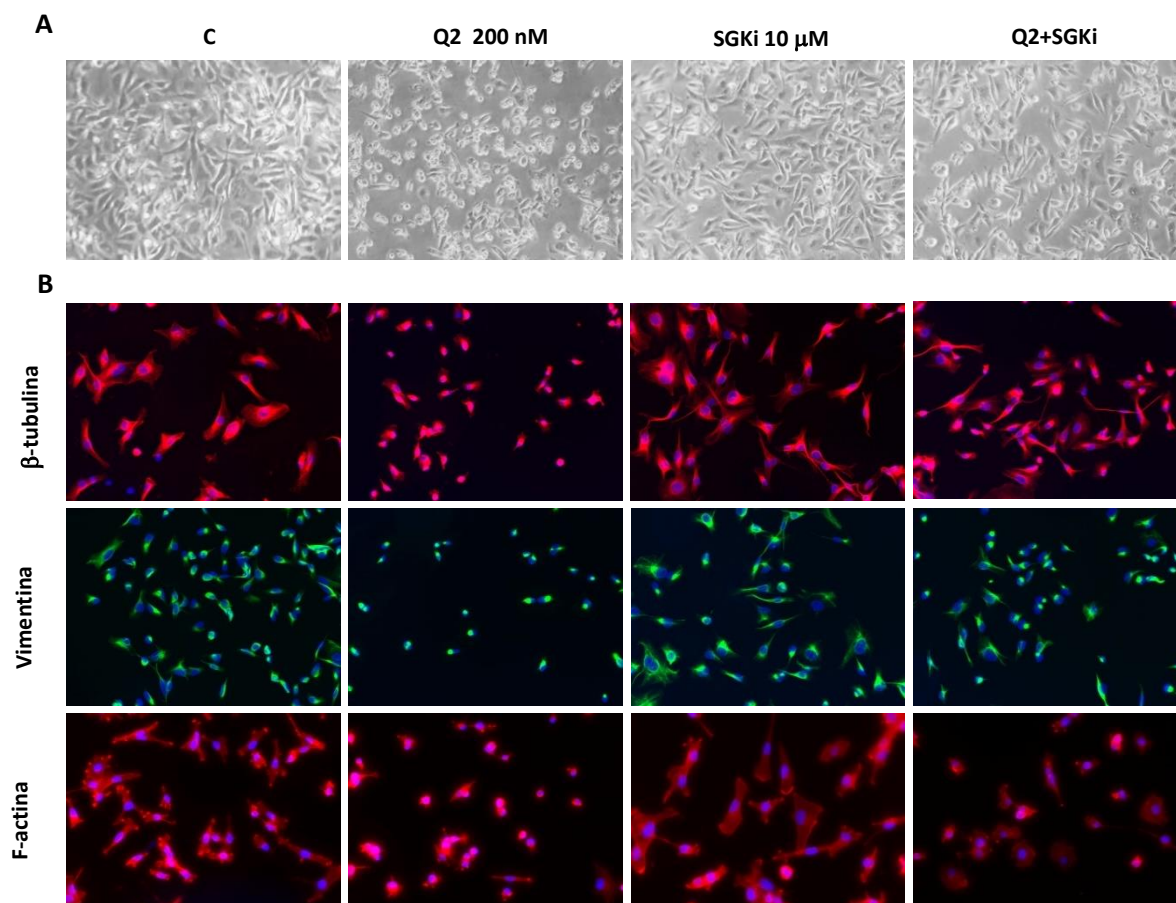


Figura 39. ApMNKQ2 produce cambios morfológicos y una reorganización del citoesqueleto que son parcialmente inhibidos por SGKi. Imágenes representativas de la morfología celular de células transfectadas con apMNKQ2 y tratadas con SGKi durante 24 h (A). Imágenes representativas de inmunocitoquímica de células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 y tratadas con SGKi durante 24 h. Las células se fijaron y los componentes del citoesqueleto se detectaron con anticuerpos frente a vimentina (verde) y β -tubulina (rojo) o mediante tinción con faloidina (rojo) para detectar F-actina y Hoechst (azul) para detectar núcleos (B).

5.3.1.2. Expresión transitoria de NDRG1 T346A.

Para determinar el papel de la fosforilación de NDRG1 en la Thr346 en el mecanismo de apMNKQ2, se expresó de forma transitoria la forma mutada no fosforilable en la Thr346 de NDRG1 (T346A) con un plásmido pCDNA3. Como control de la sobreexpresión se realizaron ensayos transfectando el plásmido con la forma *wild type* (NDRG1 WT) y para mimetizar el efecto de apMNKQ2, se incluyó la forma mutada NDRG1 T346D. Los plásmidos se co-transfectaron con apMNKQ2 a 70 y 140 nM, obteniéndose únicamente niveles adecuados de sobreexpresión a 70 nM.

En primer lugar, se comprobó la sobreexpresión de NDRG1 en células MDA-MB-231 y la ausencia de detección de la fosforilación en la Thr346 en las formas mutadas. Como se muestra en la Figura 40A, la señal de inmunodetección del anticuerpo fosfoespecífico de la Thr346 normalizada frente a β -actina es detectada con mayor intensidad en las muestras que sobreexpresan T346A respecto a la forma endógena de NDRG1 (células transfectadas con pCDNA3), lo que sugiere que el

anticuerpo tiene reactividad cruzada con otros residuos fosforilados de NDRG1, probablemente con las treoninas 356 y 366, dada la alta homología de estas regiones. Los niveles de fosforilación son más aproximados a los de NDRG1 endógeno en el caso de T346D (Figura 40A), por lo que el hecho de expresar esta mutación impide parcialmente que la forma sobreexpresada de NDRG1 se fosforile en los otros residuos detectados por el anticuerpo. En presencia de apMNKQ2 (70 nM) los niveles de sobreexpresión detectados son inferiores a los que muestran las células transfectadas sin aptámero (Figura 40B). Respecto a los niveles totales de NDRG1 (endógeno y sobreexpresado en conjunto), la proporción de NDRG1 fosforilado es menor para la forma WT en comparación con la forma endógena (Figura 40C), por lo que no todo el NDRG1 sobreexpresado se fosforila en la misma proporción que el endógeno. La transfección con apMNKQ2 produce un incremento de entre 2.5 y 3 veces de la fosforilación de NDRG1 sobreexpresado y endógeno a pesar de las mutaciones en la Thr346 (Figura 40C). Estos resultados indican que el incremento de la fosforilación inducido por apMNKQ2 podría producirse también en las treoninas 356 y 366, también descritas como residuos fosforilables por SGK1 (384).

En ensayos de herida, las mutaciones en la Thr346 no afectan a la capacidad de migración en presencia o ausencia de apMNKQ2 (Figura 40C), lo que sugiere que, individualmente, este residuo no tiene relevancia en los procesos de migración y en el efecto de apMNKQ2. La ausencia de fosforilación en este residuo aparentemente promueve la fosforilación de otros residuos detectados por el anticuerpo, por lo que, a pesar de la mutación, se mantiene parcialmente el estado fosforilado de NDRG1, lo que limita el estudio de su implicación en los procesos de migración.

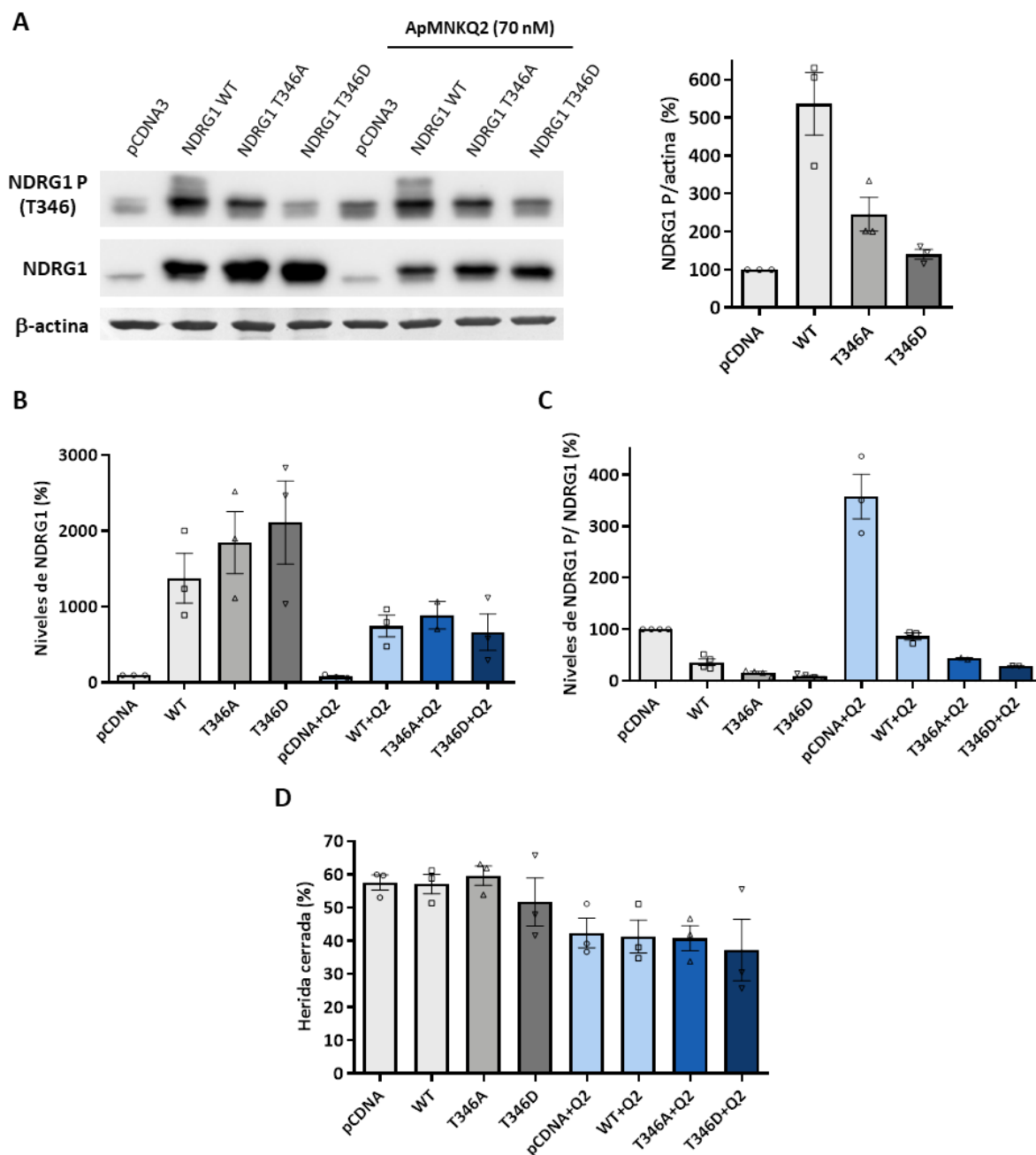


Figura 40. Inmunodetección de NDRG1 y su fosforilación en las formas WT mutadas T346A y 346E. La sobreexpresión transitoria de NDRG1 WT, T346A y T346E (A, B) y su estado de fosforilación (A, C) se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con los plásmidos individualmente (1 µg por pocillo de p6) y co-transfectadas con los plásmidos y apMNKQ2 a 70 nM durante 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control. La migración celular se evaluó en ensayos de herida realizados 24 h después de la co-transfección de los plásmidos y apMNKQ2 (70 nM), tomando fotos a 0h y 12 h tras la realización de la herida (D). Las gráficas representan la media $\pm$ SEM del porcentaje de herida cerrada en 3 ensayos independientes.

6. Estudio de las -ómicas en células de mama tratadas con apMNKQ2

6.1. Estudio del proteoma: análisis de los niveles de expresión diferencial de proteínas en células tratadas con apMNKQ2 por técnicas proteómicas

Los cambios en el perfil de expresión de proteínas en células MDA-MB-231 transfectadas con apMNKQ2 durante 24 h respecto al control de células transfectadas con lipofectamina se determinaron mediante 2D-DIGE. Las intensidades de fluorescencia de Cy3 y Cy5 se digitalizaron (Figura 41A) y las diferencias en el marcaje observado, correspondientes a cambios en los niveles de expresión de proteínas, fueron cuantificadas para cada *spot* mediante análisis de variación biológica (BVA). Los *spots* con la misma intensidad para Cy5 y Cy3 se representan en amarillo en la Figura 41B y se corresponden con unos niveles de expresión similares entre las condiciones analizadas (control y apMNKQ2), mientras que los *spots* de proteínas con niveles de expresión diferencial entre ambas condiciones presentan cambios en el ratio de fluorescencia, de manera que *spots* con mayor marcaje Cy3 aparecen en verde y aquellos con mayor señal Cy5, en rojo. Se observó una variación en el ratio de fluorescencia de 22 *spots*. Estos 22 *spots* se corresponden con 22 proteínas que muestran niveles de expresión diferencial en células tratadas con apMNKQ2, y fueron seleccionados para su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Entre los 22 *spots* se detectaron incrementos en los niveles 16 proteínas (eEF2, STIP1/G6PD, Albúminas bovinas, CCT8/CCT5, hnRNPK, PGAM1, PSMB2, Prdx6, RIOK2, Anexina A5, Anexina A2, cofilina, GLO1) y disminuciones en 6 proteínas (eEF2, talina1, γ actina, CCT2, PGAM1, estatmina) respecto al control.

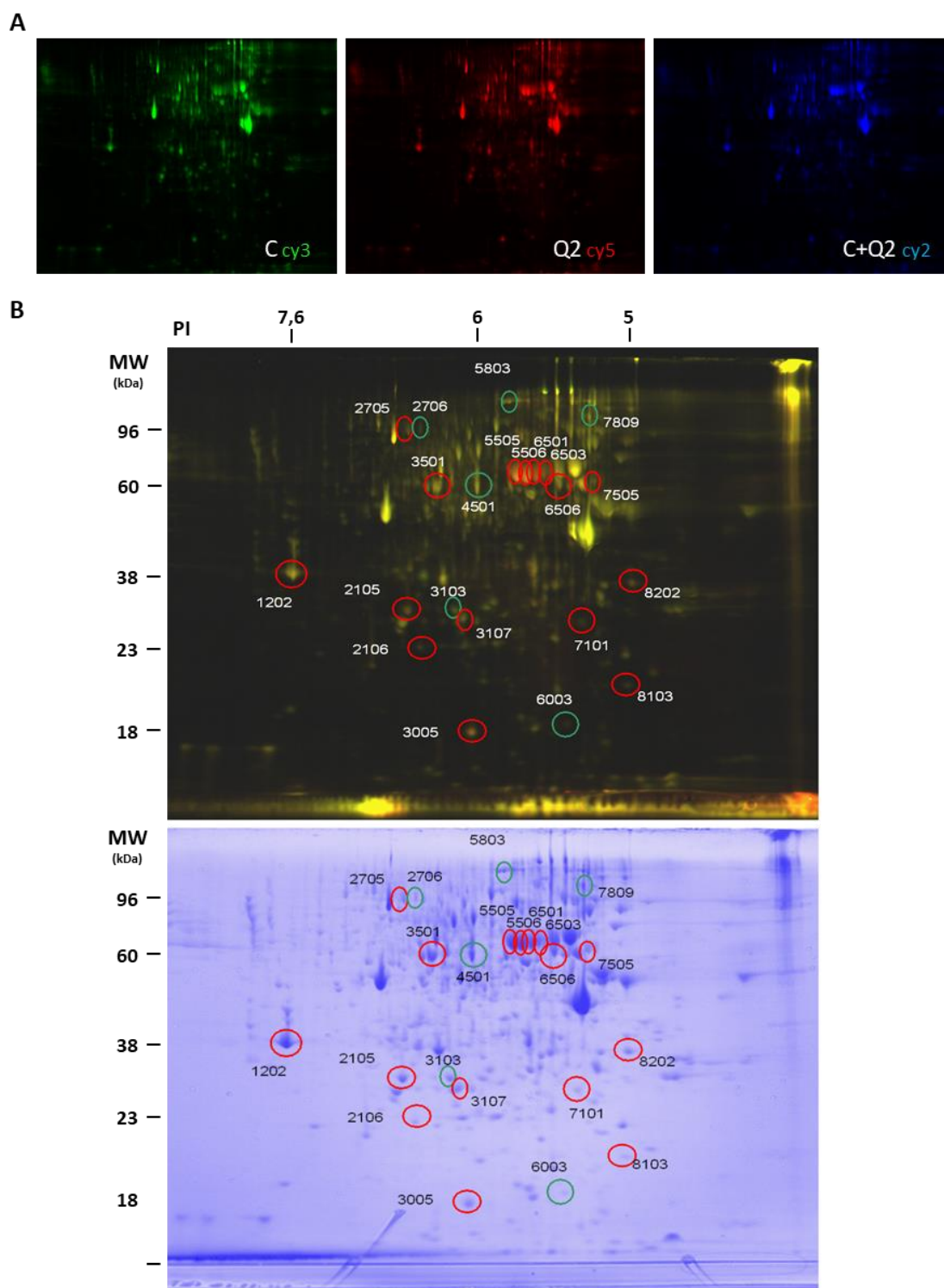


Figura 41. Expresión diferencial de los niveles de proteínas entre células tratadas con apMINKQ2 y células control. Imágenes representativas de un gel 2D-DIGE con marcaje Cy3 (Control transfectado con lipofectamina), Cy5 (apMINKQ2 400 nM), Cy2 (control interno) (**A**) y de la superposición de las señales Cy3 y Cy5 y su respectiva tinción con azul de Coomassie (**B**), sobre los que aparecen redondeados los spots que mostraron diferencias en el ratio de fluorescencia; en rojo aquellos que mostraron un incremento de la señal Cy5 y en verde aquellos en los que se detectó un incremento en Cy3. En la parte superior de la imagen, en horizontal, se representa la escala de PI y en vertical, la escala de peso molecular (MW).

En la Tabla 6 se recoge la identificación de las proteínas contenidas en los spots que mostraron diferencias entre las dos condiciones experimentales y en la Figura 42 la variación de la expresión de dichas proteínas de acuerdo a su marcaje de fluorescencia en la 2D-DIGE.

Tabla 6. Identificación de proteínas moduladas por apMNKQ2. En la primera columna se muestra el número identificativo de cada spot seguido del nombre completo de la proteína y gen, el número de acceso en Uniprot, la masa molecular y el punto isoelectrónico teóricos, el *score* de la identificación ($p < 0.05$ para un valor > 50) y el porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína identificada.

Spot	Identificación	Acceso Uniprot	Masa teórica (Da)	PI teórico	Score	Cobertura (%)
2705	Factor de elongación 2 (EEF2), <i>Homo sapiens</i>	P13639	96246	6,41	184	28
2706	Factor de elongación 2 (EEF2), <i>Homo sapiens</i>	P13639	96246	6,41	203	27
5803	Talina-1 (TLN1), <i>Homo sapiens</i>	Q9Y490	271766	5,77	576	31
7809	Actina citoplasmática 2 (ACTG1), <i>Homo sapiens</i>	P63261	42108	5,31	122	33
3501	Fosfoproteína inducida por estrés 1 (STIP1), <i>Homo sapiens</i>	P31948	63227	6,40	121	33
	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), <i>Homo sapiens</i>	P11413	59675	6,39	120	27
4501	Subunidad beta de la proteína 1 del complejo T (CCT2), <i>Homo sapiens</i>	P78371	57794	6,01	185	40
5505	Albumina (ALB), <i>Bos taurus</i>	P02769	71244	5,82	134	39
5506	Albumina (ALB), <i>Bos taurus</i>	P02769	71244	5,82	249	48
6501	Albumina (ALB), <i>Bos taurus</i>	P02769	71244	5,82	238	49
6503	Albumina (ALB), <i>Bos taurus</i>	P02769	71244	5,82	143	39
6506	Subunidad theta de la proteína 1 del complejo T (CCT8), <i>Homo sapiens</i>	P50990	60153	5,42	153	37
	Subunidad épsilon de la proteína 1 del complejo T (CCT5), <i>Homo sapiens</i>	P48643	60089	5,45	85	27
7505	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (HNRNPK), <i>Homo sapiens</i>	P61978	51230	5,39	96	30
1202	Anexina A2 (ANXA2), <i>Homo sapiens</i>	P07355	38808	7,57	121	41
2105	Fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), <i>Homo sapiens</i>	P18669	28900	6,67	181	66
2106	Subunidad beta del proteasoma (PSMB2), <i>Homo sapiens</i>	P49721	22993	6,51	118	40
3103	Fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), <i>Homo sapiens</i>	P18669	28900	6,67	93	53
3107	Peroxirredoxina-6 (PRDX6), <i>Homo sapiens</i>	P30041	25133	6,00	97	35
7101	Serina/treonina-proteína quinasa RIO2 (RIOK2), <i>Homo sapiens</i>	Q9BVS4	63699	5,66	64	16
8202	Anexina A5 (ANXA5), <i>Homo sapiens</i>	P08758	35971	4,94	216	47
3005	Cofilina-1 (CFL1), <i>Homo sapiens</i>	P23528	18719	8,22	116	53
6003	Estatmina (STMN1), <i>Homo sapiens</i>	P16949	17292	5,76	87	47
8103	Lactoilglutation liasa/Glyoxalasa I (GLO1), <i>Homo sapiens</i>	Q04760	20992	5,12	58	21

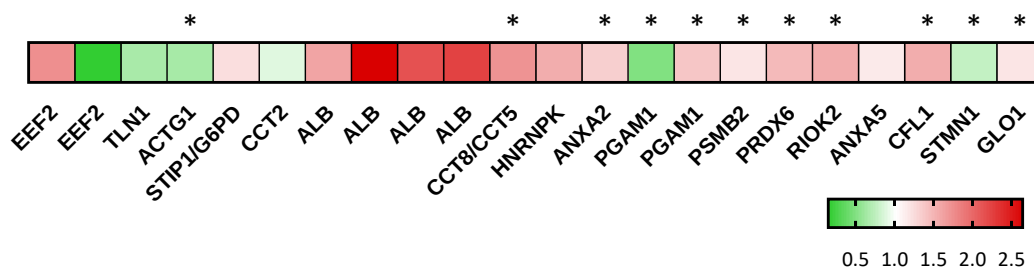


Figura 42. Variación de la expresión de proteínas 24 h tras la transfección con apMNKQ2. La escala de colores indica el ratio de variación respecto a la condición control, mostrándose en colores rojos un incremento de la expresión y en verde una disminución (* $p < 0.05$).

Todas las proteínas identificadas son de origen humano a excepción de la albúmina, de origen bovino y cuya presencia puede deberse al suero fetal bovino incluido durante el cultivo celular. Las células tumorales en cultivo internalizan la albúmina como fuente de aminoácidos y energía (386,387), lo que explica su presencia en los lisados de las células MDA-MB-231.

Dos de los *spots* seleccionados, el 3501 y el 6506, dieron lugar a la identificación significativa de dos proteínas diferentes (la fosfoproteína inducida por estrés y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) y dos subunidades del mismo complejo proteico (subunidades theta y épsilon de la proteína 1 del complejo T), respectivamente. Se trata de proteínas con una masa molecular y un PI similar que no se han separado en la electroforesis bidimensional y aparecen formando parte del mismo *spot*. En estos casos, una de las proteínas contenida en el spot individualmente o ambas en su conjunto podrían contribuir al cambio en el ratio de fluorescencia observado.

Todas las proteínas identificadas mantienen una masa molecular cercana a la teórica, a excepción de la quinasa RIO2, que presenta un peso de aproximadamente 25 kDa, siendo su peso teórico de 63 kDa. Por tanto, podría tratarse de una forma procesada de la proteína.

Por otro lado, dos de las proteínas identificadas, el factor de elongación 2 (eEF2) y la fosfoglicerato mutasa (PGAM1), aparecen en dos *spots* con el mismo peso molecular pero distinto punto isoeléctrico, lo que sugiere que apMNKQ2 induce un cambio en modificaciones postraduccionales de la proteína que alteran su PI. Una tercera proteína, la cofilina, aparece incrementada en un PI cercano a 6, inferior a su PI teórico (8.22), por lo que también podría tratarse de un cambio en sus modificaciones postraduccionales.

6.1.1. Estudio de la expresión de proteínas identificadas mediante inmunodetección

Los cambios en los niveles y en las modificaciones postraduccionales de algunas de las proteínas identificadas por espectrometría de masas se identificaron por inmunodetección en las mismas muestras utilizadas para realizar la 2D-DIGE.

Se detectó un incremento de 1.26 veces en la expresión de Anexina 2 en lisados de células transfectadas con apMNKQ2 (Figura 43A), que coincide con el incremento de 1.3 veces determinado en el análisis por 2D-DIGE. Por otro lado, la subunidad beta de la proteína 1 del complejo T (TCP1), que constituye una de las 8 subunidades de la chaperonina TRiC/CCT (CCT2) (388), se encuentra levemente disminuida en presencia de apMNKQ2 (Figura 43B), al igual que ocurre en la detección por 2D-DIGE (0.87 veces en ambos casos).

La subunidad épsilon (CCT5), que forma parte del spot 6506, no presenta unos niveles incrementados en el análisis por western blot (Figura 43C), por lo que el incremento observado en la 2D-DIGE podría corresponderse con la subunidad theta (CCT8), también identificada en el *spot*.

La cofilina, una proteína de unión a actina que regula la dinámica del citoesqueleto de actina, es fosforilada en la Ser3, dando lugar a la forma inactiva de la proteína (389). En células tratadas con apMNKQ2 se observó un incremento de la fosforilación de la cofilina en la Ser3 (Figura 43D) y una tendencia a la disminución de sus niveles (Figura 43E). El aumento de la fosforilación de la cofilina podría explicar el incremento detectado en los geles 2D-DIGE de una forma ácida de esta proteína.

La fosforilación inhibitoria de eEF2 en la Thr56 impide su interacción con los ribosomas, inhibiendo la fase de elongación de la traducción (390). Dada la relevancia de la fosforilación en este residuo, se utilizó un anticuerpo fosfoespecífico para determinar si cambios en esta fosforilación son los responsables de la variación en el punto isoeléctrico de eEF2 observada en la 2D-DIGE. Se observó una disminución de la fosforilación con apMNKQ2 en las cuatro muestras (Figura 43F), que se corresponde con el incremento de la forma básica de la proteína y la disminución de su forma ácida observada en los geles 2D-DIGE. Sin embargo, dicha disminución no se observó en otras muestras tratadas con apMNKQ2 (datos no mostrados) y tampoco en alícuotas de las mismas muestras utilizadas en la 2D-DIGE conservadas en un paso previo a la concentración de proteína (Figura 43F, lisados originales), donde se apreció un incremento de la fosforilación. Estos resultados sugieren que el procesamiento posterior de las muestras produjo la pérdida de la fosforilación de eEF2 en la condición tratada con apMNKQ2. Para descartar una afectación global del estado de fosforilación por el procesamiento de las muestras, el mantenimiento de otras fosforilaciones y sus variaciones con apMNKQ2 (eIF4E, NDRG1 y cofilina) se confirmaron en los lisados originales y en los lisados concentrados (Figura 43G).

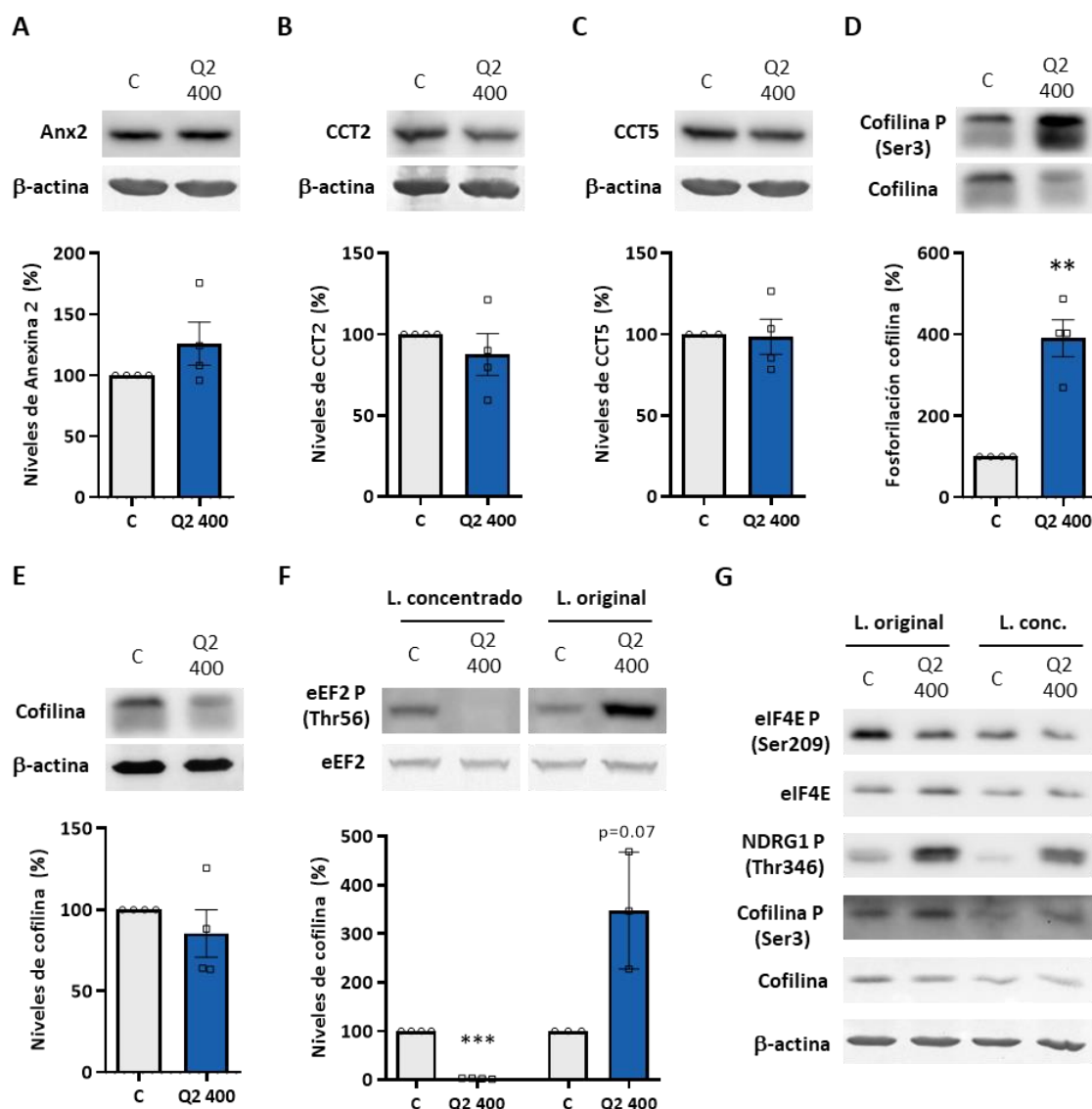


Figura 43. Inmunodetección de proteínas identificadas en 2D-DIGE. La expresión de anexina (A), CCT2 (B), CCT5 (C), cofilina fosforilada (Ser3) (D), cofilina niveles (E) y eEF2 fosforilado (Thr56) (F) se determinó por western blot en los lisados de células MDA-MB-231 transfectados con apMNKQ2 (400 nM) y su respectivo control utilizados en los ensayos 2D-DIGE. Adicionalmente, la expresión de eEF2 fosforilado (Thr56) (F), cofilina fosforilada (Ser3), eIF4E fosforilado (Ser209) y NDRG1 P (Thr346) (G) se determinó en los lisados utilizados en los ensayos 2D-DIGE (lisados concentrados) y en los mismos lisados antes de la concentración de proteína (lisados originales) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control).

6.1.2. Análisis de interacciones y clasificación funcional de las proteínas identificadas

El análisis de las interacciones y el enriquecimiento funcional entre las proteínas identificadas se realizó con el programa STRING versión 11.5, excluyendo la albúmina (Figura 44). Se obtuvieron un total de 33 interacciones, significativamente mayor ($p = 8.44e-13$) que el número de interacciones esperadas (7) para un conjunto del mismo tamaño de proteínas aleatorias, lo que indica que las proteínas identificadas están conectadas en grupos con funciones biológicas

asociadas. El enriquecimiento funcional de las proteínas identificadas en base a las categorías de GO de procesos biológicos, función molecular y componentes celulares (391) se muestra en la tabla 1 del Anexo.

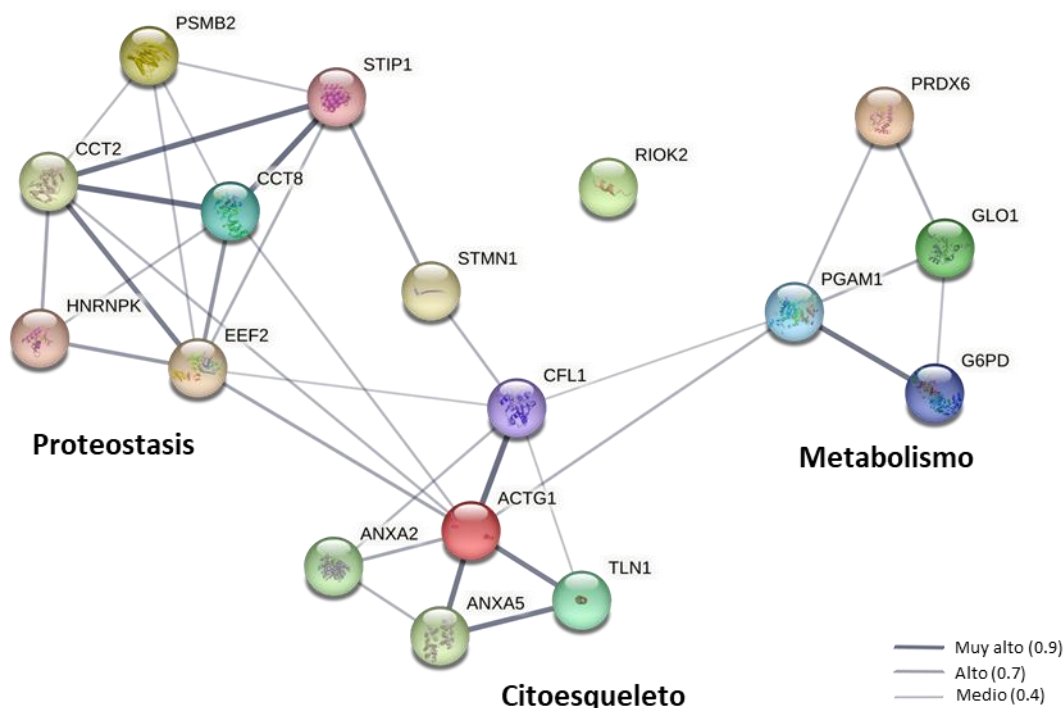


Figura 44. Interacciones entre las proteínas moduladas por apMNKQ2. Cada nodo representa una de las proteínas identificada con un color aleatorio y las líneas que conectan los nodos representan las asociaciones entre proteínas que contribuyen a una misma función. El grosor de las líneas representa el nivel de confianza de la asociación, como se muestra en la leyenda.

En la Figura 44 se aprecia la formación de 3 redes principales conectadas entre sí. Una de las redes más diferenciada incluye enzimas metabólicas, entre las que se encuentran una enzima glicolítica (PGAM1) (335), la enzima limitante de la ruta de las pentosas fosfato (G6PD) (392), una enzima antioxidante y que participa en el metabolismo de lípidos (prdx6) (393) y una enzima del sistema de detoxificación del metilglioxal y otros metabolitos (GLO1) (394).

La red compuesta por un mayor número de proteínas está relacionada con el control de la proteostasis celular e incluye subunidades de la chaperonina TRiC/CCT (CCT2, CCT5, CCT8) (388), la co-chaperona STIP1 (395), el factor de elongación eEF2, que media el movimiento de los ribosomas durante la elongación (390), la subunidad β del proteasoma (PSMB2), involucrada en la degradación proteolítica (396), y una ribonucleoproteína (hnRNPK), que participa en el metabolismo del mRNA(54).

Por último se diferencia otro conjunto de proteínas que tiene relación con el citoesqueleto, entre las que se encuentran componentes estructurales básicos como la γ actina (397) o la talina, que conecta el citoesqueleto con las integrinas de la membrana (398), proteínas que regulan la despolimerización de los filamentos de actina (cofilina) (389) y de los microtúbulos (estatmina)

(399) y dos anexinas (A5 y A2), implicadas en múltiples funciones celulares, como la regulación del citoesqueleto de actina (400).

La única proteína que no presenta interacciones con ninguna otra es R1OK2, una quinasa que participa en la maduración de la subunidad 40S del ribosoma (401).

6.1.3. Determinación de la actividad fosfoglicerato mutasa

La PGAM es un enzima glicolítica que cataliza la conversión de 3-fosfoglicerato (3-PG) a 2-fosfoglicerato (2-PG) y cuya actividad se encuentra regulada a nivel postraduccional a través de fosforilaciones (335) y acetilaciones (336) que incrementan su actividad. Para comprobar si los cambios observados en el punto isoelectrico de la PGAM1 en la 2D-DIGE se podrían corresponder con modificaciones postraduccionales de este tipo, se determinó la actividad catalítica de la PGAM en lisados de células transfectadas con apMNKQ2, dada la ausencia de anticuerpos fosfoespecíficos.

El vanadato, utilizado en nuestro tampón de lisis celular como inhibidor de fosfatasa, actúa como un inhibidor de la actividad de la PGAM (402). La inhibición de la actividad PGAM a las concentraciones de ortovanadato usadas en el tampón de lisis celular se comprobó en ensayos enzimáticos con PGAM1 recombinante en presencia o ausencia de este compuesto (Figura 45A). Por ello, la cuantificación de la actividad PGAM tras el tratamiento con apMNKQ2 se realizó en células MDA-MB-231 lisadas con tampón de lisis con y sin ortovanadato (Figuras 45B). Independientemente de la presencia de ortovanadato, apMNKQ2 inhibe de forma leve pero significativa la actividad de PGAM a las dos concentraciones utilizadas, lo que concuerda con una disminución de las modificaciones postraduccionales de la enzima.

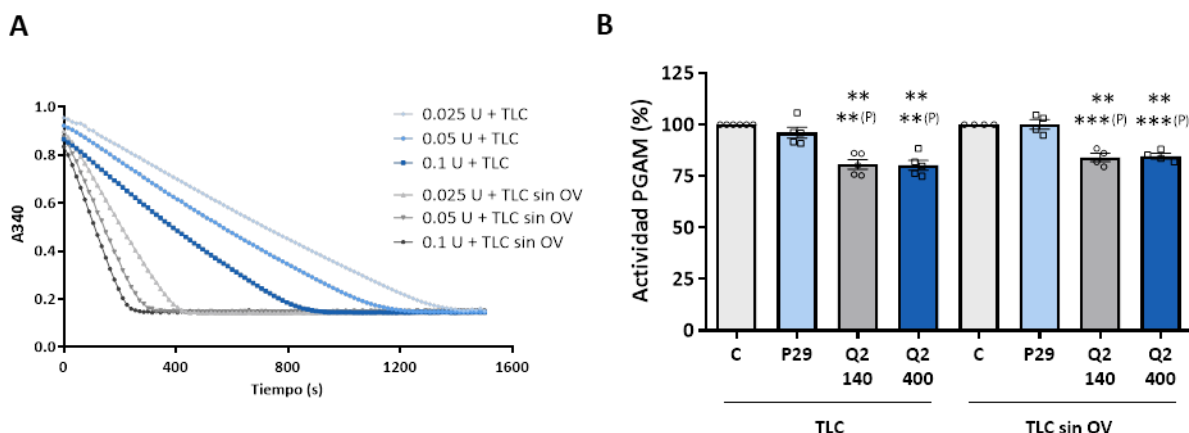


Figura 45. ApMNKQ2 inhibe la actividad PGAM. (A) Actividad enzimática de distintas unidades (U) de PGAM1 recombinante en presencia de tampón de lisis (TLC) con o sin ortovanadato sódico 1 mM (Cf = 15 μ M) (OV). La actividad se representa como la disminución de la absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo en un ensayo representativo. **(B)** Actividad PGAM en 20 μ g de lisado de células MDA-MB-231 obtenido 24 h después de la transfección con dos concentraciones de apMNKQ2 en presencia o ausencia de ortovanadato. Los gráficos de barras representan la media $\pm$ SEM de la actividad de la PGAM1 de 4 o 5 ensayos independientes en porcentaje respecto al control (** $p < 0.01$, respecto al control, **^(P) $p < 0.01$, ***^(P) $p < 0.001$, respecto a células transfectadas con P29).

6.1.4. Modulación de la fosforilación en la ser3 de la cofilina

La cofilina se encuentra sobreexpresada en una amplia variedad de tumores y se ha relacionado con un peor pronóstico y con metástasis, ya que promueve la migración a través de la reorganización del citoesqueleto de actina. En su forma activa, la cofilina corta los filamentos de actina e induce su despolimerización. La fosforilación en la Ser3 inhibe la actividad de la cofilina, lo que supone una estabilización de los filamentos de actina (F-actina) y una disminución de la actina globular (G-actina) y, en consecuencia, una disminución de la dinámica de renovación del citoesqueleto de actina (389). La fosforilación se ha relacionado mayoritariamente con una inhibición de la capacidad de migración de células tumorales (403–407). Para determinar si esta fosforilación tiene alguna relevancia en el efecto antimigratorio de apMNKQ2 en las MDA-MB-231, se sobreexpresaron de forma transitoria con el plásmido pcDNA3 las formas *wild type* (WT), no fosforilable (S3A) y que mimetiza el estado fosforilado (S3D) de la cofilina en combinación con apMNKQ2 a 140 nM y se realizaron ensayos en el sistema Transwell y heridas.

La sobreexpresión de la cofilina se comprobó mediante western blot a las 24 h. En la mayoría de ensayos se produjo un incremento en la expresión de las distintas formas de la cofilina de entre 1.5 y 2 veces la expresión endógena. Sin embargo, en presencia de apMNKQ2 los niveles de cofilina endógenos disminuyeron significativamente y en algunos casos la transfección con los plásmidos no fue suficiente para recuperar los niveles cofilina (Figura 46A).

Se observó una disminución de la migración en Transwell (Figura 46B) y en heridas (Figura 46C) en todas las condiciones que incluían apMNKQ2, pero no se produjeron cambios significativos en la migración en las células transfectadas únicamente con los plásmidos con la cofilina WT o los mutantes. La transfección simultánea con el plásmido que expresa la cofilina S3A amortiguó de forma leve pero significativa la inhibición de la migración con apMNKQ2 en los ensayos en Transwell pero no en la migración por herida, lo que sugiere una involucración parcial de la fosforilación de este residuo de la cofilina en el efecto antimigratorio de apMNKQ2.

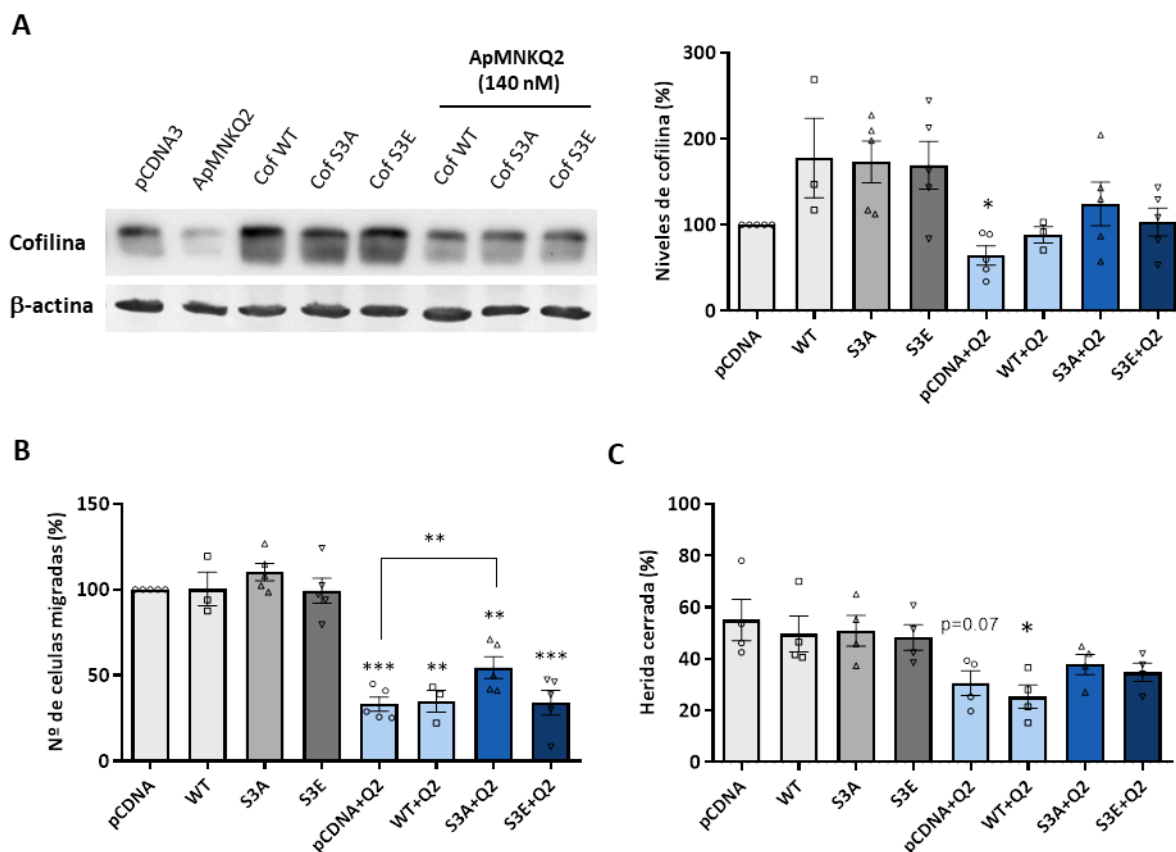


Figura 46. La expresión de la cofilina S3A reduce parcialmente el efecto inhibitorio de apMNKQ2 sobre la migración en Transwell. (A) La sobreexpresión transitoria de NDRG1 WT, S3A y S3E se cuantificó mediante western blot en células MDA-MB-231 transfectadas con los plásmidos (1 μ g por pocillo de p6) y co-transfectadas con los plásmidos y apMNKQ2 a 140 nM durante 24 h. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de entre 3 y 5 ensayos independientes expresados en porcentaje respecto al control. La migración celular se evaluó en ensayos en el sistema Transwell (B) y mediante heridas (C) realizados 8 h después de la transfección de apMNKQ2 (140 nM) y de 1 μ g (por pocillo de p6) de plásmido vacío (pCDNA3) o con el cDNA de las distintas formas de la cofilina (WT, S3A y S3E) y la co-transfección de apMNKQ2 y los plásmidos. La migración en el sistema Transwell se evaluó a las 24 h y se representa como la media del número de células migradas $\pm$ SEM de entre 3 y 5 ensayos expresados frente al control. La migración en los ensayos de herida se evaluó a partir de las fotos tomadas a las 0h y 12 h tras la realización de la herida. La gráfica representa la media $\pm$ SEM del porcentaje de herida cerrada en 4 ensayos independientes.

6.2. Estudio del transcriptoma y translatoma: análisis de la expresión diferencial de mRNAs en células tratadas con apMNKQ2 por RNAseq y Riboseq

La implicación de MNK en progresión tumoral se ha relacionado mayoritariamente con el control de la traducción de diversas proteínas relevantes en cáncer. Los cambios en el conjunto de proteínas traducidas en presencia de apMNKQ2 a 400 nM (translatoma) se analizaron mediante un perfil de ribosomas, basado en la secuenciación de los fragmentos de mRNA protegidos por los ribosomas (Riboseq). Puesto que el número de RPFs de los transcritos de un gen vienen determinados no solo por su tasa de traducción sino también por los niveles de expresión de su

mRNA, se realizó en paralelo una cuantificación de mRNAs totales por RNAseq, que permitió obtener información de la modulación del transcriptoma por apMNKQ2. Los ensayos de RNAseq y Riboseq se realizaron a tiempos cortos (4 y 8 h) con el objetivo de identificar los efectos más tempranos de apMNKQ2 que finalmente den lugar a una inducción de la apoptosis, inhibición de la proliferación, migración, etc. observada a tiempos más largos. En primer lugar, se validó el uso de estos tiempos para realizar un estudio del traslato comprobando la ausencia de una afectación global de la traducción con un marcaje con puromicina a las 4 y 8 h, aunque se observó una ligera disminución a las 8 h (Figura 1 Anexo). En estos estudios también se detectó una disminución global de la traducción a las 24 h con apMNKQ2.

Los datos del análisis generado en la secuenciación de las librerías de los RPFs se recogen en la Tabla 7. A pesar de que el número de lecturas que pasan los filtros de tamaño y calidad es adecuado para realizar el análisis de la expresión diferencial (408) y que el tamaño medio de los fragmentos, entre 28 y 30 nucleótidos, concuerda con lo esperado para los RPFs (409), el número de secuencias que se corresponden con genes del genoma humano es muy inferior al esperado, lo que no permite continuar con el estudio de los datos. Puesto que difícilmente puede tratarse de una contaminación de otros RNAs, ya que tampoco se observaron coincidencias con los genomas de otras especies, es probable que se trate de un error en la generación de las librerías o una degradación del RNA posterior a los análisis de calidad realizados tras la extracción del RNA (Figura 2 Anexo), donde se pudo observar una población mayoritaria de fragmentos de RNA de entre 25 y 30 nucleótidos para todas las muestras.

Tabla 7. Análisis Riboseq. En la tabla se muestra para cada muestra el número de lecturas inicial, el número de lecturas filtradas, el tamaño medio de las secuencias y el número y porcentaje de lecturas que se alinearon con el genoma humano en una única posición (alineamiento único) o en más de dos posiciones (alineamiento múltiple).

Muestra	Nº lecturas inicial	Nº lecturas filtradas	Tamaño medio	Alineamiento único	Alineamiento múltiple
C 4h 1	1 636 290	767 173	30.9	209 (0.03%)	2661 (0.35%)
C 4h 2	1 480 222	688 207	29.8	199 (0.03%)	2363 (0.34%)
C 4h 3	1 561 353	761 241	27.7	257 (0.03%)	2669 (0.35%)
Q2 4h 1	1 680 413	784 308	29.2	164 (0.02%)	4858 (0.62%)
Q2 4h 2	1 597 182	827 001	29.3	296 (0.04%)	2733 (0.33%)
Q2 4h 3	1 513 329	774 779	30	271 (0.03%)	2195 (0.28%)
C 8h 1	1 636 290	966 330	29.5	452 (0.05%)	3680 (0.38%)
C 8h 2	1 480 222	808 220	28.2	433 (0.05%)	4895 (0.61%)
C 8h 3	1 561 353	605 883	30.1	143 (0.02%)	2818 (0.47%)
Q2 8h 1	1 150 181	631 367	30.2	233 (0.04%)	2576 (0.41%)
Q2 8h 2	1 864 273	959 708	30.6	282 (0.03%)	4352 (0.45%)
Q2 8h 3	1 595 872	756 744	31.7	153 (0.02%)	4193 (0.55%)

Los datos obtenidos en la secuenciación del RNA total permitieron realizar un análisis de la expresión de los mRNAs entre las condiciones control y apMNKQ2 a 4 y 8 h. Se consideró como expresión diferencial aquellos transcritos con un cambio en su expresión ($\log_2\text{foldchange}$) superior a 1.5 o inferior a -1.5 y una significancia (p adj) inferior a 0.01. La comparación de los datos obtenidos por RNAseq entre el control y las células tratadas con apMNKQ2 durante 4 h no

mostró cambios significativos a excepción de 3 transcritos que se incrementan (Figura 47A). Entre las muestras control y tratadas con apMNKQ2 a 8 h se identificaron 482 transcritos expresados diferencialmente, de los cuales 383 presentaron una disminución de la expresión (Figura 47B). Solo se encontraron cambios en la expresión de 4 transcritos entre los controles a los dos tiempos de estudio (Figura 3 Anexo). El número total de lecturas y la distribución de las muestras se muestran en el anexo (Figuras 4 y 5 del Anexo).

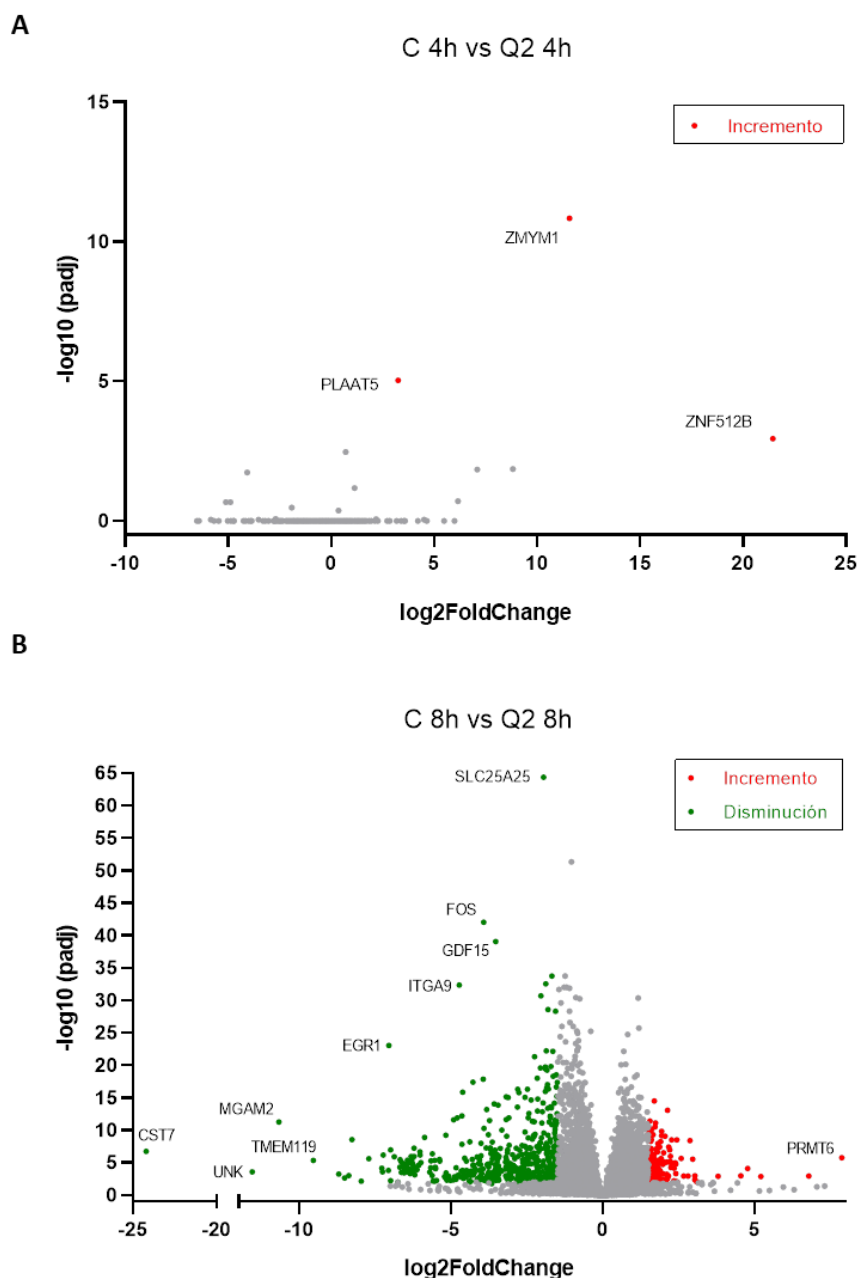


Figura 47. Expresión diferencial de genes entre células control y tratadas con apMNKQ2 durante 4 h (A) y 8 h (B). Los puntos verdes representan aquellos transcritos con una menor expresión en las células tratadas con apMNKQ2, mientras que los puntos rojos representan los transcritos sobreexpresados con apMNKQ2. Los puntos grises representan los genes cuya expresión no varía respecto al control de acuerdo a los criterios seleccionados ($p \text{ adj} < 0.01$ y $|\log_2\text{FoldChange}| > 1.5$). La identidad de los genes con mayor expresión

diferencial se muestra en la gráfica. El eje de las X muestra el cambio en la expresión de cada transcrito respecto al control en $\log_2$ y el eje de las Y el valor de p corregido en $-\log_{10}$.

Con el objetivo de asociar las variaciones en los niveles de mRNA con rutas de señalización y procesos biológicos alterados por apMNKQ2 se realizó un análisis de enriquecimiento de los transcritos con expresión diferencial en las bases de datos GO, KEGG y Reactome. Los análisis de enriquecimiento se llevaron a cabo por separado para los genes cuya expresión aumenta y disminuye para incrementar la fuerza estadística en la identificación de grupos (410). Los genes sobreexpresados no mostraron enriquecimiento significativo en ninguna categoría de GO ni en las rutas de señalización de KEGG o Reactome, a diferencia de los genes que presentaron una disminución de su expresión en presencia de apMNKQ2 (Figura 48).

El análisis de GO identificó 34 categorías de procesos biológicos significativas ($p \text{ adj} < 0.05$) enriquecidas, pero ninguna para las agrupaciones de componentes celulares y funciones moleculares. Los 10 términos GO para procesos biológicos que contienen mayor número de genes se muestra en la parte superior de la Figura 48. Entre los procesos biológicos, destacan la regulación de la angiogénesis, migración e inflamación y las cascadas de señalización por MAPK, que concuerdan con el efecto antitumoral de apMNKQ2. Respecto a las rutas de señalización, se identificaron en total 18 rutas KEGG enriquecidas, de las cuales se muestran las 10 más significativas en la Figura 48, y dos rutas en Reactome. En relación con el papel antitumoral de apMNKQ2 se podría destacar el enriquecimiento de la ruta de señalización de las MAPK, TNF y la categoría de desregulación transcripcional en cáncer, que incluye un conjunto de factores de transcripción que contribuyen en procesos oncogénicos. La clasificación completa con todas las categorías significativas de las tres bases de datos se muestra en la tabla 2 del anexo.

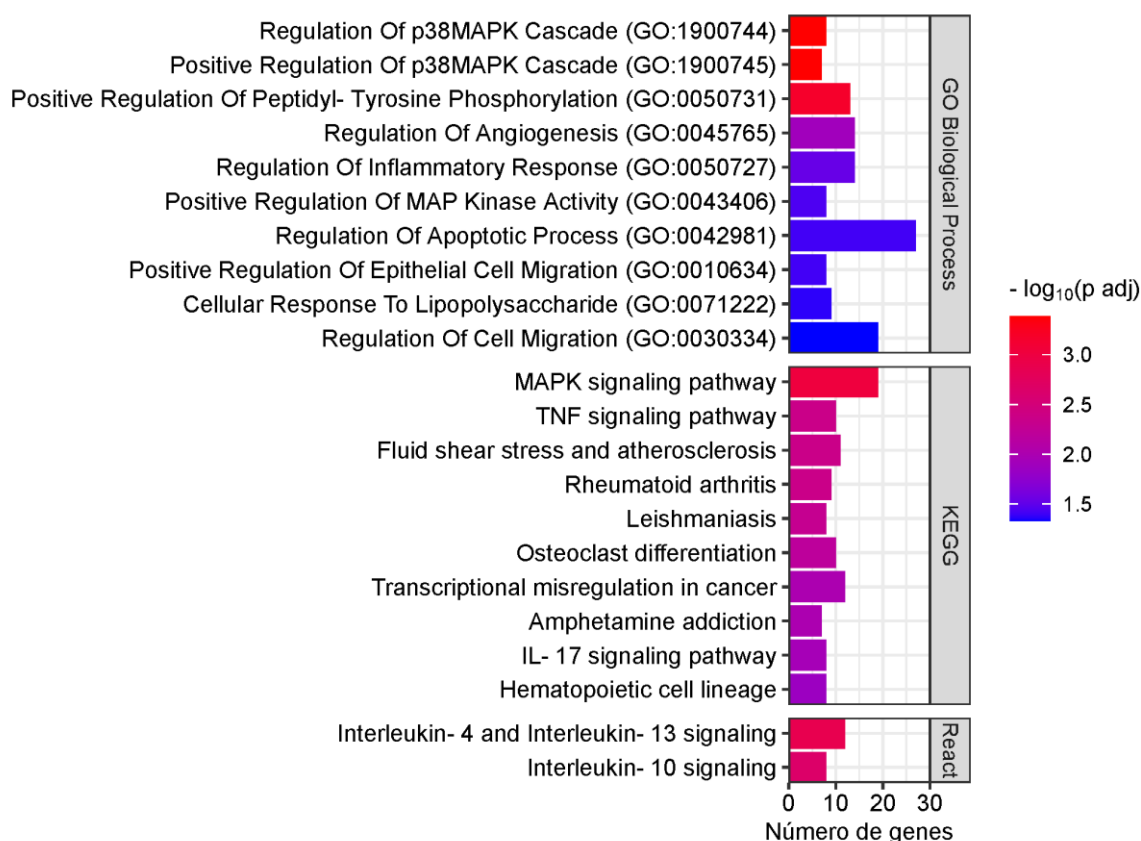
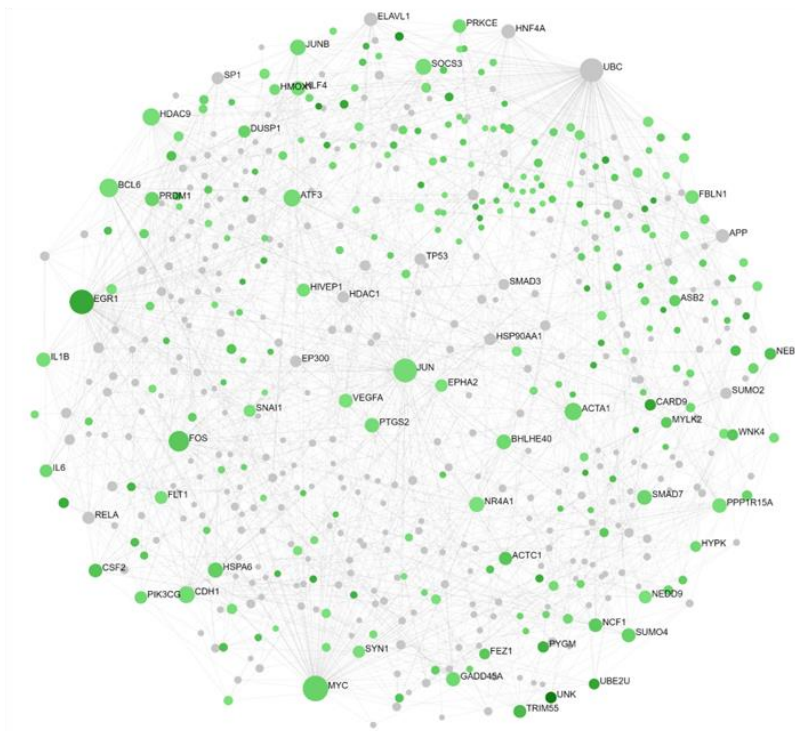


Figura 48. Análisis de enriquecimiento en GO, KEGG y Reactome. El análisis de enriquecimiento se realizó para los genes que presentaron una $p \text{ adj} < 0.01$ y un $\log_2\text{FoldChange} > 1.5$. En la figura se muestra el término que identifica cada categoría de GO, KEGG o Reactome y el número de genes que disminuyen con apMNKQ2 y encajan en dicha categoría. El color muestra el grado de significancia de cada enriquecimiento.

Las interacciones entre las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados en presencia de apMNKQ2 se analizaron mediante la herramienta web NetworkAnalyst. El programa generó una red con los genes de expresión disminuida, denominados genes semilla (verde), las interacciones entre ellos y con otros genes que sirven para conectar funcionalmente algunos de los genes de expresión disminuida (gris) (Figura 49A). Como se muestra en la Figura 49A, un elevado número de los genes identificados tiene relación entre sí. En el caso de los genes sobreexpresados no se obtuvo una red de conexiones con un número suficiente de interacciones directas entre los genes diferencialmente expresados y únicamente se obtuvieron redes en torno a genes conectores como el de la ubiquitina. Con el objetivo de visualizar de forma más clara aquellos genes que constituyen los núcleos de interacción del conjunto general de proteínas se realizó una representación de orden cero, que mantiene únicamente los grupos de genes semilla que interaccionan directamente entre sí. Entre las representaciones obtenidas, la que incluyó un mayor número de genes se muestra en la Figura 49B. Esta red está constituida en torno a los factores de transcripción c-Jun, JunB, c-Fos, proteína de respuesta de crecimiento temprano (EGR1), c-Myc y el represor transcripcional proteína 6 del linfoma de células B (BCL6).

A



B

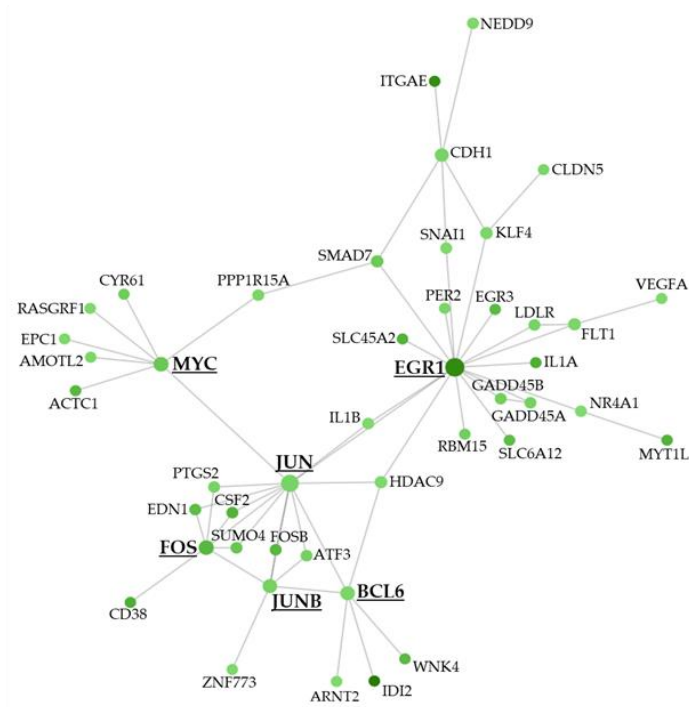


Figura 49. Interacciones entre las proteínas codificadas en los transcritos cuyos niveles se reducen con apMNKQ2. Cada nodo representa un gen y las aristas, las interacciones que hay entre ellos. En verde se representan los genes con expresión disminuida (genes semilla), con tonalidades más oscuras para aquellos con una mayor diferencia de expresión, y en gris se representan otros genes que sirven de conectores entre los genes semilla. **(A)** Representación de ForceAtlas para el total de genes cuya expresión está disminuida **(B)** Representación de Fruchterman-Reingold para el conjunto de genes cuya expresión está disminuida y presenta un mayor número de interacciones entre sí. Se destacan en negrita y subrayado los genes con más de 5 interacciones.

DISCUSIÓN

La determinación de la diana de un fármaco y su mecanismo de acción se considera un aspecto clave en el desarrollo farmacológico actual, a pesar de no ser un requisito para iniciar ensayos clínicos o para que su uso terapéutico sea aprobado por las agencias estatales regulatorias. Prueba de ello es el desconocimiento de la diana o mecanismo de acción completo de entre el 7 y el 18% de fármacos que se utilizan en clínica (411), como por ejemplo el litio en el tratamiento del trastorno bipolar (412). Sin embargo, el estudio de las interacciones del fármaco y las alteraciones que produce a nivel molecular puede aportar grandes beneficios durante la validación terapéutica de nuevas moléculas y prevenir que sea retirado una vez haya alcanzado estados avanzados de las fases clínicas. Conocer la diana y el mecanismo de acción del fármaco puede facilitar su dosificación, siempre que se pueda monitorizar el efecto sobre la ruta o actividad de la diana, y puede mejorar la resolución de los ensayos clínicos al centrarlos en aquellos pacientes con determinadas alteraciones moleculares que ofrezcan una mayor respuesta, enfocando el fármaco hacia una medicina personalizada (412,413). Incluso si la diana putativa y el mecanismo de acción ya están establecidos, estudios moleculares y funcionales adicionales pueden ayudar a identificar posibles efectos adversos debido a uniones inespecíficas a otras proteínas o nuevos mecanismos de señalización en los que se encuentren involucradas la diana o las proteínas *off-target* (414).

El efecto antitumoral de apMNKQ2 se ha demostrado en líneas y modelos animales de cáncer de mama (321), pulmón (322) y páncreas (datos pendientes de publicar). Con el objetivo de avanzar en la fase preclínica de apMNKQ2 y profundizar en su eficacia, durante el desarrollo de esta tesis se ha determinado el efecto de apMNKQ2 sobre distintos marcadores moleculares y rutas de señalización con relevancia en cáncer, los cuales, en algunos casos, se han podido relacionar con cambios fenotípicos y en las propiedades tumorales de células de mama. El mecanismo de acción de apMNKQ2 se ha tratado de determinar mediante la combinación de varias estrategias, entre las cuales se encuentra la manipulación genética de las potenciales dianas y proteínas implicadas en la actividad de apMNKQ2 y la generación de perfiles de expresión genéticos y de proteínas, que han permitido inferir rutas de señalización y proteínas moduladas (Figura 50).

1. Modulación de los sustratos de MNK, rutas de apoptosis, proliferación y migración por apMNKQ2

1.1. Efecto de apMNKQ2 sobre las MNKs y sus sustratos

La forma más directa de determinar la inhibición de la actividad de MNK1 por apMNKQ2 en el contexto celular es a través del estudio de los niveles de fosforilación de sus sustratos. Todos los inhibidores de MNK descritos hasta el momento afectan a su actividad quinasa y reducen la fosforilación de eIF4E, ya sea por una inhibición directa de su actividad catalítica (183,198,204,24,148,201,202,205,206,207,224) o porque actúan potenciando la degradación de MNK, como ocurre con las retinamidas (87,163,222) y los derivados de galeterona (219,221,270). La única excepción son los análogos de ferroceno obtenidos a partir de la adición de un grupo ferroceno a un inhibidor de MNK derivado de tienopirimidina, que no afectan a fosforilación de

eIF4E, pero tienen efectos antitumorales, probablemente asociados a la citotoxicidad del grupo ferroceno más que a la inhibición de MNK (209).

En el caso de apMNKQ2 no se produce una disminución del estado de fosforilación de los sustratos hnRNPA1 y spry2 (Figuras 10 y 11), pero si se observa una disminución de la fosforilación de eIF4E a tiempos largos, a partir de las 16 h del inicio del tratamiento (Figura 9). En aquellos estudios donde se proporciona información acerca de la cinética de la fosforilación de eIF4E en presencia de otros inhibidores de MNK la disminución de la fosforilación se produce de forma casi inmediata; a la hora para MNKI-57 (161), SEL201 (203) y BAY1143269 (224) o a la media hora para CGP57380 (164), ETC-168 (78) o EB1 (217) en líneas celulares e *in vivo* en el caso de la cercosporamida (198). Sin embargo, en nuestro caso se observa un incremento de la fosforilación a las 4 h que vuelve a los niveles basales a las 8 h. Este incremento se produce tanto con apMNKQ2 como con P29, lo que indica que se trata de un mecanismo inespecífico que puede estar desencadenado por la entrada de un DNA exógeno en el interior celular que active una respuesta inmune innata (415). Es posible que el reconocimiento de estos fragmentos por parte de proteínas sensores de DNA active la señalización por MAPK temporalmente e incremente la fosforilación de eIF4E (416). De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que uno de los principales componentes de la señalización de sensores de DNA citosólico (cGAS-STING) activa la señalización por MAPK, aunque se desconoce el mecanismo y relevancia (417,418).

La ausencia de disminución de la fosforilación de los otros sustratos de MNK confirmaría una limitada inhibición de la actividad catalítica de MNK por parte de apMNKQ2, si bien se trata de sustratos cuya fosforilación no ha sido ampliamente estudiada y para los cuales la fosforilación de MNK parece ser relevante únicamente bajo un determinado contexto celular que no se ha abordado en los ensayos realizados en esta tesis: senescencia celular (57), situaciones de estrés osmótico (56) o el uso de linfocitos T activados (55), en el caso de hnRNPA1, o la activación de la señalización de ERK por factores de crecimiento, en el caso de spry2 (51,52). En situaciones basales, es posible que la actividad de MNK1 no determine el estado de fosforilación de estas proteínas ni su actividad o que solamente MNK2 tenga relevancia en este papel (52). Conforme con esta teoría, en nuestro modelo de estudio la mayor parte de hnRNPA1 se encuentra localizado en núcleo y en un estado desfosforilado. Su fosforilación se incrementa ligeramente en células tratadas con apMNKQ2, lo cual difícilmente puede relacionarse con una inhibición de la actividad de MNK1. Las MNKs no son las únicas quinasas capaces de fosforilar a hnRNPA1, por lo que el efecto observado podría relacionarse con cambios en la actividad de otras quinasas como la subunidad catalítica quinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs), AKT o la quinasa relacionada con vaccinia (VRK1) (54,419).

Aparentemente se produce un incremento de la fosforilación de spry2 a las 24 h respecto a su control en presencia de apMNKQ2, contrario al efecto esperado para una inhibición de la actividad de MNK. Sin embargo, los niveles de fosforilación de spry2 tienden a descender a medida que se incrementa el tiempo de incubación, disminuyendo en menor medida en las condiciones tratadas con apMNKQ2, lo que da lugar a la diferencia de niveles de fosforilación observada entre control y apMNKQ2 a las 24 h. La fosforilación de los residuos de Ser/Thr del

dominio rico en serinas, asociadas a los cambios en la movilidad electroforética de spry2, responde a la estimulación por factores de crecimiento, incrementándose tras la estimulación con EGF (51) pero disminuyendo con FGF (363), aunque en otros casos no se han observado variaciones en la movilidad electroforética en presencia o ausencia de EGF o suero (52). Los cambios en la composición del medio de cultivo a lo largo del tiempo o la continua duplicación de las células control, ralentizada en células tratadas con apMNKQ2, podrían dar cuenta de estas diferencias. Al igual que ocurre con hnRNPA1, spry2 puede ser fosforilada por otras quinasas en el dominio rico en serinas, las cuales pueden ser responsables de los cambios observados (420,421).

Por otro lado, las fosforilaciones en el dominio rico en serinas se han relacionado con la estabilidad y degradación de spry2 (421). En nuestro caso, las variaciones en el estado de fosforilación de spry2 no dan lugar a cambios significativos en sus niveles, aunque tienden a incrementarse con apMNKQ2. Estos resultados sugieren que la fosforilación en las MDA-MB-231 podría promover la estabilidad de la proteína, como se ha descrito previamente en células CHOK1 (51), contribuyendo a la limitación de la actividad de la ruta de ERK.

ApMNKQ2 podría afectar a la fosforilación de los otros dos sustratos de MNK (PSF y cPLA2), cuyo estudio no se ha abordado en el desarrollo de este trabajo, pero que podrían tener relevancia en el efecto antitumoral del aptámero. Ensayos de fosfoproteómica, planteados como continuación de esta tesis, permitirán en un futuro obtener información a gran escala de los cambios en la fosforilación de proteínas inducidos por apMNKQ2.

Temporalmente, la disminución de la fosforilación de eIF4E coincide con una disminución de los niveles de MNK1a (Figura 12). Esta disminución no tiene lugar a nivel transcripcional y no es consecuencia de una alteración de los niveles de miRNAs reguladores de MNK1a (Figura 13). En presencia de un inhibidor del proteasoma (MG132), apMNKQ2 no produce la disminución de los niveles de MNK1, lo que sugiere que apMNKQ2 funciona como un degradador de MNK1 (Figura 14). En ese caso, apMNKQ2 podría actuar facilitando la interacción entre MNK1 y una ubiquitina ligasa, promoviendo su ubiquitinización y su consecuente degradación por el proteasoma. Sin embargo, el propio MG132 reduce los niveles de MNK1a, aunque en menor medida que apMNKQ2. Es posible que tanto apMNKQ2 como MG132 afecten a la expresión de MNK1a por el mismo mecanismo (por ejemplo, inhibiendo su traducción) de una forma no aditiva, de manera que al combinar apMNKQ2 y MG132 no se consiga una mayor reducción de los niveles de MNK1a que con ambos compuestos por separado. En otros estudios donde se evalúa la actividad de la retinamida VNLG-152 (223) o galeterona (270) como degradadores de MNK en presencia de MG132 no se ha descrito una disminución de MNK1 con MG132, a pesar de utilizar la misma línea celular (MDA-MB-231) y misma concentración de MG132 (223). El mecanismo por el cual los derivados de retinamida y galeterona inducen la degradación de MNK se desconoce, aunque si se ha demostrado que existe una interacción directa entre VNLG-152R y MNK1 (162). En el caso de VNLG-152, la disminución de los niveles de MNK1 se produce a las 12h, lo que concuerda con nuestros resultados (87). Futuros estudios sobre la vida media de MNK1 utilizando inhibidores de la traducción como la cicloheximida o mediante el análisis de la ubiquitinización de MNK1

permitirán confirmar la relevancia del sistema de degradación por el proteasoma en el mecanismo de apMNKQ2.

Además de los derivados de retinamidas y galeteronas, otros inhibidores de MNK producen alteraciones en los niveles de las MNKs, como ETC-168, que produce un incremento del mRNA y proteína (78) o CGP57380, que puede producir una disminución de su expresión (177).

La disminución de los niveles de MNK1a se trató de relacionar con los efectos antitumorales de apMNKQ2 sobreexpresando de forma transitoria MNK1a hasta recuperar los niveles iniciales de MNK1, pero no se evidenciaron cambios en la inhibición de la migración o viabilidad ejercida por apMNKQ2 (Figura 15). El hecho de que la sobreexpresión transitoria de MNK no afecte a la viabilidad o migración puede deberse a una baja eficacia de transfección, de manera que pocas células capten el plásmido, aunque se observe un incremento global de los niveles por inmunodetección. De forma similar, en datos obtenidos en nuestro laboratorio (422) se demostró que la transfección transitoria de MNK1a no contrarresta el efecto inhibitorio de CGP57380 sobre la viabilidad celular en las MDA-MB-231, a diferencia de la sobreexpresión estable de MNK1a. Igualmente, la sobreexpresión estable de MNK1a o MNK1b es capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio de apMNK2F, aptámero parental de apMNKQ2, sobre la viabilidad celular (320), aunque la sobreexpresión en el caso de MNK1b promueve la viabilidad celular por sí misma (68).

Por otro lado, en la línea MDA-MB-231, la variación de los niveles de MNK1a de forma individual podría no ser relevante para la viabilidad celular. De acuerdo con esta hipótesis, el silenciamiento parcial de MNK1a, manteniendo intactos los niveles de MNK1b en la línea MDA-MB-231, no afecta a la viabilidad celular, a diferencia de lo que ocurre en la línea MCF7, donde tanto MNK1a como MNK1b se encuentran disminuidas (Figura 16 y 17). Estos ensayos podrían reflejar la relevancia de la isoforma MNK1b sobre MNK1a en la viabilidad celular de las líneas de cáncer de mama, como se ha descrito previamente (68). Sin embargo, el silenciamiento de MNK1 en la línea MDA-MB-231 produce un incremento del mRNA de MNK2a y MNK2b, que no tiene lugar en las MCF7. Este mecanismo compensatorio podría ser el responsable de la ausencia de inhibición de la viabilidad celular tras el silenciamiento de MNK1 en la línea MDA-MB-231. El incremento en la expresión de MNK2 no se ha comprobado a nivel de proteína, por lo que existe la posibilidad de que los niveles de MNK2 permanezcan estables a pesar del incremento de su mRNA. Algo similar ocurre en la línea LPS141 de liposarcoma, donde el silenciamiento de MNK1 incrementa los niveles de mRNA de MNK2 de forma significativa, aunque en menor medida que en nuestro caso, sin que se refleje en los niveles de proteína (78). Por otra parte, el silenciamiento individual de MNK2 afecta mayoritariamente a la isoforma MNK2b en ambas líneas celulares. A pesar de que MNK2b se ha descrito como protumoral respecto a MNK2a (83), no se produjo una disminución de la viabilidad en ninguna de las dos líneas, lo que indica que MNK2 podría no ser crítica para la supervivencia de estas líneas de cáncer de mama. El silenciamiento de MNK2 produce un incremento de la expresión de MNK1a por mecanismos desconocidos (175), que en nuestro caso no tiene lugar, por lo que no puede contribuir al mantenimiento de la viabilidad observado. El silenciamiento parcial de las MNKs y la ausencia de anticuerpos limita los resultados y conclusiones que se pueden extraer de estos ensayos. La implementación de técnicas

para deletar los genes de MNK1 y MNK2 mediante CRISPR/Cas9 permitirá discernir la relevancia de estas proteínas, mecanismos compensatorios entre ambas y su papel sobre la viabilidad de las líneas utilizadas. El bajo rendimiento en el silenciamiento de MNK1, que conserva ciertos niveles de MNK1a y MNK1b, podría explicar que apMNKQ2 mantenga su inhibición sobre la viabilidad en presencia de los siRNAs e incluso que se potencie dicha inhibición en las MCF7.

1.2. Efecto de apMNKQ2 sobre la apoptosis

Los efectos de apMNKQ2 sobre la viabilidad celular se podrían asociar principalmente a una inducción de la apoptosis, ya que los cambios en los niveles de dos de las proteínas antiapoptóticas reguladas por MNK, MCL1 y XIAP, se producen de forma temprana, a las 4 y 8 h respectivamente, aunque ambas parecen estar reguladas a distintos niveles (Figura 18). La expresión del mRNA de las dos proteínas a 4 h tiene una alta variabilidad que no permite determinar cambios claros, mientras que a las 8 h se observa una tendencia a la disminución de MCL1 y al incremento de XIAP. Además, los estudios de degradación por el proteasoma indican que MCL1, al menos parcialmente, está regulada a este nivel, a diferencia de XIAP (Figuras 19 y 20). Por tanto, XIAP parece estar regulado a nivel traduccional, mientras que MCL1 estaría regulado a nivel transcripcional y de su estabilidad, a falta de confirmar de forma directa alteraciones en la traducción de ambas proteínas.

La disminución de MCL1, crucial para la supervivencia de diversas líneas celulares (243), se ha demostrado con múltiples inhibidores de MNK a las 24 h, aunque en algunos casos también se ha descrito una reducción temprana de los niveles (a las 4 h con merestinib (212) o ETC-168 (78) o a las 12h con CGP57380 (174), aunque siempre acompañada de una bajada de la fosforilación de eIF4E y, para algunos inhibidores, de una alteración de su traducción (212,78). Sin embargo, una disminución de eIF4E fosforilado no produce necesariamente una disminución de MCL1, como ocurre en la línea de liposarcoma LPS141 con ETC-168 (78) o en la línea de mama BT474 con CGP57380 (251). Puesto que los cambios en MCL1 y XIAP con apMNKQ2 son previos a la variación de la fosforilación de eIF4E a las 16 h, el mecanismo por el cual apMNKQ2 produce estos cambios parece ser independiente del eje MNK/eIF4E. Como mecanismo alternativo a eIF4E de MNK, apMNKQ2 podría regular la traducción de XIAP de forma dependiente de IRES (423,424), ya que hasta el momento no se ha determinado a que nivel se produce la regulación de XIAP por MNK (246). En el caso del control de la estabilidad de MCL1 por apMNKQ2, las MNKs se han vinculado con la estabilidad de otras proteínas como la vimentina, de manera que en presencia de MG132 se atenúa la disminución de vimentina que produce el inhibidor MNK-I1 de un modo similar a los niveles de MCL1 tras combinar MG132 y apMNKQ2 (148). El control de los niveles de MCL1 podría estar regulado por apMNKQ2 a través de su fosforilación en la Thr163, la cual estabiliza MCL1 en células tumorales y se ha asociado con la actividad de ERK (367,425), por lo que MNK podría estar involucrada en este proceso.

1.3. Efecto de apMNKQ2 sobre la proliferación

Los efectos de apMNKQ2 sobre la proliferación son limitados y no han sido estudiados en profundidad en nuestro laboratorio. ApMNKQ2 produce alteraciones en el ciclo celular en algunas líneas de cáncer de mama (321) y pulmón (322), aunque no se observa un patrón común a todas ellas y en general los efectos son sutiles. A nivel molecular, a tiempos largos (16-24 h) se produce una disminución de los niveles de tres proteínas reguladas por MNK implicadas en proliferación (ciclina D1, β -catenina y CDK2) (Figura 21 y 22), que coincide con la inhibición de la fosforilación de eIF4E y por tanto podría relacionarse con una inhibición de la actividad canónica de las MNKs por apMNKQ2 y una disminución de la capacidad de proliferación celular. A tiempos cortos, se han identificado cambios en el marcador de ciclo celular CDK2 fosforilado (Tyr15), que comienzan a disminuir a partir de las 4 h (Figura 22). CDK2 tiene un papel relevante en la progresión del ciclo hacia las fases S y M y no es esencial en el desarrollo embrionario, pero si se ha asociado con el crecimiento tumoral de distintos tipos de cáncer (426). La CDK2 se activa durante la fase G1 tardía tras la unión de la ciclina E o A, y alcanza un estado completo de activación tras ser fosforilada en la Thr160 (426), siendo los niveles máximos de fosforilación durante las fases S y G2 (372). La fosforilación en Tyr15, inhibidora de la actividad quinasas, también es máxima durante las fases S y G2 (372) y tiene un papel relevante en el control de la degradación de la ciclina E y en el mantenimiento de la estabilidad genómica en la fase S (427).

No existe una bibliografía extensa que relacione la disminución de la fosforilación en la Tyr15 de CDK2 con las fases del ciclo celular, aunque se ha determinado que, al igual que ocurre con la Tyr15 de CDK1, la fosfatasa CDC25 desfosforila estos residuos en ambas proteínas al final de la fase G2 y la mitosis temprana (372,373,426), siendo, en el caso de CDK1, un paso necesario para la entrada en la fase de mitosis (428). Dada la alta homología entre CDK1 y CKD2 y su fosforilación en sitios análogos (372,426) no se puede descartar que la inmunodetección se esté produciendo también sobre CDK1, de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial que proporciona el anticuerpo frente a CDK2 fosforilado. La disminución de la fosforilación de la Tyr15 de CDK1 se ha observado con compuestos como el nocodazol (429), paclitaxel (429,430) o el 2-metoxiestradiol (431), que producen una parada mitótica. Los cambios producidos por apMNKQ2 sobre la fosforilación en la Tyr15 indicarían alteraciones del ciclo en esta fase. Un incremento en la fosforilación en la Ser10 de la histona H3 corroboraría la parada mitótica (375) inducida por apMNKQ2. Aunque no se ha podido determinar este cambio con certeza en las MDA-MB-231, sí se ha demostrado su incremento en líneas de cáncer de páncreas derivadas de xenoinjertos de paciente (datos no mostrados).

Además de su papel en ciclo celular, CDK2 se activa en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (432,433), de manera que una disminución de la fosforilación en CDK2 se ha relacionado con la inducción de apoptosis con compuestos como el MG132 (434) o la estaurosporina (435), por lo que es posible que los cambios observados con apMNKQ2 sean consecuencia de la inducción de la apoptosis y no de cambios en la distribución del ciclo celular. Además, el incremento de la fosforilación en Ser10 de la histona H3 también se produce en respuesta a estímulos de muerte (436).

La disminución de MCL1 y la desfosforilación de CDK2 se han observado a los mismos tiempos tras el tratamiento con apMNKQ2, por lo que la alteración de marcadores apoptóticos y de ciclo celular tiene lugar de forma paralela. En algunos estudios se ha demostrado que la apoptosis puede inducirse durante la parada mitótica a través de la modulación postraduccional de MCL1 (437–439), de manera que el tratamiento con nocodazol o paclitaxel, que afectan a la dinámica de los microtúbulos produciendo una parada mitótica, disminuye los niveles de MCL1 a las 4-8 h, de forma concomitante con una desfosforilación de la Tyr15 de CDK1 y de forma dependiente del proteasoma (437). Si bien apMNKQ2 podría tener un mecanismo de acción similar, la modulación del ciclo celular por apMNKQ2 debe ser determinada en mayor profundidad. A diferencia de MCL1, los niveles de XIAP se mantienen durante las distintas fases del ciclo celular y no disminuyen ante una parada mitótica (440), lo que sugiere la existencia de otros mecanismos proapoptóticos de apMNKQ2.

Una de las rutas de señalización claves en la proliferación y supervivencia celular es la ruta de mTORC1. Algunos estudios han demostrado la regulación de la actividad de mTORC1 por MNK (160,161,164,165), mientras que en otros casos no se ha observado ningún cambio en la señalización por mTORC1 en presencia de inhibidores de MNK (25). Una posible explicación a estas discrepancias puede ser el uso de diferentes líneas y contextos celulares o el uso de diferentes inhibidores de MNK cuya especificidad por las MNK no ha sido completamente demostrada, como ocurre con el CGP57380. Con los datos obtenidos acerca de la modulación de la fosforilación de los sustratos de mTORC1 en presencia de apMNKQ2 no se ha podido confirmar una modulación de la actividad de mTORC1. Los efectos de apMNKQ2 podrían reflejarse sobre otros sustratos de mTORC1 o detectarse únicamente en situaciones que impliquen un incremento de la actividad de MNK1 (25) que favorezca la interacción directa entre MNK y mTORC1 (164). A pesar de que no se observa una disminución de la fosforilación en la ser65, determinante para que la interacción de 4EBP1 y eIF4E sea incompatible (36), apMNKQ2 incrementa la asociación entre ambas, tanto en presencia como en ausencia de everolimus (Figura 26). ApMNKQ2 disminuye levemente la fosforilación en la Thr37/46 (Figura 27), la cual funciona promoviendo las sucesivas fosforilaciones de 4EBP1 (441). Esta fosforilación reduce la afinidad por eIF4E, pero no impide su interacción (36), por lo que otros residuos fosforilables de 4EBP1 que pueden modular la interacción entre 4EBP1 y eIF4E, como la Thr70 o la Ser83, podrían verse alterados con apMNKQ2 (36). Por otro lado, teniendo en cuenta que MNK fosforila y se asocia con eIF4G (23,40), apMNKQ2 podría afectar a la interacción de eIF4G con eIF4E, aumentando la disponibilidad de este último. Como se ha descrito para otros inhibidores de esta interacción (442), el incremento en la disponibilidad de eIF4E favorecería la asociación con 4EBP1, ya que 4EBP1 y eIF4G interaccionan con la misma región de eIF4E.

Aunque no se ha podido establecer una regulación directa de la actividad de mTORC1 por apMNKQ2, si se ha demostrado la utilidad del aptámero como herramienta para potenciar los efectos antitumorales de everolimus, al igual que ocurre con otros inhibidores de MNK (69,160,165,170,171,174,176,177,179,180,161). Los efectos sinérgicos de apMNKQ2 sobre la viabilidad celular (Figura 23) pueden relacionarse con el bloqueo del incremento de la fosforilación de eIF4E, a través de la inhibición de la actividad de MNK1, y de la fosforilación de

AKT (Figura 24). La modulación de la fosforilación de AKT por apMNKQ2 es diferente en el estado basal, donde produce un leve incremento, y tras la estimulación de la fosforilación de AKT por rapamicina, donde produce una disminución. De acuerdo con ensayos en MEFs KO para MNK1/2, las MNKs no están involucradas en el incremento de fosforilación de AKT tras la inhibición de mTORC1 y únicamente mediarían el incremento de la fosforilación de eIF4E (170). Sin embargo, en algunos casos, como en líneas de cáncer de pulmón de célula no pequeña se ha demostrado que la inhibición de MNK con CGP57380 es capaz de reducir la fosforilación de AKT en presencia de rapamicina (75), al igual que apMNKQ2, mientras que en células HeLa CGP57380 incrementa la fosforilación de AKT y no bloquea el incremento inducido por rapamicina (195). Otros autores sugieren que la fosforilación de eIF4E en células de leucemia incrementa la actividad de AKT, aunque se desconoce el mecanismo, y que la inhibición con CGP57380 disminuye su actividad (213). De forma contraria, también se han publicado estudios que indican que la inhibición de las MNKs promueve la señalización por AKT; el silenciamiento de MNK1, MNK2 o ambas en células HeLa, incrementa los niveles de DEPTOR, que a través de la inhibición de mTORC1 activa AKT (164). Por tanto, el papel de MNK en la modulación de AKT no está claro y parece ser altamente dependiente del contexto celular (25)

Otros mecanismos de resistencia a everolimus pueden estar relacionados con los incrementos en la expresión de XIAP y ciclina D1. El control de los niveles de XIAP y Ciclina D1 por apMNKQ2, ya sea a través de la regulación de su traducción dependiente de cap por eIF4E o dependiente de IRES, favorecida en presencia de rapamicina (187–189), se refleja en el bloqueo del incremento de sus niveles que induce everolimus (Figura 25), lo que puede contribuir al efecto sinérgico observado.

1.4. Efecto de apMNKQ2 sobre la capacidad metastásica

Además de tener un papel relevante en supervivencia y proliferación, las MNKs se han relacionado con las capacidades de migración e invasión y la EMT en cáncer, determinantes para el desarrollo de metástasis. Entre las propiedades antitumorales de apMNKQ2 destaca la inhibición de procesos de migración e invasión, tanto *in vitro* en distintas líneas celulares y en un modelo de inducción de la EMT por TGF β , como *in vivo* (321). La relevancia de MNK en la inducción de la EMT por TGF β se ha demostrado con el silenciamiento de las MNKs y con diversos inhibidores como CGP57380 o BAY1143269 (125,224). A nivel molecular, apMNKQ2 inhibe la EMT inducida por TGF β en las células MCF10A, de acuerdo a la expresión de N-cadherina, MMP2 y de los factores de transcripción ZEB1 y Slug (Figuras 29, 31 y 32). La regulación de ZEB1 por MNK se ha comprobado en líneas de cáncer de páncreas con aproximaciones genéticas y el empleo del inhibidor CGP57380 (269), mientras que la relación entre MNK y Slug se ha establecido en líneas de próstata tras el silenciamiento de MNK1 (270) y en presencia de los degradadores de MNK derivados de retinamida y galeterona (162,163,219,221,270). El mecanismo de inhibición de la EMT por apMNKQ2 podría estar basado, por tanto, en la modulación de estos factores de transcripción, que a su vez controlan la expresión de marcadores mesenquimales y epiteliales (267,268). Curiosamente, apMNKQ2 produce un incremento de los niveles de Snail, a pesar de que diversos estudios han demostrado que MNK

regula positivamente la expresión de Snail a nivel traduccional (125,72,270,224,162,163,219,221,270). Los factores de transcripción involucrados en la EMT se encuentran regulados entre sí a través de diferentes mecanismos que no aún no han sido establecidos y que parecen depender del tipo celular y del contexto de señalizaciones activas (443). En nuestro modelo, la reducción de los niveles de proteína de ZEB1 y Slug podría explicar el incremento de Snail a nivel de mRNA y proteína como un mecanismo compensatorio, del mismo modo que ocurre en células de cáncer oral y carcinoma hepatocelular tras el empleo de siRNA de Slug y ZEB1, respectivamente (444,445). Uno de los mecanismos de autorregulación más estudiado consiste en el incremento transcripcional de ZEB1 por Snail en respuesta a TGF β (443). Por otro lado, los niveles de Slug se incrementan con la sobreexpresión de Snail o ZEB1 en una línea epitelial mamaria (446), aunque también se ha descrito que Snail reprime la transcripción de Slug en células tumorales (444,447). En células MCF10A tratadas con ApMNKQ2 y TGF β este tipo de regulación positiva entre los EMT-TFs podría estar produciéndose a nivel transcripcional, ya que se observa un incremento de los niveles de mRNA de ZEB1 y Slug (Figura 30). Sin embargo, los niveles de proteína disminuyen, lo que indica que apMNKQ2 actúa a nivel postranscripcional.

Snail actúa como un represor de la transcripción de E-cadherina (448), por lo que los niveles elevados de esta proteína podrían asociarse con la disminución de E-cadherina a nivel de mRNA y proteína que tienen lugar en presencia de apMNKQ2 solo y en combinación con TGF β . A pesar de reducir los niveles de E-cadherina, marcador típico epitelial, apMNKQ2 disminuye la migración inducida por TGF β . En la línea MCF10A, el silenciamiento de N-cadherina reduce la movilidad celular en presencia de TGF β (449), mientras que la pérdida de E-cadherina resulta igualmente en una pérdida de la movilidad (450), lo cual concuerda con el efecto inhibitorio de apMNKQ2 sobre la migración en paralelo a un descenso de los niveles de ambas cadherinas.

Resultados similares respecto a la expresión de ZEB1 y Snail a nivel de proteína y mRNA (figura 33) se han observado en la línea MDA-MB-231, la cual presenta un fenotipo mesenquimal y alta capacidad de migración. En líneas de cáncer de mama mesenquimales ZEB1 funciona como el principal factor de transcripción en el mantenimiento de la EMT, mientras que otros factores como Snail, Slug, ZEB2 o Twist tienen una relevancia menor, lo que destaca el papel de apMNKQ2 como inhibidor de este proceso (446).

Otra proteína modulada por MNK que puede tener un papel relevante en migración y metástasis es NDRG1. ApMNKQ2 produce un incremento de la fosforilación de NDRG1 a partir de las 8 h sin afectar a sus niveles (Figura 34), a diferencia del inhibidor MNK-I1, que disminuye indirectamente su fosforilación e incrementa su expresión a nivel de proteína y a nivel de mRNA en líneas de cáncer de mama, entre las que se encuentran las MDA-MB-231. La disminución de la fosforilación de NDRG1 se ha validado también en MEF KO para MNK1 y dobles KO para MNK1 y MNK2 y en ensayos con CGP57380 (24). Las discrepancias observadas pueden ser debidas a diferencias en la capacidad para inhibir a las MNKs o a posibles efectos inespecíficos de apMNKQ2.

El incremento en la fosforilación de NDRG1 con apMNKQ2 ocurre en paralelo a un aumento de la expresión de SGK1 (Figura 35), cuya inhibición farmacológica bloquea la fosforilación de

NDRG1 (Figura 36). Estos resultados sugieren que apMNKQ2 modula la fosforilación de NDRG1 a través de SGK1, a diferencia de los que ocurre con MNK-I1, que no afecta a los niveles de SGK1 (24).

La mayoría de estudios publicados sobre el papel de SGK1 en cáncer han demostrado su carácter protumoral, modulando casi todos los aspectos del desarrollo tumoral y metástasis a través de la modificación postraduccional de proteínas y regulación de la expresión génica de múltiples rutas de señalización (451). SGK1 tiene una alta homología con AKT, comparten algunos sustratos y también es activada por la señalización de PI3K, aunque a diferencia de AKT, sus sustratos específicos, entre los que se encuentra NDRG1, y funciones celulares no están ampliamente caracterizados (452). Su expresión se encuentra incrementada en la mayoría de tumores y en general se ha asociado con un peor pronóstico (451). De forma minoritaria, existen algunos estudios en cáncer de mama que han relacionado la menor expresión de SGK1 con una menor supervivencia (453) y un incremento en su expresión como un factor de pronóstico favorable dentro de un panel de 38 genes (454). La expresión de SGK1 se estimula en respuesta a una amplia variedad de estímulos como glucocorticoides, factores de crecimiento como el FGF o PDGF, insulina, citoquinas como TNF α o TGF β , y diversos tipos de estrés celular como hipoxia, acidosis metabólica, radiación ultravioleta, daño en el DNA, estrés oxidativo, estrés osmótico etc. (453,455,456). La inducción de la expresión de SGK1 por apMNKQ2 podría estar relacionada con la generación de algún tipo de estrés celular o con la modulación de la actividad de algunos factores de transcripción relacionados con la expresión de SGK1 como p53 o Sp1 (455) o de las rutas de señalización y moléculas involucradas en su control transcripcional (p38 MAPK, quinasas RAF, ERK, AR, mTOR, YAP, c-Fms, AMP cíclico, ROS, óxido nítrico, etc.) (451,457). El incremento en SGK1 se ha asociado con mecanismos de resistencia a quimio y radioterapias (458), por lo que podría tener un papel similar para apMNKQ2. Sin embargo, en nuestro caso la inhibición de SGK1 con GSK650394 (SGKi) tiene un efecto leve sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 que no modifica el efecto inhibitorio de apMNKQ2 cuando ambos compuestos se combinan (Figura 37).

En las líneas de cáncer de mama T47D y MDA-MB-231 la sobreexpresión de SGK1 reduce las capacidades de migración e invasión, mientras que su silenciamiento tiene un efecto contrario, aunque, a diferencia de lo que ocurre en nuestro caso, el incremento de SGK1 da lugar a una sobreexpresión de NDRG1 (459). SGKi no afecta a la adhesión o la capacidad de migración de la línea MDA-MB-231 en situación basal, como se ha descrito previamente (24), pero en presencia de apMNKQ2 la inhibición de la migración y adhesión se revierten parcialmente al inhibir SGK1 (Figura 38), lo que sugiere que alguno de los sustratos de SGK1 (457) podría estar involucrado en estos efectos antitumorales de apMNKQ2.

El papel de NDRG1 como supresor de metástasis en cáncer de mama se ha demostrado en diversos estudios (459–461). NDRG1 controla multitud de procesos y rutas de señalización importantes en cáncer, aunque la relevancia de la fosforilación de NDRG1 no se ha determinado extensamente y no está claro si tiene algún papel en el control de la migración. Algunos estudios han relacionado el estado de fosforilación de NDRG1 con procesos relevantes en cáncer, como la

inhibición de la señalización de NF- κ B y la producción de quimioquinas relacionadas con angiogénesis e infiltración de células del sistema inmune en cáncer de páncreas, que se suprime por la fosforilación de NDRG1 en la Ser330 y la Thr346 (462,463). Por otro lado, la fosforilación de NDRG1 varía a lo largo del ciclo celular y podría tener un papel relevante en la fase de mitosis (464). El incremento de la fosforilación de NDRG1 durante la mitosis apoyaría la idea de una parada mitótica con apMNKQ2. Otros compuestos como los quelantes de hierro Dp44mT, DpC y desferriozamina también inducen un incremento de la fosforilación en la Ser330 y Thr346 en líneas tumorales de próstata y páncreas (465,466) que podrían ser relevantes en el efecto antitumoral de estos compuestos, aunque no se ha relacionado con ningún proceso en concreto.

La disminución de la fosforilación de NDRG1 no parece ser relevante en la inhibición de la migración de la línea MDA-MB-231 en el caso de MNK-I1, ya que ocurre de igual modo con o sin el silenciamiento de NDRG1 (24). En nuestro caso, cuando se elimina la inducción de la fosforilación de NDRG1 por apMNKQ2, los efectos inhibitorios sobre la migración y adhesión se reducen parcialmente (Figura 38) y los cambios sobre estructuras del citoesqueleto se ven modificados (Figura 39). El papel en la inhibición de la migración e invasión tumorales de NDRG1, sin tener en cuenta su estado de fosforilación, se ha relacionado con la remodelación del citoesqueleto por distintos mecanismos, como la inhibición de la polimerización de los filamentos de actina y la formación de las fibras de estrés al suprimir la señalización de ROCK1/pMLC2 (467), la inhibición de la formación de adhesiones focales a colágeno mediada por FAK/Paxilina (468) o la inhibición de filopodios regulando la activación de CDC42 (469). Los efectos sobre las adhesiones focales, las fibras de estrés y la inhibición de la migración y adhesión celular a colágeno se han observado también en presencia de las tiosemicarbazonas Dp44mT y DpC (467,468), que inducen un incremento en la fosforilación de NDRG1, por lo que ésta podría tener algún papel en el efecto antimigratorio.

Como el incremento parcial de la migración y adhesión causado por SGK1 en células tratadas con apMNKQ2 podría estar asociado con el control de la fosforilación de NDRG1 o con la modulación de otros sustratos de SGK1/2 (457), el papel concreto de la fosforilación de NDRG1 se trató de estudiar en ensayos preliminares a través de la expresión transitoria de mutantes de NDRG1 en el residuo fosforilable Thr346 (Figura 40). Sin embargo, los resultados obtenidos son limitados y no han permitido esclarecer la relevancia de la fosforilación de NDRG1 en el efecto de apMNKQ2, siendo necesaria la generación de mutantes de NDRG1 en todos los residuos que podrían fosforilarse por SGK1: Thr346, Thr356, Thr366 y Thr328, exceptuando la Ser330, también sustrato de SGK1, pero que no se modifica con apMNKQ2 (datos no mostrados) (384).

Los mismos efectos de apMNKQ2 sobre NDRG1 y SGK1 se han observado en las MDA-MB-231 con sistemas basados en nanopartículas de hierro para incorporar el aptámero al interior celular, lo que verifica la capacidad de apMNKQ2 para inducir este mecanismo (470).

2. Estudio de las -ómicas

2.1. Estudio del proteoma

Los estudios de expresión diferencial de mRNA y proteínas realizados por técnicas proteómicas y RNAseq han permitido determinar de forma global los cambios moleculares que produce apMNKQ2 a nivel del transcriptoma y proteoma (Figura 50).

En el análisis diferencial de proteínas entre células control y tratadas con apMNKQ2 se identificaron cambios en modificaciones postraduccionales (Cofilina, fosfoglicerato mutasa, eEF2), incrementos de niveles de proteínas (STIP/G6PD, CCT8, hnRNPK, anexina A2, anexina A5, prdx6, GLO1, ROK2 PSMB2) y disminuciones (talina, CCT2, estatmina, γ actina) (Figuras 41, 42 y Tabla 6).

La PGAM1 se encuentra sobreexpresada en algunos tipos tumorales y promueve procesos de proliferación y metástasis (471). El papel de las modificaciones postraduccionales de la fosfoglicerato mutasa en el efecto de apMNKQ2 se estableció a través del estudio de su actividad en lisados celulares, ya que el incremento en el punto isoelectrico observado podría asociarse con la pérdida de modificaciones postraduccionales y una consecuente disminución de la actividad enzimática (336). Se observó una disminución parcial de la actividad PGAM (Figura 45), que podría tener un papel en el mecanismo de apMNKQ2 reduciendo la capacidad celular de obtener energía mediante la glicolisis y, con ello, la proliferación celular (335,472), o ser parte de una disminución generalizada del metabolismo energético en una situación de inducción de apoptosis (473). La PGAM1 también facilita la migración en células tumorales de forma independiente de su actividad catalítica mediante la interacción con la α actina de músculo esquelético (ACTA2) y la modulación de los filamentos de actina en líneas de cáncer de mama, aunque no se ha determinado la relevancia de las modificaciones postraduccionales en estos procesos (474).

La inducción de la expresión del resto de enzimas identificadas podría relacionarse con mecanismos de compensación frente a la inducción de un estado de estrés oxidativo y toxicidad por apMNKQ2. Así, el incremento de la G6PD podría favorecer la ruta de las pentosas fosfato y, con ello, la generación de NADPH para mantener el balance redox (392), mientras que la prdx6 sirve como defensa frente al estrés oxidativo, catalizando la reducción del peróxido de hidrógeno (393). Por otro lado, la GLO1, junto a la GLO2, cataliza la conversión del metilglioxal, un subproducto del metabolismo de la glucosa que se puede incrementar en situaciones de estrés oxidativo (475), a D-lactato. De este modo se evita la toxicidad del metilglioxal asociada a la glicación de proteínas (394).

En el conjunto de proteínas identificadas que forman parte o regulan la dinámica del citoesqueleto destacan la cofilina, la estatmina, la talina y la γ actina. Todas ellas se encuentran sobreexpresadas en algunos tipos tumorales, en general correlacionadas con peor pronóstico (389,476–481), y su disminución da lugar a una menor capacidad de migración e invasión (389,480–485). La

disminución en la talina, que constituye parte de las adhesiones focales, podría también relacionarse con la disminución de la capacidad de adhesión celular que produce apMNKQ2 (480), mientras que los efectos sobre la estatmina podrían asociarse con la pérdida de la estructura y dinámica de los microtúbulos y una parada mitótica del ciclo celular (486). Además, la disminución de γ actina también se ha relacionado con defectos en la mitosis que retrasan su progresión (487) y con un incremento en la fosforilación de la cofilina (485). En el caso de la cofilina, los ensayos realizados indican que su fosforilación en la Ser3 podría tener alguna relevancia en los procesos de inhibición de la migración por apMNKQ2 (Figura 46). La expresión estable de los mutantes de cofilina permitirá confirmar la relevancia de la fosforilación de este residuo en el mecanismo de apMNKQ2 y los estudios de las cascadas de señalización que regulan el estado de fosforilación de la cofilina permitirán identificar a que nivel se encuentra implicado apMNKQ2.

Entre las proteínas relacionadas con el citoesqueleto también se encuentran las anexinas A2 y A5. La anexina A5, utilizada como un marcador de células apoptóticas por su traslocación a la parte externa de la membrana celular (488), también incrementa su expresión con compuestos que inducen apoptosis como el cisplatino (489) o 2,4,3',5'-tetrametoxiestilbeno (490), por lo que en nuestro caso puede ser reflejo de la inducción de muerte celular por apMNKQ2. La anexina A2 tiene un papel relevante en el tráfico de membrana y en la dinámica del citoesqueleto de actina asociado a la membrana y se ha relacionado con mecanismos protumorales y antitumorales en función del tipo de cáncer, aunque en cáncer de mama promueve la progresión tumoral mayoritariamente (488). Por otro lado, en la línea MDA-MB-231 la anexina A2 se ha relacionado con la actividad de la cofilina, de manera que su silenciamiento se acompaña de una desfosforilación de la cofilina, una disminución de la capacidad de endocitosis del receptor EGFR y, en este caso, un incremento del número de metástasis (491).

El estrés proteotóxico, generado por la acumulación de proteínas mal plegadas o aberrantes, desencadena diversos mecanismos de resistencia que incluyen la expresión de chaperonas y subunidades del proteasoma (492). La generación de estrés proteotóxico en presencia de apMNKQ2 podría explicar el incremento de las chaperoninas CCT (493), que participan en el plegamiento de aproximadamente el 10% del proteoma, incluyendo proteínas como la tubulina y la actina (494), o de subunidades del proteasoma, como ocurre con otros compuestos como el paclitaxel (495), el ácido retinoico o el trióxido de arsénico (496). Por otro lado, la expresión de la subunidad PSMB2 se incrementa tras la inhibición de XIAP en células de leucemia, por lo que dicho mecanismo podría desencadenarse igualmente con apMNKQ2 (497). El aumento de los niveles de hnRNPK también podría producirse como respuesta al daño en el DNA (498) y funcionar como un mecanismo de resistencia a la apoptosis (499). Por último, el incremento en la fosforilación en la Thr56 de eEF2 inducido por apMNKQ2 sugiere una inhibición de la traducción en la fase de elongación (390), lo que concuerda con la disminución de la síntesis global de proteínas observada 24 h tras el tratamiento con el aptámero (Figura 1 Anexo). La inhibición de la elongación podría ser el resultado de la modulación por apMNKQ2 de la actividad de la quinasa de eEF2 (eEF2K) o de alguna de las proteínas y rutas involucradas en la regulación de esta quinasa (MAPKs, mTORC1, proteína quinasa activada por AMP (AMPK), calmodulina, etc.)

o el resultado de un estado de baja energía producido por la alteración de rutas metabólicas u otro tipo de estrés celular (500).

Ninguna de las proteínas identificadas tiene relación directa con MNK1 en cáncer de acuerdo a la bibliografía, aunque las anexinas A2 y A5 se han identificado como proteínas reguladas por BDNF de forma dependiente de MNK1 en otro estudio proteómico en neuronas de ratón KO para MNK1 (140). Los cambios en los niveles de las proteínas identificadas, por tanto, pueden ser el resultado final de rutas de señalización o procesos celulares alterados en presencia de apMNKQ2, como situaciones de estrés oxidativo, inducción de apoptosis o la modulación del citoesqueleto, sin ser dianas directas de apMNKQ2. También podría tratarse del resultado de una señalización independiente de MNK causada por apMNKQ2 o proteínas cuya relación con MNK no se ha establecido previamente.

Los análisis de expresión diferencial de proteínas mediante 2D-DIGE presentan algunas limitaciones que pueden explicar la ausencia de detección de proteínas moduladas por apMNKQ2 identificadas previamente por inmunodetección, como MNK1, MCL1 o XIAP. Entre estas limitaciones destaca la baja sensibilidad para detectar proteínas con unos niveles reducidos de expresión, que además pueden quedar enmascaradas por proteínas más abundantes. Además, proteínas de igual masa molecular y punto isoelectrico comparten la misma localización en el gel, lo que imposibilita la determinación de la abundancia de cada una de ellas. Por otro lado, las proteínas altamente hidrofóbicas, las de gran tamaño y aquellas con puntos isoelectricos extremos presentan una baja resolución en la 2D-DIGE que dificulta su detección (501). Por último, hay proteínas que no se marcan por Cys, como eIF4E, y otras, como 4EBP2, cuyos péptidos no se ionizan, por lo que no pueden identificarse por espectrometría de masas MALDI-TOFF (502).

2.2. Estudio del transcriptoma

Los análisis de enriquecimiento en rutas de señalización y procesos biológicos de la alteración del transcriptoma que produce apMNKQ2 han permitido organizar y dar contexto biológico al conjunto de genes identificados (Figura 48). Algunas de las categorías que agrupan varios genes identificados se relacionan directamente con los efectos antitumorales demostrados que produce apMNKQ2 como la apoptosis o migración celular. Entre los genes relacionados con migración se puede destacar la disminución de la endotelina-1 (EDN1), un péptido vasoactivo cuya señalización está implicada en múltiples aspectos de la progresión tumoral y metástasis (503,504) la claudina-5 (CLDN5), una proteína de las uniones estrechas celulares asociada con menor supervivencia en cáncer de mama (505,506), EphA2, receptor de la proteína de membrana efrinas sobreexpresado en cáncer de mama y relacionado con el desarrollo tumoral (507) o quinasas que participan en diversas rutas de señalización relevantes en cáncer como PKC ϵ (PRKCE) (508) o PI3K γ (PIK3CG) (509,510). Curiosamente, se produce una reducción del mRNA de Snail (SNAIL), que contrasta con los resultados de expresión de proteína y mRNA obtenidos a las 24 h, donde se observa un incremento (Figura 33) y una disminución del mRNA tanto de E-cadherina (CDH1) como de N-cadherina (CDH2).

El elevado número de genes asociados con la categoría de GO de regulación de la apoptosis concuerdan con la idea de que los efectos de apMNKQ2 sobre la viabilidad celular se podrían asociar principalmente a una inducción de la apoptosis. Los genes regulados por apMNKQ2 también están relacionados con procesos de angiogénesis e inflamación. El efecto de apMNKQ2 sobre la inflamación aún no se ha determinado, mientras que el caso de la angiogénesis, se ha observado una reducción de la densidad vascular de tumores de células MDA-MB-231 en ratón (470). En la categoría de GO angiogénesis, destaca la disminución de VEGFA y su receptor VEGFR1 (FLT1), uno de los principales ejes moduladores de la vascularización tumoral (511) que también se modifica en presencia de otros inhibidores de MNK (180,225,270).

En relación con la inflamación se observa un conjunto de genes que regulan la señalización de la IL-10, IL-4, IL-13 e IL-17 y una menor expresión de los transcritos de las IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL12, IL20 y la quimioquina CXCL2. Otros genes que también se encuentran regulados por apMNKQ2 y tienen un papel relevante en inflamación, respuesta inmune y diversos aspectos de la progresión tumoral son la ciclooxigenasa 2 (COX2), que contribuye a la carcinogénesis a través de la sobreproducción de prostaglandinas (512), y el factor de transcripción BCL6, que se encuentra amplificado en hasta el 50 % de tumores de mama y actúa como represor de cientos de genes, algunos implicados en la detección del daño en el DNA o el control del ciclo celular (513). La regulación de algunas citoquinas como IL-1 β e IL-6 se ha descrito previamente para otros inhibidores de MNK (162,224,204) y, al igual que estos inhibidores, apMNKQ2 podría funcionar *in vivo* modulando el microambiente tumoral.

Respecto a las rutas de señalización moduladas por apMNKQ2 se observa un enriquecimiento componentes de la ruta de las MAPKs (Figura 7A anexo) que incluye genes que codifican proteínas que inducen esta señalización (VEGF (514), ephrina A2 (515), neurotrofina 3 (516), interleuquinas (517), GADD45 (518)) y algunos de sus respectivos receptores (VEGFR1, EphA2), las fosfatasas de MAPKs (DUSP1, 5 y 6), para las cuales se ha descrito un papel tanto protumoral como antitumoral (519) o Ras-GRF1, que facilita el intercambio de GTP/GDP de Ras (520), así como los factores de transcripción c-Myc, c-Fos, c-Jun y JunB cuya expresión responde a la señalización por MAPK (521–523).

En el caso de la señalización por TNF (Figura 7B anexo), además de una disminución de los transcritos de miembros de la superfamilia del receptor de TNF como DcR2 (TNFRSF10D) o del ligando OX40L (TNFSF4), se observa una disminución de genes cuya expresión se encuentra regulada por TNF, como algunas interleuquinas, CXCL2, endotelina1 o de nuevo los factores de transcripción c-Fos, c-Jun y JunB (524–526). La regulación postraducciona de TNF α se ha relacionado con la actividad de las MNKs a través de dos de sus sustratos, hnRNPA1 y PSF, y sus niveles se reducen en presencia de diversos inhibidores de MNK (162,204,224), por lo que apMNKQ2 podría producir mediante este mecanismo la disminución la señalización por TNF.

El análisis de las interacciones entre proteínas indica que un número elevado de genes muestran cierto grado de correlación entre sí para aquellos cuya expresión disminuyen con apMNKQ2 (Figura 49). Los factores de transcripción que dependen de las rutas de MAPK y TNF (c-Myc, c-

Fos, c-Jun y JunB) constituyen los principales nodos de conexión observados en el conjunto de genes con expresión disminuida por apMNKQ2, junto al factor de transcripción EGR1 y el represor BCL6. ApMNKQ2 disminuye la expresión del mRNA de dos miembros de la familia de factores de transcripción Fos (c-Fos y FosB), otros dos de la familia Jun (c-Jun y JunB) y el factor de transcripción dependiente de AMPc 3 (ATF3), un miembro de la familia de elementos de respuesta a AMPc (CREB). Las proteínas de estas familias forman dímeros que reciben el nombre de proteína activadora 1 (AP-1), un protooncogén que regula la expresión de genes implicados en proliferación, supervivencia, migración, invasión o angiogénesis. Por otro lado, ATF3 forma homodímeros y heterodímeros con otras proteínas CREB y proteínas de unión a CCAAT/enhancer (C/EBP) y se ha relacionado con el control transcripcional de genes clave en metabolismo, inmunidad y también oncogénesis. Estos factores de transcripción se regulan por múltiples rutas de señalización oncogénicas y se encuentran frecuentemente desregulados en cáncer (527–530). El gen EGR1 codifica la proteína 1 de respuesta al crecimiento temprano (EGR1), cuya transcripción se activa a través de la señalización por MAPK, concretamente ERK1/2. Se ha relacionado con las etapas iniciales de progresión tumoral y participa en proliferación, metástasis, angiogénesis y respuesta inmune. Sus mecanismos específicos se desconocen, aunque se han asociado con la activación transcripcional de ciclina D1, Slug, Snail, VEGFA, MMP1, MMP9, ZEB1 o β -catenina (531), algunas de las cuales se ven disminuidas a nivel de proteína por apMNKQ2.

La capacidad de apMNKQ2 para modular la expresión de estos oncogenes claves en supervivencia y proliferación celular puede ser la responsable de los efectos antitumorales observados en las distintas líneas celulares tras el tratamiento con apMNKQ2. Por ejemplo, la disminución de ATF3 podría explicar la inhibición de la migración y EMT inducida por TGF β , ya que se ha demostrado que, en líneas de cáncer de mama, ATF3 se induce por TGF β y aumenta la expresión de genes como Slug, Snail o Twist y con ello, las capacidades de migración e invasión (532,533). TGF β induce la expresión de c-Fos, FosB y c-Jun, por lo que estos factores de transcripción también podrían participar en este proceso (534).

Dado que múltiples genes se encuentran bajo el control transcripcional de estos factores de transcripción, la reducción de su expresión con apMNKQ2 produce un impacto relevante sobre el transcriptoma, disminuyendo la expresión de un número de genes mayor al esperado para un inhibidor de MNK1, cuyas principales funciones se han descrito a nivel de la traducción. Los cambios a nivel del mRNA total pueden ser el resultado de cambios en la expresión génica o por cambios en el procesamiento del mRNA y control de su estabilidad, procesos relacionados previamente con MNK/eIF4E (49). El papel de MNK como regulador transcripcional no se ha estudiado ampliamente, aunque algunos artículos recientes destacan la regulación a nivel del mRNA de ANGPTL o MMPs, por la expresión de la forma activa de MNK1 (86), y de WEE1, FOXM1 o E2F1, tras la inhibición de MNK con ETC-168 o su silenciamiento, siendo los dos últimos factores de transcripción que modulan un elevado número de genes, por lo que la inhibición de MNK podría tener igualmente un alto impacto en el transcriptoma (78).

Entre los factores de transcripción regulados por apMNKQ2, c-Myc, c-Jun y EGR1 se han relacionado previamente con la actividad de MNK. En un estudio de la expresión de mRNAs por

RNA-seq en una línea de melanoma que sobreexpresa la forma constitutivamente activa de MNK1 (T332D) se identificó una disminución de 22 genes y una sobreexpresión de 63 (p 0.05 y fold change 2.0), entre los cuales destaca con una de las mayores diferencias de expresión EGR1. De forma contraria, la delección de MNK1 por CRISPR/Cas9 produce una disminución de la expresión del mRNA de EGR1 (86). De acuerdo con este resultado, en nuestro caso, la inhibición de MNK1 por apMNKQ2 disminuiría la expresión de EGR1, también como una de las mayores diferencias de expresión respecto al control. Por otro lado, se ha observado que en cardiomiocitos de gato la expresión del mRNA de c-Jun se reduce con la expresión de una forma mutada MNK1 sin actividad quinasa, mientras que no se afecta por cambios en la actividad o niveles de eIF4E, lo que sugiere un mecanismo independiente de la fosforilación de eIF4E y que, de acuerdo con los autores del ensayo, estaría basado en la estabilización del mRNA de c-jun (535). En el caso de c-Myc, la regulación de su expresión por MNK se produce mayoritariamente a nivel traduccional pero para otros inhibidores más selectivos de MNK1 como BAY1143269, la regulación se produce también a nivel transcripcional (224).

Otros genes cuya expresión disminuye por apMNKQ2 y que no aparecen clasificados en ninguna categoría de GO o ruta de señalización, pero que podrían tener un papel relevante en el efecto antitumoral del aptámero son las subunidades de integrinas αE (ITGAE) y $\alpha 9$ (ITGA9), relacionadas con motilidad y adhesión en cáncer de mama triple negativo (536), NOTCH3 (537), TMEM119, sobreexpresada en cáncer de mama y asociada con la regulación de las propiedades de células madre en cáncer de mama (538), ROS1, un protooncogén que codifica un receptor tirosina quinasa (539) o la fosfatasa encargada de desfosforilar a la cofilina en la ser3, la proteína fosfatasa homóloga a Slingshot (SSH1), la cual se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama y páncreas y se asocia con la migración celular y metástasis (540–542). La disminución de SSH1 podría explicar el incremento en la fosforilación de la cofilina observado con apMNKQ2.

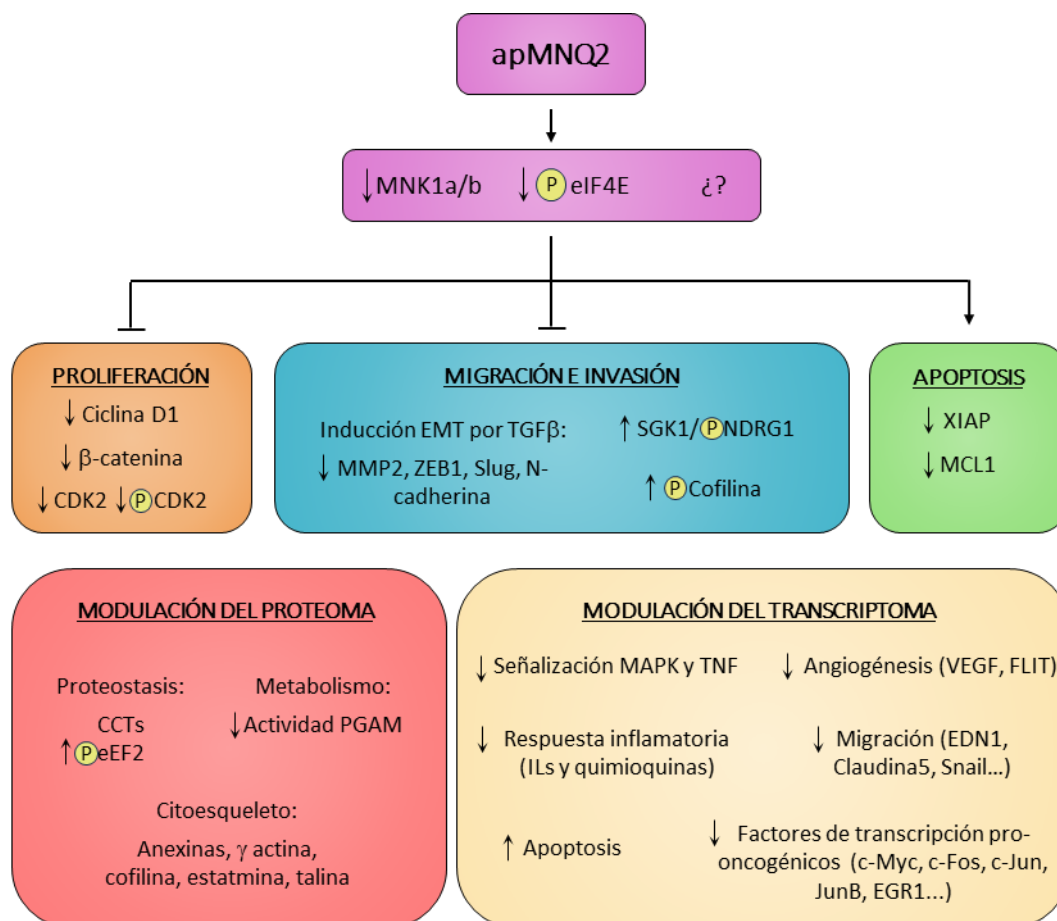


Figura 50. Representación gráfica de los cambios inducidos por apMNKQ2. ApMNKQ2 modula proteínas relacionadas con proliferación, apoptosis, migración e invasión a través de la disminución de los niveles de MNK1a/b, la disminución de la fosforilación de eIF4E y/o mecanismos alternativos a eIF4E.

3. Especificidad de apMNKQ2 y mecanismos de MNK1 alternativos a eIF4E

Los aptámeros son moléculas seleccionadas por su capacidad de unión específica a una diana, aunque se han descrito algunos casos de reactividad cruzada (543–545). La capacidad de unión a MNK1 se ha demostrado *in vitro* en ensayos ELONA y aptawestern blot con MNK1 purificada (southwestern blot utilizando el aptámero como anticuerpo primario), mientras que en sistemas celulares la unión a MNK1 se ha observado mediante colocalización por microscopía de fluorescencia. Otras estrategias planteadas para demostrar la unión de apMNKQ2 a MNK1 incluyen el cambio en la movilidad electroforética de la proteína o la aptaprecipitación del aptámero unido a MNK1.

La capacidad de ApMNKQ2 para unirse a otras proteínas se ha estudiado de forma limitada, pero se ha demostrado que carece de capacidad para unirse a quinasas como MNK2, ERK y p38 α (321). Además, a diferencia de lo que ocurre con los niveles de MNK1, no se han observado variación de los niveles de MNK2 (321), aunque estos resultados deben tomarse con precaución dada la baja especificidad de los anticuerpos comerciales frente a MNK2 (25,49).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los efectos fenotípicos obtenidos por apMNKQ2 en cultivos de líneas celulares son el resultado de la superposición de efectos sobre varias dianas moleculares. Por un lado, a tiempos largos se han observado cambios relacionados con la actividad canónica de MNK: se observa una disminución de la fosforilación de eIF4E y una disminución de los niveles de proteínas regulados por el eje MNK/eIF4E como ciclina D1, β -catenina, CDK2 o ZEB1. A tiempos cortos, cuando no se aprecia una disminución de la fosforilación de eIF4E, se producen una serie de alteraciones en proteínas relacionadas con apoptosis (XIAP, MCL1), proliferación (fosforilación de CDK2) y respuesta a estrés (SGK1 y fosforilación de NDRG1). Además, a las 8 h se observa un cambio pronunciado en los niveles de mRNA, con disminuciones de algunos de factores de transcripción claves en progresión tumoral, como c-Myc, c-Jun y EGR1, que se han relacionado en otras publicaciones con MNK1 por mecanismos desconocidos o independientes de eIF4E, pero también de muchos otros genes que aparentemente no tiene relación con MNK1. Todos los efectos tempranos observados podrían formar parte de mecanismos de señalización mediados por MNK1 alternativos a eIF4E o ser consecuencia de la unión de apMNKQ2 a otras proteínas que tengan en su estructura una región similar a la zona de interacción entre apMNKQ2 y MNK1 y que estén involucradas en procesos de apoptosis, proliferación y migración.

Algunos autores han descrito un “desacoplamiento” entre la fosforilación de eIF4E y los efectos antitumorales que producen algunos inhibidores de MNK como ETC-168 (78) o CGP57380 (148). Además, se ha observado que el silenciamiento de MNK1 y no de MNK2 en líneas de leucemia mielóide incrementa la sensibilidad a trastuzumab sin que se afecte la fosforilación de eIF4E (237). Estos ensayos sugieren que dichos efectos son producidos por mecanismos alternativos a eIF4E o inespecíficos. Con el objetivo de identificar nuevos sustratos de MNK, Grzmil et al. realizaron ensayos de fosfoproteómica utilizando dos inhibidores de MNK (CGP57380 y cercosporamida) con diferentes *off-targets* para identificar aquellas fosforilaciones que varían con ambos inhibidores y que, por tanto, serían específicas de MNK. Estos ensayos detectaron cambios en la fosforilación de 21 proteínas, las cuales podrían constituir nuevos sustratos de MNK y nuevos mecanismos de señalización asociados. Las proteínas identificadas se agruparon en las categorías de GO de organización de los filamentos de actina, regulación postranscripcional de la expresión génica y transducción de señales (226).

Otros estudios apuntan a la existencia de mecanismos de MNK independientes de su actividad quinasa. Los efectos que produce la inhibición de la actividad catalítica de una enzima no siempre se corresponden con los que se producen tras el silenciamiento de una proteína, ya que no solo se elimina su actividad catalítica, sino también cualquier interacción con otras proteínas y procesos que se regulen a través de estas interacciones. Así, Landon et al. observaron que en líneas de linfoma difuso de células B el silenciamiento de MNK disminuye los niveles de proteína de la isoforma eIF4E1 mientras que la inhibición con CGP57380 o cercosporamida únicamente afecta a su estado de fosforilación, por lo que el mantenimiento de los niveles de proteína de eIF4E1 es dependiente de MNK, pero independiente de su actividad quinasa (244). Algunos efectos de apMNKQ2, por tanto, podrían ser el resultado de la disminución de los niveles de MNK1 y no de la inhibición de su actividad catalítica.

Recientemente, el análisis por espectrometría de masas de los complejos inmunoprecipitados de MNK1 y MNK2 ha permitido identificar un conjunto de proteínas que interacciona directamente con las MNKs: 16 proteínas que interaccionan con MNK1, 10 proteínas que interaccionan con MNK2 (entre las cuales se encuentra mTOR) y 24 que interaccionan con ambas. De acuerdo a los análisis de enriquecimiento, las proteínas identificadas están mayoritariamente relacionadas con el control de la traducción, procesamiento de RNA, ciclo celular, regulación transcripcional por p53 y regulación de PTEN (167). La regulación de estas proteínas a través de la interacción con MNK aún no se ha descrito, pero el mecanismo de acción de apMNKQ2 sobre MNK1 podría basarse en la modulación de la actividad de alguna de ellas, ya que apMNKQ2 no parece afectar a la actividad quinasa directamente.

Sin embargo, la falta de estudios de especificidad para la mayoría de inhibidores de MNK, así como posibles *offtargets* de siRNAs o mecanismos compensatorios producidos tras el silenciamiento de las MNKs impide demostrar que todos los mecanismos alternativos a eIF4E no son producto de dicha inespecificidad. Las discrepancias en los efectos antitumorales observados son habituales entre los distintos inhibidores de MNK y no todos son capaces de inhibir la viabilidad, la proliferación o los procesos de migración (204,148,206). En algunos casos un mismo inhibidor produce respuestas distintas según el tipo celular, como ocurre con SEL201, que reduce las capacidades metastásicas sin afectar a la proliferación en líneas de melanoma (72) pero genera parada de ciclo celular en células de carcinoma ductal *in situ* e impide su progresión hacia formas más invasivas (89) y disminuyen la viabilidad en líneas de leucemia mieloide aguda (203). A nivel molecular también se observan diferencias entre las proteínas cuya actividad se modula tras la inhibición de MNK. Por ejemplo, proteínas identificadas bajo el control de MNK1, como Smad2, no han vuelto a ser identificadas en posteriores estudios (125), mientras que el mecanismo de regulación de otras proteínas como la vimentina difiere entre publicaciones, siendo en algunos casos a nivel de estabilidad de la proteína, traducción (148) o niveles de su mRNA (69,269). Además, otras proteínas asociadas con la regulación traduccional de MNK/eIF4E como MCL1 o c-Myc no siempre disminuyen tras la inhibición de MNK (78,251). Aunque la mayoría de estas discrepancias se asocia con diferencias en los modelos experimentales y líneas celulares, podría ser consecuencia de la inhibición inespecífica de otras proteínas, como ocurre con CGP57380 o la cercosporamida, o de la capacidad de inhibir a alguna de las isoformas de MNK con mayor selectividad.

Aunque se tratase de un mecanismo independiente de MNK1, la eficacia de apMNKQ2 se ha demostrado en distintos modelos de cáncer y desconocer la diana o el mecanismo de acción alternativo no invalida su potencial terapéutico, de gran relevancia, ya que no se ha observado una afectación de la viabilidad en fibroblastos (datos pendientes de publicación), por lo que, al igual que MNK1, las dianas a las que afecta apMNKQ2 deben de tener un papel selectivo en cáncer. De forma similar, muchos fármacos se han descubierto siguiendo una estrategia basada en el estudio de los cambios fenotípicos y una posterior identificación de la diana y mecanismo de acción (411). La especificidad de apMNKQ2 sobre MNK1 se podrá comprobar por CRISPR/Cas, determinando si la pérdida de la diana afecta a los efectos antitumorales de apMNKQ2.

Para tener una idea clara del mecanismo de acción es necesario conocer a que moléculas se une el fármaco, que procesos se alteran con esta interacción y cuáles de estas acciones son las que están detrás del efecto terapéutico observado. A pesar del gran número de cambios producidos por apMNKQ2 solo dos de ellos (actividad de SGK1 y fosforilación de la cofilina) son parcialmente responsables de los efectos antimigratorios de apMNKQ2 y ninguno se ha podido relacionar con la inhibición de la viabilidad. Por ello, tanto la especificidad del aptámero en su unión con MNK1 como la demostración de que las proteínas moduladas por el aptámero se corresponden con los efectos antitumorales, continúan siendo estudios necesarios en la validación terapéutica de apMNKQ2.

CONCLUSIONES

- 1) ApMNKQ2 no afecta a la actividad quinasa de MNK1 sobre los sustratos hnRNPA1 y Spry2 y solo afecta a la fosforilación de eIF4E tras la reducción de los niveles de MNK1, lo que podría producirse por un incremento de la degradación de la proteína tras la interacción con el aptámero y no por una inhibición directa de la actividad quinasa de MNK1.
- 2) ApMNKQ2 modula la expresión de proteínas asociadas con la actividad protumoral de MNK (Ciclina D1, β -catenina, ZEB1, CDK2), de acuerdo con la inhibición de la fosforilación de eIF4E, y de otras proteínas reguladas por MNK, como XIAP y MCL1, que podrían presentar mecanismos de control alternativos a eIF4E basados en la regulación de la traducción dependiente de IRES, en el caso de XIAP, y en la estabilidad de la proteína MCL1.
- 3) La combinación de apMNKQ2 con el inhibidor alostérico de mTORC1 everolimus tiene un efecto sinérgico sobre la viabilidad celular que ocurre en paralelo a la reducción de mecanismos que pueden relacionarse con la resistencia a análogos de rapamicina, como el incremento de la fosforilación de eIF4E y AKT y de los niveles de las proteínas XIAP y ciclina D1.
- 4) ApMNKQ2 inhibe la transición epitelio mesénquima (EMT) inducida por TGF β de acuerdo con una disminución de marcadores mesenquimales, factores de transcripción implicados en el desarrollo de la EMT y las capacidades de migración e invasión de células epiteliales de mama. Además de la posible implicación de ZEB1, dos mecanismos desencadenados por apMNKQ2 son responsables, de forma parcial, de los efectos antimigratorios del aptámero en células de cáncer de mama: la fosforilación de la cofilina y la actividad de SGK1.
- 5) A nivel del proteoma, apMNKQ2 regula los niveles de un conjunto de proteínas involucradas en metabolismo, control de la proteostasis y componentes del citoesqueleto, mientras que, a nivel del transcriptoma, reduce la expresión de genes implicados en procesos tumorales como la angiogénesis, la apoptosis, la inflamación o la migración y de componentes de las rutas de señalización por MAPK y TNF, que pueden explicar los efectos antitumorales de apMNKQ2. El control de la expresión de algunos factores de transcripción, como c-Myc, c-Jun, c-Fos o EGR1, podrían ser la consecuencia de la gran variedad de cambios transcripcionales relacionados con oncogénesis y progresión tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May 4;71(3):209–49.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
3. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66.
4. Hong R, Xu B. Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. *Cancer Commun [Internet]*. 2022 Oct 8;42(10):913–36.
5. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *The Lancet*. 2021 May;397(10286):1750–69.
6. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment. *JAMA*. 2019 Jan 22;321(3):288.
7. Mandapati A, Lukong KE. Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022 Aug 17;
8. Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochemical Journal*. 1995 Nov 15;312(1):163–7.
9. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):337–42.
10. Gao B, Roux PP. Translational control by oncogenic signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms [Internet]*. 2015 Jul;1849(7):753–65.
11. Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Apr 6;14(4):261–78.
12. Robichaud N, Sonenberg N, Ruggero D, Schneider RJ. Translational Control in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019 Jul;11(7):a032896.
13. Vaklavas C, Blume SW, Grizzle WE. Translational Dysregulation in Cancer: Molecular Insights and Potential Clinical Applications in Biomarker Development. *Front Oncol*. 2017 Jul 26;7.
14. Song P, Yang F, Jin H, Wang X. The regulation of protein translation and its implications for cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Feb 18;6(1):68.
15. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011 Mar;75(1):50–83.
16. Fukunaga, R. Hunter T. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):1921–33.
17. A J Waskiewicz, A Flynn, C G Proud and JAC. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):1909–20.
18. Scheper GC, Morrice NA, Kleijn M, Proud CG. The Mitogen-Activated Protein Kinase Signal-Integrating Kinase Mnk2 Is a Eukaryotic Initiation Factor 4E Kinase with High Levels of Basal Activity in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb 1;21(3):743–54.
19. Slentz-Kesler K, Moore JT, Lombard M, Zhang J, Hollingsworth R, Weiner MP. Identification of the Human Mnk2 Gene (MKNK2) through Protein Interaction with Estrogen Receptor β . *Genomics [Internet]*. 2000 Oct;69(1):63–71.
20. O’Loghlen A, González VM, Piñeiro D, Pérez-Morgado MI, Salinas M, Martín ME. Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1. *Exp Cell Res [Internet]*. 2004 Oct;299(2):343–55.
21. Scheper GC, Parra JL, Wilson M, van Kollenburg B, Vertegaal ACO, Han ZG, et al. 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*. 2003 Aug 1;23(16):5692–705.

22. Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R. 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.* 2004;24(15):6539–49.
23. Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. Phosphorylation of the Cap-Binding Protein Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E by Protein Kinase Mnk1 In Vivo. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1871–80.
24. Tian S, Wang X, Proud CG. Oncogenic MNK signalling regulates the metastasis suppressor NDRG1. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jul 11;8(28):46121–35.
25. Xie J, Shen K, Jones AT, Yang J, Tee AR, Shen MH, et al. Reciprocal signaling between mTORC1 and MNK2 controls cell growth and oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2021 Jan 13;78(1):249–70.
26. Pyronnet S. Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct;60(8):1237–43.
27. Goto S, Yao Z, Proud CG. The C-terminal domain of Mnk1a plays a dual role in tightly regulating its activity. *Biochemical Journal.* 2009 Oct 15;423(2):279–90.
28. O’Loghlen A, González VM, Jurado T, Salinas M, Martín ME. Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2007 Sep;1773(9):1416–27.
29. Jauch R, Jäkel S, Netter C, Schreiter K, Aicher B, Jäckle H, et al. Crystal Structures of the Mnk2 Kinase Domain Reveal an Inhibitory Conformation and a Zinc Binding Site. *Structure.* 2005 Oct;13(10):1559–68.
30. Jauch R, Cho MK, Jäkel S, Netter C, Schreiter K, Aicher B, et al. Mitogen-activated protein kinases interacting kinases are autoinhibited by a reprogrammed activation segment. *EMBO J.* 2006 Sep 6;25(17):4020–32.
31. McKendrick L, Thompson E, Ferreira J, Morley SJ, Lewis JD. Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G with the Nuclear Cap-Binding Complex Provides a Link between Nuclear and Cytoplasmic Functions of the m 7 Guanosine Cap. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun 1;21(11):3632–41.
32. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Dec;10(12):a033092.
33. Haghighat A, Sonenberg N. eIF4G Dramatically Enhances the Binding of eIF4E to the mRNA 5’-Cap Structure. *Journal of Biological Chemistry.* 1997 Aug;272(35):21677–80.
34. Yanagiya A, Svitkin Y V., Shibata S, Mikami S, Imataka H, Sonenberg N. Requirement of RNA Binding of Mammalian Eukaryotic Translation Initiation Factor 4GI (eIF4GI) for Efficient Interaction of eIF4E with the mRNA Cap. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar 15;29(6):1661–9.
35. Duncan R, Hershey JW. Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry.* 1983;258(11):7228–35.
36. Romagnoli A, D’Agostino M, Ardiccioni C, Maracci C, Motta S, La Teana A, et al. Control of the eIF4E activity: structural insights and pharmacological implications. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2021;78(21–22):6869–85.
37. Flynn A, Proud CG. Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(37):21684–8.
38. Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, Beach CM, et al. Phosphorylation of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4E at Ser-209. *Journal of Biological Chemistry.* 1995 Jun;270(24):14597–603.

39. Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Aug 10;107(32):14134–9.
40. Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO Journal*. 1999;18(1):270–9.
41. Shveygert M, Kaiser C, Bradrick SS, Gromeier M. Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E) Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase Occurs through Modulation of Mnk1-eIF4G Interaction. *Mol Cell Biol*. 2010;30(21):5160–7.
42. Orton KC, Ling J, Waskiewicz AJ, Cooper JA, Merrick WC, Korneeva NL, et al. Phosphorylation of Mnk1 by Caspase-activated Pak2/ γ -PAK Inhibits Phosphorylation and Interaction of eIF4G with Mnk. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Sep;279(37):38649–57.
43. McKendrick L, Morley SJ, Pain VM, Jagus R, Joshi B. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *Eur J Biochem*. 2001 Oct 15;268(20):5375–85.
44. Morley SJ, Naegele S. Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor (eIF) 4E Is Not Required for de Novo Protein Synthesis following Recovery from Hypertonic Stress in Human Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Sep;277(36):32855–9.
45. Herbert TP, Kilhams GR, Batty IH, Proud CG. Distinct Signalling Pathways Mediate Insulin and Phorbol Ester-stimulated Eukaryotic Initiation Factor 4F Assembly and Protein Synthesis in HEK 293 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Apr;275(15):11249–56.
46. Saghir AN, TUXWORTH WJ, HAGEDORN CH, McDERMOTT PJ. Modifications of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) in adult cardiocytes by adenoviral gene transfer: differential effects on eIF4F activity and total protein synthesis rates. *Biochemical Journal*. 2001 Jun 1;356(2):557.
47. Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG. Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4E Markedly Reduces Its Affinity for Capped mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Feb;277(5):3303–9.
48. Zuberek J, WYSLOUCH-CIESZYNSKA A, NIEDZWIECKA A, DADLEZ M, STEPINSKI J, AUGUSTYNIAK W, et al. Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA*. 2003 Jan;9(1):52–61.
49. Proud CG. Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* [Internet]. 2015;1849(7):766–73.
50. Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Morris DL. The developing story of Sprouty and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2014 Sep 18;33(2–3):695–720.
51. DaSilva J, Xu L, Kim HJ, Miller WT, Bar-Sagi D. Regulation of Sprouty Stability by Mnk1-Dependent Phosphorylation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006 Mar;26(5):1898–907.
52. Edwin F, Anderson K, Patel TB. HECT Domain-containing E3 Ubiquitin Ligase Nedd4 Interacts with and Ubiquitinates Sprouty2. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2010 Jan;285(1):255–64.
53. Sharma B, Joshi S, Sassano A, Majchrzak B, Kaur S, Aggarwal P, et al. Sprouty Proteins Are Negative Regulators of Interferon (IFN) Signaling and IFN-inducible Biological Responses. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Dec;287(50):42352–60.
54. Roy R, Huang Y, Seckl MJ, Pardo OE. Emerging roles of hnRNPA1 in modulating malignant transformation. *WIREs RNA* [Internet]. 2017 Nov 8;8(6).
55. Buxadé M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, et al. The Mnks Are Novel Components in the Control of TNF α Biosynthesis and Phosphorylate and Regulate hnRNP A1. *Immunity*. 2005 Aug;23(2):177–89.

56. Guil S, Long JC, Cáceres JF. hnRNP A1 Relocalization to the Stress Granules Reflects a Role in the Stress Response. *Mol Cell Biol.* 2006 Aug;26(15):5744–58.
57. Ziaei S, Shimada N, Kucharavy H, Hubbard K. MNK1 expression increases during cellular senescence and modulates the subcellular localization of hnRNP A1. *Exp Cell Res.* 2012 Mar;318(5):500–8.
58. Shav-Tal Y, Zipori D. PSF and p54 nrb /NonO - multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.* 2002 Nov 6;531(2):109–14.
59. Cobbold LC, Spriggs KA, Haines SJ, Dobbyn HC, Hayes C, de Moor CH, et al. Identification of Internal Ribosome Entry Segment (IRES)- trans -Acting Factors for the Myc Family of IRESs. *Mol Cell Biol.* 2008 Jan;28(1):40–9.
60. Buxadé M, Morrice N, Krebs DL, Proud CG. The PSF·p54nrb Complex Is a Novel Mnk Substrate That Binds the mRNA for Tumor Necrosis Factor α . *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Jan;283(1):57–65.
61. Peng Z, Chang Y, Fan J, Ji W, Su C. Phospholipase A2 superfamily in cancer. *Cancer Lett.* 2021;497(March 2020):165–77.
62. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell.* 1993;72(2):269–78.
63. Börsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J, Dudler T, Kramer RM, Apitz-Castro R, et al. Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(8):4449–58.
64. Hefner Y, Börsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, et al. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(48):37542–51.
65. Manne BK, Campbell RA, Bhatlekar S, Ajanel A, Denorme F, Portier I, et al. MAPK-interacting kinase 1 regulates platelet production, activation, and thrombosis. *Blood.* 2022;140(23):2477–89.
66. Wang X, Wang Y, Zhang Q, Zhuang H, Chen B. MAP Kinase-Interacting Kinase 1 Promotes Proliferation and Invasion of Hepatocellular Carcinoma and Is an Unfavorable Prognostic Biomarker. *Medical Science Monitor.* 2018 Mar 26;24:1759–67.
67. Hou S, Du P, Wang P, Wang C, Liu P, Liu H. Significance of MNK1 in prognostic prediction and chemotherapy development of epithelial ovarian cancer. *Clinical and Translational Oncology.* 2017 Sep 22;19(9):1107–16.
68. Pinto-Díez C, García-Recio EM, Pérez-Morgado MI, García-Hernández M, Sanz-Criado L, Sacristán S, et al. Increased expression of MNK1b, the spliced isoform of MNK1, predicts poor prognosis and is associated with triple-negative breast cancer. *Oncotarget [Internet].* 2018 Mar 2;9(17):13501–16.
69. Grzmil M, Morin P, Lino MM, Merlo A, Frank S, Wang Y, et al. MAP kinase-interacting kinase 1 regulates SMAD2-dependent TGF- β signaling pathway in human glioblastoma. *Cancer Res.* 2011;71(6):2392–402.
70. Ichianagi O, Ito H, Naito S, Kabasawa T, Kanno H, Narisawa T, et al. Impact of eIF4E phosphorylation at Ser209 via MNK2a on tumour recurrence after curative surgery in localized clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2019;10(40):4053–68.
71. Guo Z, Peng G, Li E, Xi S, Zhang Y, Li Y, et al. MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2 promotes proliferation, metastasis, and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2017 Sep 6;7(1):10612.
72. Zhan Y, Guo J, Yang W, Goncalves C, Rzymiski T, Dreas A, et al. MNK1/2 inhibition limits oncogenicity and metastasis of KIT-mutant melanoma. *Journal of Clinical Investigation.* 2017 Oct 16;127(11):4179–92.

73. Fan W, Wang W, Mao X, Chu S, Feng J, Xiao D, et al. Elevated levels of p-Mnk1, p-eIF4E and p-p70S6K proteins are associated with tumor recurrence and poor prognosis in astrocytomas. *J Neurooncol.* 2017;131(3):485–93.
74. Zheng J, Li J, Xu L, Xie G, Wen Q, Luo J, et al. Phosphorylated Mnk1 and eIF4E Are Associated with Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma. Lebedeva I V., editor. *PLoS One.* 2014 Feb 14;9(2):e89220.
75. Wen Q, Wang W, Luo J, Chu S, Chen L, Xu L, et al. 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.* 2016 May 10;7(19):27787–801.
76. Chen Z, Xiao K, Zhang H, Liu C, Yang J, Liang H, et al. MAP kinase-interacting kinase 1 (MNK1) plays as a tumor suppressor in bladder cancer. *Transl Cancer Res.* 2020 Apr;9(4):2588–98.
77. Chrestensen CA, Shuman JK, Eschenroeder A, Worthington M, Gram H, Sturgill TW. MNK1 and MNK2 Regulation in HER2-overexpressing Breast Cancer Lines. *Journal of Biological Chemistry.* 2007 Feb;282(7):4243–52.
78. Ke XY, Chen Y, Tham VYY, Lin RYT, Dakle P, Nacro K, et al. MNK1 and MNK2 enforce expression of E2F1, FOXM1, and WEE1 to drive soft tissue sarcoma. *Oncogene.* 2021 Mar 10;40(10):1851–67.
79. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Mar 18;14(3):185–93.
80. Adesso L, Calabretta S, Barbagallo F, Capurso G, Piloizzi E, Geremia R, et al. Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway. *Oncogene.* 2013 Jun 6;32(23):2848–57.
81. Scheper GC, Parra JL, Wilson M, van Kollenburg B, Vertegaal ACO, Han ZG, et al. 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.* 2003 Aug 15;23(16):5692–705.
82. Mogilevsky M, Shimshon O, Kumar S, Mogilevsky A, Keshet E, Yavin E, et al. Modulation of MKNK2 alternative splicing by splice-switching oligonucleotides as a novel approach for glioblastoma treatment. *Nucleic Acids Res.* 2018 Nov 30;46(21):11396–404.
83. Maimon A, Mogilevsky M, Shilo A, Golan-gerstl R, Obiedat A, Ben-hur V, et al. Article Mnk2 Alternative Splicing Modulates the p38-MAPK Pathway and Impacts Ras-Induced Transformation. *CellReports.* 2014;7(2):501–13.
84. Wendel HG, Silva RLA, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, et al. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007 Dec 15;21(24):000.2-000.
85. Ueda T, Sasaki M, Elia AJ, Chio IIC, Hamada K, Fukunaga R, et al. Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):13984–90.
86. Yang W, Khoury E, Guo Q, Prabhu SA, Emond A, Huang F, et al. MNK1 signaling induces an ANGPTL4-mediated gene signature to drive melanoma progression. *Oncogene.* 2020 Apr 30;39(18):3650–65.
87. Ramamurthy VP, Ramalingam S, Gediya L, Kwegyir-Afful AK, Njar VCO. Simultaneous targeting of androgen receptor (AR) and MAPK-interacting kinases (MNKs) by novel retinamides inhibits growth of human prostate cancer cell lines. *Oncotarget.* 2015;6(5):3195–210.
88. Xu L, Chen Y, Huang Y, Sandanaraj E, Yu JS, Lin RYT, et al. Topography of transcriptionally active chromatin in glioblastoma. *Sci Adv.* 2021 Apr 30;7(18).
89. Guo Q, Li VZ, Nichol JN, Huang F, Yang W, Preston SEJ, et al. MNK1/NODAL Signaling Promotes Invasive Progression of Breast Ductal Carcinoma In Situ. *Cancer Res.* 2019 Apr 1;79(7):1646–57.

90. Kerekatte V, Smiley K, Hu B, Smith A, Gelder F, De Benedetti A. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: A survey of its expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* [Internet]. 1995 Feb 20;64(1):27–31.
91. Li BD, Liu L, Dawson M, De Benedetti A. Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma. *Cancer* [Internet]. 1997 Jun 15;79(12):2385–90.
92. Li BDL, McDonald JC, Nassar R, De Benedetti A. Clinical Outcome in Stage I to III Breast Carcinoma and eIF4E Overexpression. *Ann Surg* [Internet]. 1998 May;227(5):756–63.
93. Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, Cranston DW, Benedetti A de, Harris AL. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br J Cancer*. 2000 Jan;82(1):161–6.
94. Nathan CAO, Liu L, Li BD, Abreo FW, Nandy I, De Benedetti A. Detection of the proto-oncogene eIF4E in surgical margins may predict recurrence in head and neck cancer. *Oncogene*. 1997 Jul 31;15(5):579–84.
95. Haydon MS, Googe JD, Sorrells DS, Ghali GE, Li BDL. Progression of eIF4E gene amplification and overexpression in benign and malignant tumors of the head and neck. *Cancer*. 2000 Jun 15;88(12):2803–10.
96. Berkel HJ, Turbat-Herrera EA, Shi R, de Benedetti A. Expression of the translation initiation factor eIF4E in the polyp-cancer sequence in the colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2001 Jun;10(6):663–6.
97. Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Lee PH, Chang KJ. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in gastric adenocarcinoma and its association with clinical outcome. *J Surg Oncol* [Internet]. 2004 Apr 1;86(1):22–7.
98. Matthews-Greer J, Caldito G, de Benedetti A, Herrera GA, Dominguez-Malagon H, Chanona-Vilchis J, et al. eIF4E as a Marker for Cervical Neoplasia. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2005 Dec;13(4):367–70.
99. Lee JW, Choi JJ, Lee KM, Choi CH, Kim TJ, Lee JH, et al. eIF-4E expression is associated with histopathologic grades in cervical neoplasia. *Hum Pathol*. 2005 Nov;36(11):1197–203.
100. Yang SX, Hewitt SM, Steinberg SM, Liewehr DJ, Swain SM. Expression levels of eIF4E, VEGF, and cyclin D1, and correlation of eIF4E with VEGF and cyclin D1 in multi-tumor tissue microarray. *Oncol Rep*. 2007 Feb;17(2):281–7.
101. Wang S, Lloyd R V., Hutzler MJ, Rosenwald IB, Safran MS, Patwardhan NA, et al. Expression of Eukaryotic Translation Initiation Factors 4E and 2 α Correlates with the Progression of Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2001 Dec;11(12):1101–7.
102. Seki N, Takasu T, Mandai K, Nakata M, Saeki H, Heike Y, et al. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung. *Clin Cancer Res*. 2002 Oct;8(10):3046–53.
103. Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, Dumstorf CA, Dowless MS, McNulty AM, et al. eIF4E Activation Is Commonly Elevated in Advanced Human Prostate Cancers and Significantly Related to Reduced Patient Survival. *Cancer Res*. 2009 May 1;69(9):3866–73.
104. Rosenwald IB, Koifman L, Savas L, Chen JJ, Woda BA, Kadin ME. Expression of the translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 α is frequently increased in neoplastic cells of Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol*. 2008 Jun;39(6):910–6.
105. Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*. 1990 Jun;345(6275):544–7.
106. Rinker-Schaeffer CW, Graff JR, De Benedetti A, Zimmer SG, Rhoads RE. Decreasing the level of translation initiation factor 4E with antisense rna causes reversal of ras-mediated transformation and tumorigenesis of cloned rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer*. 1993 Nov 11;55(5):841–7.

107. De Benedetti A, Joshi-Barve S, Rinker-Schaeffer C, Rhoads RE. 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.* 1991 Nov;11(11):5435–45.
108. Wendel HG, Stanchina E de, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature.* 2004 Mar;428(6980):332–7.
109. Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, et al. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med.* 2004;10(5):484–6.
110. Truitt ML, Conn CS, Shi Z, Pang X, Tokuyasu T, Coady AM, et al. Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. *Cell.* 2015 Jul;162(1):59–71.
111. Graff JR, Konicek BW, Vincent TM, Lynch RL, Monteith D, Weir SN, et al. Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *Journal of Clinical Investigation.* 2007 Sep 4;117(9):2638–48.
112. Nasr Z, Robert F, Porco JA, Muller WJ, Pelletier J. eIF4F suppression in breast cancer affects maintenance and progression. *Oncogene.* 2013 Feb 14;32(7):861–71.
113. Graff JR, Boghaert ER, De Benedetti A, Tudor DL, Zimmer CC, Chan SK, et al. Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras -transformed cloned rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer.* 1995 Jul 17;60(2):255–63.
114. Zhou F fei, Yan M, Guo G fang, Wang F, Qiu H juan, Zheng F meng, et al. Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells. *Medical Oncology.* 2011 Dec 22;28(4):1302–7.
115. Pettersson F, del Rincon S V., Emond A, Huor B, Ngan E, Ng J, et al. Genetic and Pharmacologic Inhibition of eIF4E Reduces Breast Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cancer Res.* 2015 Mar 15;75(6):1102–12.
116. Fan S, Ramalingam SS, Kauh J, Xu Z, Khuri FR, Sun SY. Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer Biol Ther.* 2009 Aug 28;8(15):1463–9.
117. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, Hewitt SM, et al. Overexpression of Phospho-eIF4E Is Associated with Survival through AKT Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2010 Jan 1;16(1):240–8.
118. Lu J, Zang H, Zheng H, Zhan Y, Yang Y, Zhang Y, et al. Overexpression of p-Akt, p-mTOR and p-eIF4E proteins associates with metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. Suzuki H, editor. *PLoS One.* 2020 Feb 5;15(2):e0227768.
119. Carter JH, Deddens JA, Spaulding IV NR, Lucas D, Colligan BM, Lewis TG, et al. Phosphorylation of eIF4E serine 209 is associated with tumour progression and reduced survival in malignant melanoma. *Br J Cancer.* 2016 Feb 4;114(4):444–53.
120. Li Z, Sun Y, Qu M, Wan H, Cai F, Zhang P. Inhibiting the MNK-eIF4E- β -catenin axis increases the responsiveness of aggressive breast cancer cells to chemotherapy. *Oncotarget.* 2017 Jan 10;8(2):2906–15.
121. Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KLB. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res.* 2004;64(23):8639–42.
122. Ruan H, Li X, Xu X, Leibowitz BJ, Tong J, Chen L, et al. eIF4E S209 phosphorylation licenses myc- and stress-driven oncogenesis. *Elife.* 2020 Nov 2;9.
123. Liu S, Zha J, Lei M. Inhibiting ERK/Mnk/eIF4E broadly sensitizes ovarian cancer response to chemotherapy. *Clinical and Translational Oncology.* 2018 Mar 1;20(3):374–81.

124. Jana S, Deo R, Hough RP, Liu Y, Horn JL, Wright JL, et al. mRNA translation is a therapeutic vulnerability necessary for bladder epithelial transformation. *JCI Insight*. 2021 Jun 8;6(11).
125. Robichaud N, Del Rincon S V., Huor B, Alain T, Petrucci LA, Hearnden J, et al. Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene*. 2014;34(16):2032–42.
126. Huang F, Gonçalves C, Bartish M, Rémy-Sarrazin J, Issa ME, Cordeiro B, et al. Inhibiting the MNK1/2-eIF4E axis impairs melanoma phenotype switching and potentiates antitumor immune responses. *Journal of Clinical Investigation*. 2021 Apr 15;131(8).
127. Guo Q, Bartish M, Gonçalves C, Huang F, Smith-Voudouris J, Krisna SS, et al. The MNK1/2-eIF4E Axis Supports Immune Suppression and Metastasis in Postpartum Breast Cancer. *Cancer Res*. 2021 Jul 15;81(14):3876–89.
128. Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):4153–8.
129. Shantz LM, Pegg AE. Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2313–6.
130. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3189–99.
131. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 2012 May 2;485(7396):109–13.
132. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*. 2012 May 22;485(7396):55–61.
133. Feoktistova K, Tuvshintogs E, Do A, Fraser CS. Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Aug 13;110(33):13339–44.
134. Korneeva NL, Song A, Gram H, Edens MA, Rhoads RE. Inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-interacting Kinase (MNK) preferentially affects translation of mRNAs containing both a 5'-Terminal cap and hairpin. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(7):3455–67.
135. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Feb 6;93(3):1065–70.
136. Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O, Rajasekhar VK, et al. Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. Preiss T, editor. *PLoS One*. 2007 Feb 21;2(2):e242.
137. Bagni C, Zukin RS. A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Neuron*. 2019;101(6):1070–88.
138. Napoli I, Mercaldo V, Boyl PP, Eleuteri B, Zalfa F, De Rubeis S, et al. The Fragile X Syndrome Protein Represses Activity-Dependent Translation through CYFIP1, a New 4E-BP. *Cell*. 2008 Sep;134(6):1042–54.
139. Panja D, Kenney JW, D'Andrea L, Zalfa F, Vedeler A, Wibrand K, et al. Two-Stage Translational Control of Dentate Gyrus LTP Consolidation Is Mediated by Sustained BDNF-TrkB Signaling to MNK. *Cell Rep*. 2014 Nov;9(4):1430–45.
140. Genheden M, Kenney JW, Johnston HE, Manousopoulou A, Garbis SD, Proud CG. BDNF stimulation of protein synthesis in cortical neurons requires the MAP kinase-interacting kinase MNK1. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(3):972–84.

141. Xing Z, Zeng M, Hu H, Zhang H, Hao Z, Long Y, et al. Fragile X mental retardation protein promotes astrocytoma proliferation via the MEK/ERK signaling pathway. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;7(46):75394–406.
142. Srivastava A. A novel link between FMR gene and the JNK pathway provides clues to possible role in malignant pleural mesothelioma. *FEBS Open Bio*. 2015 Jan 19;5(1):705–11.
143. Zalfa F, Panasiti V, Carotti S, Zingariello M, Perrone G, Sancillo L, et al. The fragile X mental retardation protein regulates tumor invasiveness-related pathways in melanoma cells. *Cell Death Dis*. 2017 Nov 16;8(11):e3169–e3169.
144. Di Grazia A, Marafini I, Pedini G, Di Fusco D, Laudisi F, Dinallo V, et al. The Fragile X Mental Retardation Protein Regulates RIPK1 and Colorectal Cancer Resistance to Necroptosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;11(2):639–58.
145. Carotti S, Zingariello M, Francesconi M, D'Andrea L, Latasa MU, Colyn L, et al. Fragile X mental retardation protein in intrahepatic cholangiocarcinoma: regulating the cancer cell behavior plasticity at the leading edge. *Oncogene*. 2021 Jun 10;40(23):4033–49.
146. Pedini G, Buccarelli M, Bianchi F, Pacini L, Cencelli G, D'Alessandris QG, et al. FMRP modulates the Wnt signalling pathway in glioblastoma. *Cell Death Dis*. 2022 Aug 18;13(8):719.
147. Lucá R, Averna M, Zalfa F, Vecchi M, Bianchi F, Fata G La, et al. The Fragile X Protein binds mRNAs involved in cancer progression and modulates metastasis formation. *EMBO Mol Med*. 2013;5(10):1523–36.
148. Beggs JE, Tian S, Jones GG, Xie J, Iadevaia V, Jenei V, et al. The MAP kinase-interacting kinases regulate cell migration, vimentin expression and eIF4E/CYFIP1 binding. *Biochemical Journal*. 2015;467(1):63–76.
149. Culjkovic-Kraljacic B, Skrabanek L, Revuelta M V., Gasiorek J, Cowling VH, Cerchietti L, et al. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E elevates steady-state m⁷G capping of coding and noncoding transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Oct 27;117(43):26773–83.
150. Davis MR, Delaleau M, Borden KLB. Nuclear eIF4E Stimulates 3'-End Cleavage of Target RNAs. *Cell Rep*. 2019 Apr;27(5):1397–1408.e4.
151. Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KLB. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *Journal of Cell Biology*. 2005 Apr 25;169(2):245–56.
152. Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KLB. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *Journal of Cell Biology*. 2006 Nov 6;175(3):415–26.
153. Topisirovic I, Siddiqui N, Lapointe VL, Trost M, Thibault P, Bangeranye C, et al. Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J*. 2009 Apr 22;28(8):1087–98.
154. Culjkovic B, Tan K, Orolicki S, Amri A, Meloche S, Borden KLB. The eIF4E RNA regulon promotes the Akt signaling pathway. *Journal of Cell Biology*. 2008 Apr 7;181(1):51–63.
155. Culjkovic-Kraljacic B, Baguet A, Volpon L, Amri A, Borden KLB. The Oncogene eIF4E Reprograms the Nuclear Pore Complex to Promote mRNA Export and Oncogenic Transformation. *Cell Rep*. 2012 Aug;2(2):207–15.
156. Topisirovic I, Guzman ML, McConnell MJ, Licht JD, Culjkovic B, Neering SJ, et al. Aberrant Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Dependent mRNA Transport Impedes Hematopoietic Differentiation and Contributes to Leukemogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec 15;23(24):8992–9002.
157. Phillips A, Blaydes JP. MNK1 and EIF4E are downstream effectors of MEKs in the regulation of the nuclear export of HDM2 mRNA. *Oncogene*. 2008;27(11):1645–9.

158. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y. Targeting mTOR for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2019 Dec 5;12(1):71.
159. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar;168(6):960–76.
160. Grzmil M, Huber RM, Hess D, Frank S, Hynx D, Moncayo G, et al. MNK1 pathway activity maintains protein synthesis in rapalog-treated gliomas. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(2):742–54.
161. Teo T, Yu M, Yang Y, Gillam T, Lam F, Sykes MJ, et al. Pharmacologic co-inhibition of Mnk1 and mTORC1 synergistically suppresses proliferation and perturbs cell cycle progression in blast crisis-chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Lett [Internet]*. 2015 Feb;357(2):612–23.
162. Ramalingam S, Ramamurthy V, Gediya L, Murigi F, Purushottamachar P, Huang W, et al. The Novel Mnk1/2 Degradation and Apoptosis Inducer VNLG-152 Potently Inhibits TNBC Tumor Growth and Metastasis. *Cancers (Basel) [Internet]*. 2019 Mar 3;11(3):299.
163. Ramamurthy VP, Ramalingam S, Gediya LK, Njar VCO. The retinamide <sc>VNLG</sc> -152 inhibits <sc>f-AR</sc> / <sc>AR</sc> -V7 and <sc>MNK</sc> – <sc>eIF</sc> 4E signaling pathways to suppress <sc>EMT</sc> and castration-resistant prostate cancer xenograft growth. *FEBS J*. 2018 Mar 3;285(6):1051–63.
164. Brown MC, Gromeier M. MNK Controls mTORC1:Substrate Association through Regulation of TELO2 Binding with mTORC1. *Cell Rep [Internet]*. 2017 Feb;18(6):1444–57.
165. Bianchini A, Loiarro M, Bielli P, Busà R, Paronetto MP, Loreni F, et al. Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(12):2279–88.
166. Brown MC, Gromeier M. MNK inversely regulates TELO2 vs. DEPTOR to control mTORC1 signaling. *Mol Cell Oncol*. 2017 May 4;4(3):e1306010.
167. Suarez M, Blyth GT, Mina AA, Kosciuczuk EM, Dolniak B, Dinner S, et al. Inhibitory effects of Tomivosertib in acute myeloid leukemia. *Oncotarget [Internet]*. 2021 May 11;12(10):955–66.
168. Reich SH, Sprengeler PA, Chiang GG, Appleman JR, Chen J, Clarine J, et al. 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*. 2018 Apr 26;61(8):3516–40.
169. Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, et al. Activation of Akt and eIF4E Survival Pathways by Rapamycin-Mediated Mammalian Target of Rapamycin Inhibition. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7052–8.
170. Wang X, Yue P, Chan CB, Ye K, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, et al. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Induces Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent and Mnk-Mediated Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2007;27(21):7405–13.
171. Eckerdt F, Beauchamp E, Bell J, Iqbal A, Su B, Fukunaga R, et al. Regulatory effects of a Mnk2-eIF4E feedback loop during mTORC1 targeting of human medulloblastoma cells. *Oncotarget*. 2014;5(18):8442–51.
172. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 Aug 1;
173. Liu S, Wang W, Ning Y, Zheng H, Zhan Y, Wang H, et al. Exosome-mediated miR-7-5p delivery enhances the anticancer effect of Everolimus via blocking MNK/eIF4E axis in non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2022 Feb 8;13(2):129.
174. Wen Q, Wang W, Luo J, Chu S, Chen L, Xu L, et al. 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 [Internet]*. 2016 May 10;7(19):27787–801.

175. Stead RL, Proud CG. Rapamycin enhances eIF4E phosphorylation by activating MAP kinase-interacting kinase 2a (Mnk2a). *FEBS Lett.* 2013;587(16):2623–8.
176. Altman JK, Glaser H, Sassano A, Joshi S, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, et al. Negative Regulatory Effects of Mnk Kinases in the Generation of Chemotherapy-Induced Antileukemic Responses. *Mol Pharmacol.* 2010 Oct;78(4):778–84.
177. Huang X bo, Yang C mei, Han Q mei, Ye X jin, Lei W, Qian W bin. MNK1 inhibitor CGP57380 overcomes mTOR inhibitor-induced activation of eIF4E: the mechanism of synergic killing of human T-ALL cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 Dec 8;39(12):1894–901.
178. Lineham E, Tizzard GJ, Coles SJ, Spencer J, Morley SJ. Synergistic effects of inhibiting the MNK-eIF4E and PI3K/AKT/ mTOR pathways on cell migration in MDA-MB-231 cells. *Oncotarget.* 2018 Mar 6;9(18):14148–59.
179. Altman JK, Szilard A, Konicek BW, Iversen PW, Kroczyńska B, Glaser H, et al. Inhibition of Mnk kinase activity by cercosporamide and suppressive effects on acute myeloid leukemia precursors. *Blood [Internet].* 2013 May 2;121(18):3675–81.
180. Chen S, Cui L, Hu Q, Shen Y, Jiang Y, Zhao J. Preclinical evidence that MNK/eIF4E inhibition by cercosporamide enhances the response to antiangiogenic TKI and mTOR inhibitor in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2020 Sep;530(1):142–8.
181. Knight JRP, Alexandrou C, Skalka GL, Vlahov N, Pennel K, Officer L, et al. MNK Inhibition Sensitizes KRAS -Mutant Colorectal Cancer to mTORC1 Inhibition by Reducing eIF4E Phosphorylation and c-MYC Expression. *Cancer Discov.* 2021 May 1;11(5):1228–47.
182. Godet AC, David F, Hantelys F, Tatin F, Lacazette E, Garmy-Susini B, et al. IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 20;20(4):924.
183. Knauf U, Tschopp C, Gram H. Negative Regulation of Protein Translation by Mitogen-Activated Protein Kinase-Interacting Kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol [Internet].* 2001 Aug 15;21(16):5500–11.
184. Ross G, Dyer JR, Castellucci VF, Sossin WS. Mnk is a negative regulator of cap-dependent translation in Aplysia neurons. *J Neurochem.* 2006 Apr;97(1):79–91.
185. Dyer J, Sossin WS. Characterization of the Role of eIF4G in Stimulating Cap- and IRES-Dependent Translation in Aplysia Neurons. Lyons LC, editor. *PLoS One.* 2013 Sep 3;8(9):e74085.
186. Feng J, Zhou J, Lin Y, Huang W. hnRNP A1 in RNA metabolism regulation and as a potential therapeutic target. *Front Pharmacol.* 2022 Oct 21;13.
187. Shi Y, Sharma A, Wu H, Lichtenstein A, Gera J. 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. *Journal of Biological Chemistry.* 2005 Mar;280(12):10964–73.
188. Shi Y, Frost P, Hoang B, Yang Y, Fukunaga R, Gera J, et al. MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells. *Oncogene.* 2013 Jan 10;32(2):190–7.
189. Shi Y, Yang Y, Hoang B, Bardeleben C, Holmes B, Gera J, et al. Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene.* 2016 Feb 25;35(8):1015–24.
190. Jo OD, Martin J, Bernath A, Masri J, Lichtenstein A, Gera J. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Regulates Cyclin D1 and c-myc Internal Ribosome Entry Site Function through Akt Signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Aug;283(34):23274–87.
191. Shi Y, Sun F, Cheng Y, Holmes B, Dhakal B, Gera JF, et al. Critical Role for Cap-Independent c-MYC Translation in Progression of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2022 Apr 1;21(4):502–10.
192. Shi Y, Yang Y, Hoang B, Bardeleben C, Holmes B, Gera J, et al. Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene.* 2016 Feb 25;35(8):1015–24.

193. Hsu KS, Guan BJ, Cheng X, Guan D, Lam M, Hatzoglou M, et al. Translational control of PML contributes to TNF α -induced apoptosis of MCF7 breast cancer cells and decreased angiogenesis in HUVECs. *Cell Death Differ.* 2016 Mar 18;23(3):469–83.
194. Brown MC, Bryant JD, Dobrikova EY, Shveygert M, Bradrick SS, Chandramohan V, et al. 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.* 2014;88(22):13135–48.
195. Brown MC, Dobrikov MI, Gromeier M. Mitogen-Activated Protein Kinase-Interacting Kinase Regulates mTOR/AKT Signaling and Controls the Serine/Arginine-Rich Protein Kinase-Responsive Type 1 Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation and Viral Oncolysis. *J Virol.* 2014;88(22):13149–60.
196. Tschoop C, Knauf U, Brauchle M, Zurini M, Ramage P, Glueck D, et al. Phosphorylation of eIF-4E on Ser 209 in Response to Mitogenic and Inflammatory Stimuli Is Faithfully Detected by Specific Antibodies. *Molecular Cell Biology Research Communications.* 2000 Apr;3(4):205–11.
197. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, Mclauchlan H, et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal.* 2007 Dec 15;408(3):297–315.
198. Konicek BW, Stephens JR, McNulty AM, Robichaud N, Peery RB, Dumstorf CA, et al. Therapeutic Inhibition of MAP Kinase Interacting Kinase Blocks Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and Suppresses Outgrowth of Experimental Lung Metastases. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1849–57.
199. Liu Y, Sun L, Su X, Guo S. Inhibition of eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation by cercosporamide selectively suppresses angiogenesis, growth and survival of human hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016 Dec;84:237–43.
200. Diab S, Li P, Basnet SK, Lu J, Yu M, Albrecht H, et al. Unveiling new chemical scaffolds as Mnk inhibitors. *Future Med Chem.* 2016 Mar;8(3):271–85.
201. Diab S, Teo T, Kumarasiri M, Li P, Yu M, Lam F, et al. Discovery of 5-(2-(Phenylamino)pyrimidin-4-yl)thiazol-2(3H)-one Derivatives as Potent Mnk2 Inhibitors: Synthesis, SAR Analysis and Biological Evaluation. *ChemMedChem.* 2014 May;9(5):962–72.
202. Li P, Diab S, Yu M, Adams J, Islam S, Basnet SKC, et al. Inhibition of Mnk enhances apoptotic activity of cytarabine in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget.* 2016 Aug 30;7(35):56811–25.
203. Kosciuczuk EM, Kar AK, Blyth GT, Fischietti M, Abedin S, Mina AA, et al. Inhibitory effects of SEL201 in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2019 Dec 24;10(67):7112–21.
204. Reich SH, Sprengeler PA, Chiang GG, Appleman JR, Chen J, Clarine J, et al. 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.* 2018;61(8):3516–40.
205. Yang H, Chennamaneni LR, Ho MWT, Ang SH, Tan ESW, Jeyaraj DA, et al. Optimization of Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinases 1 and 2 Inhibitors for the Treatment of Blast Crisis Leukemia. *J Med Chem.* 2018 May 24;61(10):4348–69.
206. Jin X, Merrett J, Tong S, Flower B, Xie J, Yu R, et al. Design, synthesis and activity of Mnk1 and Mnk2 selective inhibitors containing thieno[2,3-d]pyrimidine scaffold. *Eur J Med Chem.* 2019 Jan;162:735–51.
207. Teo T, Lam F, Yu M, Yang Y, Basnet SKC, Albrecht H, et al. Pharmacologic Inhibition of MNKs in Acute Myeloid Leukemia. *Mol Pharmacol.* 2015 Aug;88(2):380–9.
208. Zhang M, Jiang L, Tao J, Pan Z, He M, Su D, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 4-aniline-thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives as MNK1 inhibitors against renal cell carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bioorg Med Chem.* 2019 Jun;27(11):2268–79.
209. Sansook S, Lineham E, Hassell-Hart S, Tizzard GJ, Coles SJ, Spencer J, et al. Probing the Anticancer Action of Novel Ferrocene Analogues of MNK Inhibitors. *Molecules.* 2018 Aug 23;23(9):2126.

210. Bell JB, Eckerdt FD, Alley K, Magnusson LP, Hussain H, Bi Y, et al. MNK Inhibition Disrupts Mesenchymal Glioma Stem Cells and Prolongs Survival in a Mouse Model of Glioblastoma. *Molecular Cancer Research*. 2016 Oct 1;14(10):984–93.
211. Yan SB, Peek VL, Ajamie R, Buchanan SG, Graff JR, Heidler SA, et al. LY2801653 is an orally bioavailable multi-kinase inhibitor with potent activity against MET, MST1R, and other oncoproteins, and displays anti-tumor activities in mouse xenograft models. *Invest New Drugs*. 2013;31(4):833–44.
212. Kosciuczuk EM, Saleiro D, Kroczyńska B, Beauchamp EM, Eckerdt F, Blyth GT, et al. Merestinib blocks Mnk kinase activity in acute myeloid leukemia progenitors and exhibits antileukemic effects in vitro and in vivo. *Blood*. 2016 Jul 21;128(3):410–4.
213. Lim S, Saw TY, Zhang M, Janes MR, Nacro K, Hill J, et al. Targeting of the MNK–eIF4E axis in blast crisis chronic myeloid leukemia inhibits leukemia stem cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Jun 18;110(25).
214. Lock R, Ingraham R, Maertens O, Miller AL, Weledji N, Legius E, et al. Cotargeting MNK and MEK kinases induces the regression of NF1-mutant cancers. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(6):2181–90.
215. Chen LC, Huang HL, HuangFu WC, Yen SC, Ngo ST, Wu YW, et al. Biological Evaluation of Selected Flavonoids as Inhibitors of MNKs Targeting Acute Myeloid Leukemia. *J Nat Prod*. 2020 Oct 23;83(10):2967–75.
216. Wu H, Hu C, Wang A, Weisberg EL, Chen Y, Yun CH, et al. Discovery of a BTK/MNK dual inhibitor for lymphoma and leukemia. *Leukemia*. 2016 Jan 13;30(1):173–81.
217. Bou-Petit E, Hümmer S, Alarcon H, Slobodnyuk K, Cano-Galietero M, Fuentes P, et al. Overcoming Paradoxical Kinase Priming by a Novel MNK1 Inhibitor. *J Med Chem*. 2022 Apr 28;65(8):6070–87.
218. Abdelaziz AM, Basnet SKC, Islam S, Li M, Tadesse S, Albrecht H, et al. 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*. 2019 Sep;29(18):2650–4.
219. Kwegyir-Afful AK, Ramalingam S, Ramamurthy VP, Purushottamachar P, Murigi FN, Vasaitis TS, et al. Galeterone and The Next Generation Galeterone Analogs, VNPP414 and VNPP433-3 β Exert Potent Therapeutic Effects in Castration-/Drug-Resistant Prostate Cancer Preclinical Models In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Oct 24;11(11):1637.
220. Kwegyir-Afful AK, Bruno RD, Purushottamachar P, Murigi FN, Njar VCO. Galeterone and VNPT55 disrupt Mnk-eIF4E to inhibit prostate cancer cell migration and invasion. *FEBS Journal*. 2016;283(21):3898–918.
221. Kwegyir-Afful AK, Murigi FN, Purushottamachar P, Ramamurthy VP, Martin MS, Njar VCO. Galeterone and its analogs inhibit Mnk-eIF4E axis, synergize with gemcitabine, impede pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation and inhibit tumor growth in mice. *Oncotarget*. 2017;8(32):52381–402.
222. Mbatia HW, Ramalingam S, Ramamurthy VP, Martin MS, Kwegyir-Afful AK, Njar VCO. Novel C-4 Heteroaryl 13- cis -Retinamide Mnk/AR Degrading Agents Inhibit Cell Proliferation and Migration and Induce Apoptosis in Human Breast and Prostate Cancer Cells and Suppress Growth of MDA-MB-231 Human Breast and CWR22Rv1 Human Prostate Tumor Xenog. *J Med Chem*. 2015 Feb 26;58(4):1900–14.
223. Ramalingam S, Gediya L, Kwegyir-Afful AK, Ramamurthy VP, Purushottamachar P, Mbatia H, et al. First Mnk 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*. 2014 Jan 30;5(2):530–43.

224. Santag S, Siegel F, Wengner AM, Lange C, Bömer U, Eis K, et al. BAY 1143269, a novel MNK1 inhibitor, targets oncogenic protein expression and shows potent anti-tumor activity. *Cancer Lett.* 2017 Apr;390:21–9.
225. Huang B, Jin P, Yi K, Duan J. MAPK-interacting kinases inhibition by eFT508 overcomes chemoresistance in preclinical model of osteosarcoma. *Hum Exp Toxicol [Internet]*. 2023 Dec 25;42:096032712311580.
226. Grzmil M, Seebacher J, Hess D, Behe M, Schibli R, Moncayo G, et al. Inhibition of MNK pathways enhances cancer cell response to chemotherapy with temozolomide and targeted radionuclide therapy. *Cell Signal [Internet]*. 2016;28(9):1412–21.
227. Zhang Q, Zhao J, Xu T. Inhibition of eukaryotic initiation factor 4E by tomivosertib suppresses angiogenesis, growth, and survival of glioblastoma and enhances chemotherapy's efficacy. *Fundam Clin Pharmacol.* 2023 Feb 7;
228. Bell JB, Eckerdt F, Dhruv HD, Finlay D, Peng S, Kim S, et al. Differential Response of Glioma Stem Cells to Arsenic Trioxide Therapy Is Regulated by MNK1 and mRNA Translation. *Molecular Cancer Research.* 2018 Jan 1;16(1):32–46.
229. Zhu Y, Wang C, Li M, Yang X. Targeting of MNK/eIF4E overcomes chemoresistance in cervical cancer. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2021 Sep 7;73(10):1418–26.
230. Zhang W, Su X, Li S, Wang Y, Wang Q, Zeng H. Inhibiting MNK Selectively Targets Cervical Cancer via Suppressing eIF4E-Mediated β -Catenin Activation. *Am J Med Sci.* 2019 Sep;358(3):227–34.
231. Yang X, Liu Z, Yin X, Zeng Y, Guo G. Inhibition MNK-eIF4E- β -catenin preferentially sensitizes gastric cancer to chemotherapy. *Fundam Clin Pharmacol.* 2022 Aug 26;36(4):712–20.
232. Pham TND, Kumar K, DeCant BT, Shang M, Munshi SZ, Matsangou M, et al. Induction of MNK Kinase-dependent eIF4E Phosphorylation by Inhibitors Targeting BET Proteins Limits Efficacy of BET Inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2019 Feb 1;18(2):235–44.
233. D'Abronzio LS, Bose S, Crapuchettes ME, Beggs RE, Vinall RL, Tepper CG, et al. The androgen receptor is a negative regulator of eIF4E phosphorylation at S209: Implications for the use of mTOR inhibitors in advanced prostate cancer. *Oncogene.* 2017;36(46):6359–73.
234. Prabhu SA, Moussa O, Gonçalves C, LaPierre JH, Chou H, Huang F, et al. Inhibition of the MNK1/2–eIF4E Axis Augments Palbociclib-Mediated Antitumor Activity in Melanoma and Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2023 Feb 1;22(2):192–204.
235. Eckerdt F, Bell JB, Beauchamp EM, Clymer J, Blyth GT, Kosciuczuk EM, et al. Potent antineoplastic effects of combined PI3K α -MNK inhibition in medulloblastoma. *Molecular Cancer Research.* 2019;17(6):1305–15.
236. Zhang M, Fu W, Prabhu S, Moore JC, Ko J, Kim JW, et al. Inhibition of Polysome Assembly Enhances Imatinib Activity against Chronic Myelogenous Leukemia and Overcomes Imatinib Resistance. *Mol Cell Biol.* 2008 Oct 15;28(20):6496–509.
237. Astanehe A, Finkbeiner MR, Krzywinski M, Fotovati A, Dhillon J, Berquin IM, et al. MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition. *Oncogene.* 2012 Oct 11;31(41):4434–46.
238. Pfeiffer C, Singh A. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 2;19(2):448.
239. Chrestensen CA, Eschenroeder A, Ross WG, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, et al. Loss of MNK function sensitizes fibroblasts to serum-withdrawal induced apoptosis. *Genes to Cells.* 2007 Oct;12(10):1133–40.
240. Widden H, Placzek WJ. The multiple mechanisms of MCL1 in the regulation of cell fate. *Commun Biol.* 2021 Sep 2;4(1):1029.
241. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010 Feb;463(7283):899–905.

242. Wei G, Margolin AA, Haery L, Brown E, Cucolo L, Julian B, et al. Chemical Genomics Identifies Small-Molecule MCL1 Repressors and BCL-xL as a Predictor of MCL1 Dependency. *Cancer Cell*. 2012 Apr;21(4):547–62.
243. Adams KW, Cooper GM. Rapid Turnover of Mcl-1 Couples Translation to Cell Survival and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Mar;282(9):6192–200.
244. Landon AL, Muniandy PA, Shetty AC, Lehrmann E, Volpon L, Houg S, et al. MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat Commun [Internet]*. 2014 Nov 18;5(1):5413.
245. Kumar S, Fairmichael C, Longley DB, Turkington RC. The Multiple Roles of the IAP Super-family in cancer. *Pharmacol Ther*. 2020;214:107610.
246. Evans MK, Brown MC, Geradts J, Bao X, Robinson TJ, Jolly MK, et al. XIAP regulation by MNK links MAPK and NFkB signaling to determine an aggressive breast cancer phenotype. *Cancer Res*. 2018;78(7):1726–38.
247. Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci*. 2019 Apr 1;132(7).
248. Ye Q, Cai W, Zheng Y, Evers BM, She QB. ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. *Oncogene*. 2014 Apr 3;33(14):1828–39.
249. Wang C, Song J, Liu W, Yao Y, Kapranov P, Sample K, et al. FLI1 promotes protein translation via the transcriptional regulation of MKNK1 expression. *Int J Oncol*. 2019 Dec 16;
250. Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, et al. EIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14134–9.
251. Wheeler MJ, Johnson PWM, Blaydes JP. The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biol Ther [Internet]*. 2010 Oct 27;10(7):728–35.
252. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*. 2015 Dec;35:S25–54.
253. CHEN B, ZHANG B, XIA L, ZHANG J, CHEN Y, HU Q, et al. Knockdown of eukaryotic translation initiation factor 4E suppresses cell growth and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in a human lung adenocarcinoma cell line. *Mol Med Rep*. 2015 Dec;12(6):7971–8.
254. Zhou F fei, Yan M, Guo G fang, Wang F, Qiu H juan, Zheng F meng, et al. Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells. *Medical Oncology*. 2011 Dec 22;28(4):1302–7.
255. Dong K, Wang R, Wang X, Lin F, Shen JJ, Gao P, et al. Tumor-specific RNAi targeting eIF4E suppresses tumor growth, induces apoptosis and enhances cisplatin cytotoxicity in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Feb 10;113(3):443–56.
256. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Aug 7;11(8):558–72.
257. Rosenwald IB, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N, Schmidt E V. Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 1993 Dec;13(12):7358–63.
258. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Feb 6;93(3):1065–70.

259. Muta D, Makino K, Nakamura H, Yano S, Kudo M, Kuratsu J ichi. Inhibition of eIF4E phosphorylation reduces cell growth and proliferation in primary central nervous system lymphoma cells. *J Neurooncol*. 2011 Jan 25;101(1):33–9.
260. Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer*. 2021 Jan 4;20(1):3.
261. Wu M, Liu Y, Di X, Kang H, Zeng H, Zhao Y, et al. EIF4E over-expresses and enhances cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma. *Medical Oncology*. 2013 Mar 1;30(1):400.
262. Kleiner HE, Krishnan P, Tubbs J, Smith M, Meschonat C, Shi R, et al. Tissue microarray analysis of eIF4E and its downstream effector proteins in human breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2009 Jan 9;28(1):5.
263. Worch J, Tickenbrock L, Schwäble J, Steffen B, Cauvet T, Mlody B, et al. The serine-threonine kinase MNK1 is post-translationally stabilized by PML-RAR α and regulates differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene*. 2004 Dec 9;23(57):9162–72.
264. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):33972–89.
265. Wang W, Wen Q, Luo J, Chu S, Chen L, Xu L, et al. Suppression Of β -catenin Nuclear Translocation By CGP57380 Decelerates Poor Progression And Potentiates Radiation-Induced Apoptosis in Nasopharyngeal Carcinoma. *Theranostics*. 2017;7(7):2134–49.
266. Xu Y, Liao S, Wang L, Wang Y, Wei W, Su K, et al. Galeterone sensitizes breast cancer to chemotherapy via targeting MNK/eIF4E and β -catenin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021 Jan 7;87(1):85–93.
267. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [Internet]. 2018 Jan 24;13(1):395–412.
268. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* [Internet]. 2016 Jun;166(1):21–45.
269. Kumar K, Chow CR, Ebine K, Arslan AD, Kwok B, Bentrem DJ, et al. Differential Regulation of ZEB1 and EMT by MAPK-Interacting Protein Kinases (MNK) and eIF4E in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Research*. 2016 Feb 1;14(2):216–27.
270. Kwegyir-Afful AK, Bruno RD, Purushottamachar P, Murigi FN, Njar VCO. Galeterone and VNPT55 disrupt Mnk-eIF4E to inhibit prostate cancer cell migration and invasion. *FEBS J* [Internet]. 2016 Nov;283(21):3898–918.
271. Colak S, ten Dijke P. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends Cancer*. 2017 Jan;3(1):56–71.
272. Pettersson F, del Rincon S V., Emond A, Huor B, Ngan E, Ng J, et al. Genetic and Pharmacologic Inhibition of eIF4E Reduces Breast Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cancer Res*. 2015 Mar 15;75(6):1102–12.
273. Decarlo L, Mestel C, Barcellos-Hoff MH, Schneider RJ. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Is a Feed-Forward Translational Coactivator of Transforming Growth Factor β Early Protransforming Events in Breast Epithelial Cells. *Mol Cell Biol*. 2015 Aug;35(15):2597–609.
274. Das F, Ghosh-Choudhury N, Bera A, Kasinath BS, Choudhury GG. TGF β -induced PI 3 kinase-dependent Mnk-1 activation is necessary for Ser-209 phosphorylation of eIF4E and mesangial cell hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2013 Jul;228(7):1617–26.
275. Park KC, Paluncic J, Kovacevic Z, Richardson DR. Pharmacological targeting and the diverse functions of the metastasis suppressor, NDRG1, in cancer. *Free Radic Biol Med*. 2020 Sep;157:154–75.
276. Strizzi L, Hardy KM, Kirschmann DA, Ahrlund-Richter L, Hendrix MJC. Nodal Expression and Detection in Cancer: Experience and Challenges. *Cancer Res*. 2012 Apr 15;72(8):1915–20.
277. Carbone C, Piro G, Merz V, Simionato F, Santoro R, Zecchetto C, et al. Angiopoietin-Like Proteins in Angiogenesis, Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 1;19(2):431.

278. Kevil CG, De Benedetti A, Payne DK, Coe LL, Laroux FS, Alexander JS. Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 1996 Mar 15;65(6):785–90.
279. DeFatta RJ, Nathan CAO, De Benedetti A. Antisense RNA to eIF4E Suppresses Oncogenic Properties of a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *Laryngoscope*. 2000 Jun;110(6):928–33.
280. Byrnes K, White S, Chu Q, Meschonat C, Yu H, Johnson LW, et al. High eIF4E, VEGF, and Microvessel Density in Stage I to III Breast Cancer. *Ann Surg*. 2006 May;243(5):684–92.
281. Kevil C, Carter P, Hu B, DeBenedetti A. Translational enhancement of FGF-2 by eIF-4 factors, and alternate utilization of CUG and AUG codons for translation initiation. *Oncogene*. 1995 Dec 7;11(11):2339–48.
282. Korneeva NL, Soung YH, Kim HI, Giordano A, Rhoads RE, Gram H, et al. Mnk Mediates Integrin $\alpha 6\beta 4$ -Dependent eIF4E Phosphorylation and Translation of VEGF mRNA. *Molecular Cancer Research*. 2010 Dec 1;8(12):1571–8.
283. Joshi S, Platanias LC. Mnk kinases in cytokine signaling and regulation of cytokine responses. *Biomol Concepts*. 2012 Jan 1;3(2).
284. Lan T, Chen L, Wei X. Inflammatory Cytokines in Cancer: Comprehensive Understanding and Clinical Progress in Gene Therapy. *Cells*. 2021 Jan 8;10(1):100.
285. Robichaud N, Hsu BE, Istomine R, Alvarez F, Blagih J, Ma EH, et al. Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Mar 6;115(10).
286. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990 Aug;346(6287):818–22.
287. Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* (1979). 1990 Aug 3;249(4968):505–10.
288. Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Mar 3;16(3):181–202.
289. Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, Yang Z, Urban JH, Sullenger BA, et al. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat Chem Biol*. 2010 Jan 29;6(1):22–4.
290. Geiger A. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*. 1996 Mar 15;24(6):1029–36.
291. Michaud M, Jourdan E, Villet A, Ravel A, Grosset C, Peyrin E. A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *J Am Chem Soc*. 2003 Jul 1;125(28):8672–9.
292. Chen L, Rashid F, Shah A, Awan HM, Wu M, Liu A, et al. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Aug 11;112(32):10002–7.
293. Wlotzka B, Leva S, Eschgfäller B, Burmeister J, Kleinjung F, Kaduk C, et al. In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: An example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Jun 25;99(13):8898–902.
294. Ciesiolka J, Yarus M. Small RNA-divalent domains. *RNA*. 1996 Aug;2(8):785–93.
295. Labib M, Zamay AS, Muharemagic D, Chechik A V., Bell JC, Berezovski M V. Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Viruses. *Anal Chem*. 2012 Feb 21;84(4):1813–6.
296. Song MY, Nguyen D, Hong SW, Kim BC. Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX. *Sci Rep*. 2017 Mar 8;7(1):43641.
297. Stojanovic MN, de Prada P, Landry DW. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J Am Chem Soc*. 2001 May 1;123(21):4928–31.
298. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science* (1979). 1994 Mar 11;263(5152):1425–9.

299. Xing YP, Liu C, Zhou XH, Shi HC. Label-free detection of kanamycin based on a G-quadruplex DNA aptamer-based fluorescent intercalator displacement assay. *Sci Rep*. 2015 Jan 30;5(1):8125.
300. Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem*. 2017 Oct 4;1(10):0076.
301. Kovacevic KD, Gilbert JC, Jilma B. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018 Sep;134:36–50.
302. Ni S, Yao H, Wang L, Lu J, Jiang F, Lu A, et al. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 2;18(8):1683.
303. Zhu G, Niu G, Chen X. Aptamer–Drug Conjugates. *Bioconjug Chem*. 2015 Nov 18;26(11):2186–97.
304. Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Feb;5(2):123–32.
305. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Jun 18;15(6):385–403.
306. Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics*. 2018;8(15):4016–32.
307. Shigdar S, Schrand B, Giangrande PH, de Franciscis V. Aptamers: Cutting edge of cancer therapies. *Molecular Therapy*. 2021 Aug;29(8):2396–411.
308. Bates PJ, Kahlon JB, Thomas SD, Trent JO, Miller DM. Antiproliferative Activity of G-rich Oligonucleotides Correlates with Protein Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Sep;274(37):26369–77.
309. Berger CM, Gaume X, Bouvet P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie*. 2015 Jun;113:78–85.
310. Bates PJ, Reyes-Reyes EM, Malik MT, Murphy EM, O'Toole MG, Trent JO. G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017 May;1861(5):1414–28.
311. Girvan AC, Teng Y, Casson LK, Thomas SD, Juliger S, Ball MW, et al. AGRO100 inhibits activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) by forming a complex with NF- κ B essential modulator (NEMO) and nucleolin. *Mol Cancer Ther*. 2006 Jul 1;5(7):1790–9.
312. Soundararajan S, Chen W, Spicer EK, Courtenay-Luck N, Fernandes DJ. The Nucleolin Targeting Aptamer AS1411 Destabilizes Bcl-2 Messenger RNA in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2008 Apr 1;68(7):2358–65.
313. Reyes-Reyes EM, Teng Y, Bates PJ. A New Paradigm for Aptamer Therapeutic AS1411 Action: Uptake by Macropinocytosis and Its Stimulation by a Nucleolin-Dependent Mechanism. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8617–29.
314. Scaggianti B, Dapas B, Grassi G, Manzini G. Interaction of G-rich GT oligonucleotides with nuclear-associated eEF1A is correlated with their antiproliferative effect in haematopoietic human cancer cell lines. *FEBS Journal*. 2006 Apr;273(7):1350–61.
315. Hoellenriegel J, Zboralski D, Maasch C, Rosin NY, Wierda WG, Keating MJ, et al. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood*. 2014 Feb 13;123(7):1032–9.
316. Weisberg EL, Sattler M, Azab AK, Eulberg D, Kruschinski A, Manley PW, et al. Inhibition of SDF-1-induced migration of oncogene-driven myeloid leukemia by the L-RNA aptamer (Spiegelmer), NOX-A12, and potentiation of tyrosine kinase inhibition. *Oncotarget*. 2017 Dec 15;8(66):109973–84.
317. Steurer M, Montillo M, Scarfò L, Mauro FR, Andel J, Wildner S, et al. Olaptased pegol (NOX-A12) with bendamustine and rituximab: a phase IIa study in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019 Oct;104(10):2053–60.

318. Ludwig H, Weisel K, Petrucci MT, Leleu X, Cafro AM, Garderet L, et al. Olaptosed pegol, an anti-CXCL12/SDF-1 Spiegelmer, alone and with bortezomib–dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase IIa Study. *Leukemia*. 2017 Apr 11;31(4):997–1000.
319. Suarez-Carmona M, Williams A, Schreiber J, Hohmann N, Pruefer U, Krauss J, et al. Combined inhibition of CXCL12 and PD-1 in MSS colorectal and pancreatic cancer: modulation of the microenvironment and clinical effects. *J Immunother Cancer*. 2021 Oct 4;9(10):e002505.
320. García-Recio EM, Pinto-Díez C, Pérez-Morgado MI, García-Hernández M, Fernández G, Martín ME, et al. Characterization of MNK1b DNA Aptamers That Inhibit Proliferation in MDA-MB231 Breast Cancer Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2016;5:e275.
321. Pinto-Díez C, Ferreras-Martín R, Carrión-Marchante R, Klett-Mingo JI, García-Hernández M, Pérez-Morgado MI, et al. An optimized MNK1b aptamer, apMNKQ2, and its potential use as a therapeutic agent in breast cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2022 Dec;30:553–68.
322. Carrión-Marchante R, Pinto-Díez C, Klett-Mingo JI, Palacios E, Barragán-Usero M, Pérez-Morgado MI, et al. An Aptamer against MNK1 for Non-Small Cell Lung Cancer Treatment. *Pharmaceutics*. 2023 Apr 18;15(4):1273.
323. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jul 1;121(7):2750–67.
324. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods*. 1986 May;89(2):271–7.
325. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Jun 14;7.
326. Cichon MA, Moruzzi ME, Shqau TA, Miller E, Mehner C, Ethier SP, et al. MYC Is a Crucial Mediator of TGF β -Induced Invasion in Basal Breast Cancer. *Cancer Res*. 2016 Jun 15;76(12):3520–30.
327. Humphries MJ. Cell Adhesion Assays. *Mol Biotechnol*. 2001;18(1):57–62.
328. Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *Journal of Cell Biology*. 2012 Nov 12;199(4):583–8.
329. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):621–81.
330. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984 Jan;22:27–55.
331. Fu J ning, Li J, Tan Q, Yin H wei, Xiong K, Wang T yu, et al. Thioresxin reductase inhibitor ethaselen increases the drug sensitivity of the colon cancer cell line LoVo towards cisplatin via regulation of G1 phase and reversal of G2/M phase arrest. *Invest New Drugs*. 2011 Aug 2;29(4):627–36.
332. Liu Y, Xue M, Du S, Feng W, Zhang K, Zhang L, et al. Competitive endogenous RNA is an intrinsic component of EMT regulatory circuits and modulates EMT. *Nat Commun*. 2019 Apr 9;10(1):1637.
333. Park CY, Min KN, Son JY, Park SY, Nam JS, Kim DK, et al. A novel inhibitor of TGF- β type I receptor, IN-1130, blocks breast cancer lung metastasis through inhibition of epithelial–mesenchymal transition. *Cancer Lett*. 2014 Aug;351(1):72–80.
334. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. *Anal Biochem*. 1997 Jun;249(1):24–8.
335. Hitosugi T, Zhou L, Fan J, Elf S, Zhang L, Xie J, et al. Tyr26 phosphorylation of PGAM1 provides a metabolic advantage to tumours by stabilizing the active conformation. *Nat Commun*. 2013 Apr 30;4(1):1790.
336. Hallows WC, Yu W, Denu JM. Regulation of Glycolytic Enzyme Phosphoglycerate Mutase-1 by Sirt1 Protein-mediated Deacetylation. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2012 Feb;287(6):3850–8.
337. TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to Monitor Glycolysis. In 2014. p. 91–114.

338. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*. 2009 Apr 22;6(4):275–7.
339. Minden JS. Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE). In 2012. p. 111–41.
340. Timms JF, Cramer R. Difference gel electrophoresis. *Proteomics*. 2008 Dec;8(23–24):4886–97.
341. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003 Jan;3(1):36–44.
342. Saraswathy N, Ramalingam P. Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF). In: *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. Elsevier; 2011. p. 185–92.
343. Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen J V, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006 Dec 25;1(6):2856–60.
344. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015 Aug 5;6.
345. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem*. 2003 Aug 1;376(7):952–65.
346. McGlincy NJ, Ingolia NT. Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling. *Methods*. 2017 Aug;126:112–29.
347. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc*. 2012 Aug 26;7(8):1534–50.
348. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science* (1979). 2009 Apr 10;324(5924):218–23.
349. Giraldez MD, Spengler RM, Etheridge A, Goicochea AJ, Tuck M, Choi SW, et al. Phospho-RNA-seq: a modified small RNA-seq method that reveals circulating mRNA and lncRNA fragments as potential biomarkers in human plasma. *EMBO J*. 2019 Jun 3;38(11).
350. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2015 Nov;2015(11):pdb.top084970.
351. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol*. 2020 Mar 13;38(3):276–8.
352. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014 Dec 5;15(12):550.
353. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol*. 2017 Nov 3;13(11):e1005752.
354. Chen S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta*. 2023 May 8;2(2).
355. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Apr 4;9(4):357–9.
356. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013 Dec 15;14(1):128.
357. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D605–12.
358. Zhou G, Soufan O, Ewald J, Hancock REW, Basu N, Xia J. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W234–41.

359. Porras P, Barrera E, Bridge A, del-Toro N, Cesareni G, Duesbury M, et al. Towards a unified open access dataset of molecular interactions. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1):6144.
360. Jacomy M, Venturini T, Heymann S, Bastian M. ForceAtlas2, a Continuous Graph Layout Algorithm for Handy Network Visualization Designed for the Gephi Software. *PLoS One.* 2014 Jun 10;9(6):e98679.
361. Fruchterman TMJ, Reingold EM. Graph drawing by force-directed placement. *Softw Pract Exp.* 1991 Nov;21(11):1129–64.
362. Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc.* 2007 Apr 12;2(4):924–32.
363. Lao DH, Yusoff P, Chandramouli S, Philp RJ, Fong CW, Jackson RA, et al. Direct Binding of PP2A to Sprouty2 and Phosphorylation Changes Are a Prerequisite for ERK Inhibition Downstream of Fibroblast Growth Factor Receptor Stimulation. *Journal of Biological Chemistry.* 2007 Mar;282(12):9117–26.
364. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Signaling and Proteasome Inhibition Delay Neutrophil Apoptosis by Increasing the Stability of Mcl-1. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Jun;279(26):26915–21.
365. Nencioni A, Hua F, Dillon CP, Yokoo R, Scheiermann C, Cardone MH, et al. Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3255–62.
366. Mojsa B, Lassot I, Desagher S. Mcl-1 Ubiquitination: Unique Regulation of an Essential Survival Protein. *Cells.* 2014 May 8;3(2):418–37.
367. Nifoussi SK, Vrana JA, Domina AM, De Biasio A, Gui J, Gregory MA, et al. Thr 163 Phosphorylation Causes Mcl-1 Stabilization when Degradation Is Independent of the Adjacent GSK3-Targeted Phosphodegron, Promoting Drug Resistance in Cancer. Mott JL, editor. *PLoS One.* 2012 Oct 9;7(10):e47060.
368. Wu X, Luo Q, Liu Z. Ubiquitination and deubiquitination of MCL1 in cancer: deciphering chemoresistance mechanisms and providing potential therapeutic options. *Cell Death Dis.* 2020 Jul 22;11(7):556.
369. Kashkar H, Deggerich A, Seeger JM, Yazdanpanah B, Wiegmann K, Haubert D, et al. NF- κ B-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3982–8.
370. Golovine K, Makhov P, Uzzo RG, Kutikov A, Kaplan DJ, Fox E, et al. Cadmium down-regulates expression of XIAP at the post-transcriptional level in prostate cancer cells through an NF- κ B-independent, proteasome-mediated mechanism. *Mol Cancer.* 2010 Dec 9;9(1):183.
371. Inoue T, Shiraki K, Fuke H, Yamanaka Y, Miyashita K, Yamaguchi Y, et al. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by suppressing caspase inhibitors and AKT pathway. *Anticancer Drugs.* 2006 Mar;17(3):261–8.
372. Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J [Internet].* 1992 Nov;11(11):3995–4005.
373. Grim JE, Gustafson MP, Hirata RK, Hagar AC, Swanger J, Welcker M, et al. Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Journal of Cell Biology.* 2008 Jun 16;181(6):913–20.
374. Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998 Jun 23;95(13):7480–4.
375. Juan G, Traganos F, James WM, Ray JM, Roberge M, Sauve DM, et al. Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry.* 1998 Jun 1;32(2):71–7.

376. Royce ME, Osman D. Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015 Jan 6;9:BCBCR.S29268.
377. Choo AY, Blenis J. Not all substrates are treated equally: Implications for mTOR, rapamycin-resistance, and cancer therapy. *Cell Cycle*. 2009 Feb 15;8(4):567–72.
378. Biever A, Valjent E, Puighermanal E. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Front Mol Neurosci*. 2015 Dec 16;8.
379. Brown KA, Aakre ME, Gorska AE, Price JO, Eltom SE, Pietenpol JA, et al. Induction by transforming growth factor- β 1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Research*. 2004 Jun 17;6(3):R215.
380. Zhang J, Tian XJ, Zhang H, Teng Y, Li R, Bai F, et al. TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Sci Signal*. 2014 Sep 30;7(345).
381. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci*. 2005 Mar 1;118(5):873–87.
382. Liang Q, Li L, Zhang J, Lei Y, Wang L, Liu DX, et al. CDK5 is essential for TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Sci Rep*. 2013 Oct 14;3(1):2932.
383. Hautmann MB, Adam PJ, Owens GK. Similarities and Differences in Smooth Muscle α -Actin Induction by TGF- β in Smooth Muscle Versus Non-Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Sep;19(9):2049–58.
384. MURRAY JT, CAMPBELL DG, MORRICE N, AULD GC, SHPIRO N, MARQUEZ R, et al. Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochemical Journal*. 2004 Dec 15;384(3):477–88.
385. Sherk AB, Frigo DE, Schnackenberg CG, Bray JD, Laping NJ, Trizna W, et al. Development of a Small-Molecule Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase-1 Antagonist and Its Evaluation as a Prostate Cancer Therapeutic. *Cancer Res*. 2008 Sep 15;68(18):7475–83.
386. Germain P, Metezeau P, Hellio R, Habrioux G. Internalization and biological effects of serum albumin in the breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1995 Dec;41(8):1119–29.
387. Frei E. Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. *Diabetol Metab Syndr*. 2011 Dec 15;3(1):11.
388. Grantham J. The Molecular Chaperone CCT/TRiC: An Essential Component of Proteostasis and a Potential Modulator of Protein Aggregation. *Front Genet*. 2020 Mar 19;11.
389. Xu J, Huang Y, Zhao J, Wu L, Qi Q, Liu Y, et al. Cofilin: A Promising Protein Implicated in Cancer Metastasis and Apoptosis. *Front Cell Dev Biol [Internet]*. 2021 Feb 4;9.
390. Kaul G, Pattan G, Rafeequi T. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct*. 2011 Apr;29(3):227–34.
391. The Gene Ontology Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D331–8.
392. Cappellini M, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*. 2008 Jan;371(9606):64–74.
393. Fisher AB. Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A 2 Activities. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug;15(3):831–44.
394. He Y, Zhou C, Huang M, Tang C, Liu X, Yue Y, et al. Glyoxalase system: A systematic review of its biological activity, related-diseases, screening methods and small molecule regulators. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020 Nov;131:110663.

395. Baidur-Hudson S, Edkins AL, Blatch GL. Hsp70/Hsp90 Organising Protein (Hop): Beyond Interactions with Chaperones and Prion Proteins. In 2015. p. 69–90.
396. TANAKA K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009;85(1):12–36.
397. Belyantseva IA, Perrin BJ, Sonnemann KJ, Zhu M, Stepanyan R, McGee J, et al. γ -Actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Jun 16;106(24):9703–8.
398. Haining AWM, Lieberthal TJ, Hernández A del R. Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease. *The FASEB Journal*. 2016 Jun 22;30(6):2073–85.
399. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem*. 2004 Oct 1;93(2):242–50.
400. Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-Actin Interactions. *Traffic*. 2004 Aug;5(8):571–6.
401. LaRonde-LeBlanc N, Wlodawer A. The RIO kinases: An atypical protein kinase family required for ribosome biogenesis and cell cycle progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2005 Dec;1754(1–2):14–24.
402. Carreras J, Bartrons R, Grisolia S. Vanadate inhibits 2,3-bisphosphoglycerate dependent phosphoglycerate mutases but does not affect the 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980 Oct;96(3):1267–73.
403. Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Baron B, Yoshino S, Maehara SI, et al. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Lett*. 2015 May;360(2):171–6.
404. Wang W, Mouneimne G, Sidani M, Wyckoff J, Chen X, Makris A, et al. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *Journal of Cell Biology*. 2006 May 8;173(3):395–404.
405. Nagai S, Moreno O, Smith CA, Ivanchuk S, Romagnuolo R, Golbourn B, et al. Role of the Cofilin Activity Cycle in Astrocytoma Migration and Invasion. *Genes Cancer*. 2011 Sep 1;2(9):859–69.
406. Popow-Woźniak A, Mazur AJ, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M, Nowak D. Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochem Cell Biol*. 2012 Nov 13;138(5):725–36.
407. Collazo J, Zhu B, Larkin S, Martin SK, Pu H, Horbinski C, et al. Cofilin Drives Cell-Invasive and Metastatic Responses to TGF- β in Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2014 Apr 15;74(8):2362–73.
408. Mahboubi A, Delhomme N, Häggström S, Hanson J. Small-scale sequencing enables quality assessment of Ribo-Seq data: an example from Arabidopsis cell culture. *Plant Methods*. 2021 Dec 24;17(1):92.
409. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc*. 2012 Aug 26;7(8):1534–50.
410. Hong G, Zhang W, Li H, Shen X, Guo Z. Separate enrichment analysis of pathways for up- and downregulated genes. *J R Soc Interface*. 2014 Mar 6;11(92):20130950.
411. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2017 Aug 7;16(8):531–43.
412. Davis RL. Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. *iScience*. 2020 Sep;23(9):101487.
413. Mechanism matters. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):347–347.
414. Schenone M, Dančík V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol*. 2013 Apr 18;9(4):232–40.

415. Zahid A, Ismail H, Li B, Jin T. Molecular and Structural Basis of DNA Sensors in Antiviral Innate Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Nov 30;11.
416. Li Y, Yue P, Deng X, Ueda T, Fukunaga R, Khuri FR, et al. Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and eIF4F Assembly through Direct Dephosphorylation of Mnk and eIF4E. *Neoplasia*. 2010 Oct;12(10):848–55.
417. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Sep 18;21(9):501–21.
418. Abe T, Barber GN. Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- κ B Activation through TBK1. Williams B, editor. *J Virol*. 2014 May 15;88(10):5328–41.
419. Clarke JP, Thibault PA, Salapa HE, Levin MC. A Comprehensive Analysis of the Role of hnRNP A1 Function and Dysfunction in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disease. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 Apr 12;8.
420. Martínez N, Gragera T, de Lucas MP, Cámara AB, Ballester A, Anta B, et al. PKD phosphorylation and COP9/Signalosome modulate intracellular Spry2 protein stability. *Oncogenesis*. 2023 Apr 12;12(1):20.
421. Guy GR, Jackson RA, Yusoff P, Chow SY. Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? *Journal of Endocrinology*. 2009 Nov;203(2):191–202.
422. García Recio EM. Determinación del papel de la proteína quinasa MNK1b en cáncer de mama y desarrollo de aptámeros como posibles herramientas para su regulación. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2014.
423. Holčík M, Gordon BW, Korneluk RG. The Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Protein XIAP Is Modulated by the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan 1;23(1):280–8.
424. Roy R, Durie D, Li H, Liu BQ, Skehel JM, Mauri F, et al. hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic Acids Res*. 2014 Nov 10;42(20):12483–97.
425. Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, Craig RW. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene*. 2004 Jul 8;23(31):5301–15.
426. Tadesse S, Caldon EC, Tilley W, Wang S. Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update. *J Med Chem*. 2019 May 9;62(9):4233–51.
427. Hughes BT, Sidorova J, Swanger J, Monnat RJ, Clurman BE. Essential role for Cdk2 inhibitory phosphorylation during replication stress revealed by a human Cdk2 knockin mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 May 28;110(22):8954–9.
428. Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *Journal of Cell Biology*. 2009 Apr 20;185(2):193–202.
429. Meyer SK, Dunn M, Vidier DS, Porter A, Blain PG, Jowsey PA. Phosphorylation of MCPH1 isoforms during mitosis followed by isoform-specific degradation by APC/C-CDH1. *The FASEB Journal*. 2019 Feb 10;33(2):2796–808.
430. Lu PH, Yu CC, Chiang PC, Chen YC, Ho YF, Kung FL, et al. Paclitaxel Induces Apoptosis Through Activation of Nuclear Protein Kinase C- δ and Subsequent Activation of Golgi Associated Cdk1 in Human Hormone Refractory Prostate Cancer. *Journal of Urology*. 2011 Dec;186(6):2434–41.
431. Kuo KL, Lin WC, Ho IL, Chang HC, Lee PY, Chung YT, et al. 2-Methoxyestradiol Induces Mitotic Arrest, Apoptosis, and Synergistic Cytotoxicity with Arsenic Trioxide in Human Urothelial Carcinoma Cells. Rishi A, editor. *PLoS One*. 2013 Aug 13;8(8):e68703.

432. Hakem A, Sasaki T, Kozieradzki I, Penninger JM. The Cyclin-dependent Kinase Cdk2 Regulates Thymocyte Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1999 Mar 15;189(6):957–68.
433. Golsteyn RM. Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Lett*. 2005 Jan;217(2):129–38.
434. Mazars A, Fernandez-Vidal A, Mondesert O, Lorenzo C, Prévost G, Ducommun B, et al. A caspase-dependent cleavage of CDC25A generates an active fragment activating cyclin-dependent kinase 2 during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2009 Feb 17;16(2):208–18.
435. Chou ST, Yen YC, Lee CM, Chen MS. Pro-apoptotic Role of Cdc25A. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Jun;285(23):17833–45.
436. Park CH, Kim KT. Apoptotic Phosphorylation of Histone H3 on Ser-10 by Protein Kinase Cδ. Hofmann TG, editor. *PLoS One*. 2012 Sep 12;7(9):e44307.
437. Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1–cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J [Internet]*. 2010 Jul 21;29(14):2407–20.
438. Sloss O, Topham C, Diez M, Taylor S. Mcl-1 dynamics influence mitotic slippage and death in mitosis. *Oncotarget [Internet]*. 2016 Feb 2;7(5):5176–92.
439. Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature [Internet]*. 2011 Mar 3;471(7336):110–4.
440. Hou Y, Allan LA, Clarke PR. Phosphorylation of XIAP by CDK1-cyclin B controls mitotic cell death. *J Cell Sci [Internet]*. 2016 Jan 1;
441. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*. 2001 Nov 1;15(21):2852–64.
442. Sekiyama N, Arthanari H, Papadopoulos E, Rodriguez-Mias RA, Wagner G, Léger-Abraham M. Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Jul 28;112(30).
443. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol [Internet]*. 2019 Jan 2;21(1):102–12.
444. Nakamura R, Ishii H, Endo K, Hotta A, Fujii E, Miyazawa K, et al. Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. Nakano H, editor. *PLoS One*. 2018 Jul 3;13(7):e0199442.
445. Liu TA, Jan YJ, Ko BS, Liang SM, Chen SC, Wang J, et al. 14-3-3ε Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. Lee JW, editor. *PLoS One*. 2013 Mar 6;8(3):e57968.
446. Addison JB, Voronkova MA, Fugett JH, Lin CC, Linville NC, Trinh B, et al. Functional Hierarchy and Cooperation of EMT Master Transcription Factors in Breast Cancer Metastasis. *Molecular Cancer Research*. 2021 May 1;19(5):784–98.
447. Sundararajan V, Tan M, Tan TZ, Ye J, Thiery JP, Huang RYJ. SNAI1 recruits HDAC1 to suppress SNAI2 transcription during epithelial to mesenchymal transition. *Sci Rep*. 2019 Jun 5;9(1):8295.
448. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*. 2014 Jun 30;16(6):488–94.
449. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci*. 2005 Mar 1;118(5):873–87.
450. Chen A, Beetham H, Black MA, Priya R, Telford BJ, Guest J, et al. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2014 Dec 30;14(1):552.

451. Sang Y, Kong P, Zhang S, Zhang L, Cao Y, Duan X, et al. SGK1 in Human Cancer: Emerging Roles and Mechanisms. *Front Oncol*. 2021 Jan 19;10.
452. Di Cristofano A. SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. In 2017. p. 49–71.
453. Marzook H, Deivendran S, George B, Reshmi G, Santhoshkumar TR, Kumar R, et al. Cytoplasmic translocation of MTA1 coregulator promotes de-repression of SGK1 transcription in hypoxic cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2017 Sep 14;36(37):5263–73.
454. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*. 2015 Jul 16;523(7560):313–7.
455. Firestone G, Giampaolo J, O'Keeffe B. Stimulus-Dependent Regulation of Serum and Glucocorticoid Inducible Protein Kinase (SGK) Transcription, Subcellular Localization and Enzymatic Activity. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet]. 2003;13(1):1–12.
456. Zhu R, Yang G, Cao Z, Shen K, Zheng L, Xiao J, et al. The prospect of serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) in cancer therapy: a rising star. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2020 Jan 15;12:175883592094094.
457. Cicenias J, Meskinyte-Kausiliene E, Jukna V, Rimkus A, Simkus J, Soderholm D. SGK1 in Cancer: Biomarker and Drug Target. *Cancers (Basel)*. 2022 May 12;14(10):2385.
458. Talarico C, Dattilo V, D'Antona L, Menniti M, Bianco C, Ortuso F, et al. SGK1, the New Player in the Game of Resistance: Chemo-Radio Molecular Target and Strategy for Inhibition. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(5):1863–76.
459. Godbole M, Togar T, Patel K, Dharavath B, Yadav N, Janjuha S, et al. Up-regulation of the kinase gene SGK1 by progesterone activates the AP-1–NDRG1 axis in both PR-positive and -negative breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Dec;293(50):19263–76.
460. Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, et al. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene*. 2004 Jul 22;23(33):5675–81.
461. Zhao X, Richardson DR. The role of the NDRG1 in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2023 May;1878(3):188871.
462. Murakami Y, Hosoi F, Izumi H, Maruyama Y, Ureshino H, Watari K, et al. Identification of sites subjected to serine/threonine phosphorylation by SGK1 affecting N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43-dependent suppression of angiogenic CXC chemokine expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May;396(2):376–81.
463. Hosoi F, Izumi H, Kawahara A, Murakami Y, Kinoshita H, Kage M, et al. N-myc Downstream Regulated Gene 1/Cap43 Suppresses Tumor Growth and Angiogenesis of Pancreatic Cancer through Attenuation of Inhibitor of κ B Kinase β Expression. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):4983–91.
464. McCaig C, Potter L, Abramczyk O, Murray JT. Phosphorylation of NDRG1 is temporally and spatially controlled during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011 Jul;411(2):227–34.
465. Dixon KM, Lui GYL, Kovacevic Z, Zhang D, Yao M, Chen Z, et al. Dp44mT targets the AKT, TGF- β and ERK pathways via the metastasis suppressor NDRG1 in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2013 Feb 3;108(2):409–19.
466. Kovacevic Z, Chikhani S, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel Thiosemicarbazone Iron Chelators Induce Up-Regulation and Phosphorylation of the Metastasis Suppressor N-myc Down-Stream Regulated Gene 1: A New Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2011 Oct;80(4):598–609.
467. Sun J, Zhang D, Zheng Y, Zhao Q, Zheng M, Kovacevic Z, et al. Targeting the Metastasis Suppressor, NDRG1, Using Novel Iron Chelators: Regulation of Stress Fiber-Mediated Tumor Cell Migration via Modulation of the ROCK1/pMLC2 Signaling Pathway. *Mol Pharmacol*. 2013 Feb;83(2):454–69.
468. Wangpu X, Lu J, Xi R, Yue F, Sahni S, Park KC, et al. Targeting the Metastasis Suppressor, N-Myc Downstream Regulated Gene-1, with Novel Di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones: Suppression of

- Tumor Cell Migration and Cell-Collagen Adhesion by Inhibiting Focal Adhesion Kinase/Paxillin Signaling. *Mol Pharmacol*. 2016 May;89(5):521–40.
469. Aikemu B, Shao Y, Yang G, Ma J, Zhang S, Yang X, et al. NDRG1 regulates Filopodia-induced Colorectal Cancer invasiveness via modulating CDC42 activity. *Int J Biol Sci*. 2021;17(7):1716–30.
 470. Mulens-Arias V, Portilla Y, Pérez-Yagüe S, Ferreras-Martín R, Martín ME, González VM, et al. An electrostatically conjugated-functional MNK1 aptamer reverts the intrinsic antitumor effect of polyethyleneimine-coated iron oxide nanoparticles in vivo in a human triple-negative cancer xenograft. *Cancer Nanotechnol*. 2023 Dec 14;14(1):64.
 471. Yang GJ, Tao F, Zhong HJ, Yang C, Chen J. Targeting PGAM1 in cancer: An emerging therapeutic opportunity. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2022 Dec;244:114798.
 472. Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J, Kang HB, Seo JH, et al. Phosphoglycerate Mutase 1 Coordinates Glycolysis and Biosynthesis to Promote Tumor Growth. *Cancer Cell*. 2012 Nov;22(5):585–600.
 473. Pradelli LA, Villa E, Zunino B, Marchetti S, Ricci JE. Glucose metabolism is inhibited by caspases upon the induction of apoptosis. *Cell Death Dis [Internet]*. 2014 Sep 4;5(9):e1406–e1406.
 474. Zhang D, Jin N, Sun W, Li X, Liu B, Xie Z, et al. Phosphoglycerate mutase 1 promotes cancer cell migration independent of its metabolic activity. *Oncogene*. 2017 May 18;36(20):2900–9.
 475. de Bari L, Scirè A, Minnelli C, Cianfruglia L, Kalapos MP, Armeni T. Interplay among Oxidative Stress, Methylglyoxal Pathway and S-Glutathionylation. *Antioxidants*. 2020 Dec 28;10(1):19.
 476. Biaoxue R, Hua L, Wenlong G, Shuanying Y. Overexpression of stathmin promotes metastasis and growth of malignant solid tumors: a systemic review and meta-analysis. *Oncotarget [Internet]*. 2016 Nov 29;7(48):78994–9007.
 477. Lai MT, Hua CH, Tsai MH, Wan L, Lin YJ, Chen CM, et al. Talin-1 overexpression defines high risk for aggressive oral squamous cell carcinoma and promotes cancer metastasis. *J Pathol [Internet]*. 2011 Jul;224(3):367–76.
 478. Rezaie Y, Fattahi F, Mashinchi B, Kamyab Hesari K, Montazeri S, Kalantari E, et al. High expression of Talin-1 is associated with tumor progression and recurrence in melanoma skin cancer patients. *BMC Cancer [Internet]*. 2023 Apr 3;23(1):302.
 479. Saeednejad Zanjani L, Vafaei S, Abolhasani M, Fattahi F, Madjd Z. Prognostic value of Talin-1 in renal cell carcinoma and its association with B7-H3. *Cancer Biomarkers [Internet]*. 2022 Nov 18;35(3):269–92.
 480. Sakamoto S, McCann RO, Dhir R, Kyprianou N. Talin1 Promotes Tumor Invasion and Metastasis via Focal Adhesion Signaling and Anoikis Resistance. *Cancer Res [Internet]*. 2010 Mar 1;70(5):1885–95.
 481. Suresh R, Diaz RJ. The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer. *Transl Oncol [Internet]*. 2021 Jun;14(6):101051.
 482. Biaoxue R, Xiguang C, Hua L, Shuanying Y. Stathmin-dependent molecular targeting therapy for malignant tumor: the latest 5 years' discoveries and developments. *J Transl Med [Internet]*. 2016 Dec 27;14(1):279.
 483. Chen P, Zheng X, Zhou Y, Xu Y, Zhu L, Qian Y. Talin-1 interaction network promotes hepatocellular carcinoma progression. *Oncotarget [Internet]*. 2017 Feb 21;8(8):13003–14.
 484. Dugina V, Khromova N, Rybko V, Blizniukov O, Shagieva G, Chaponnier C, et al. Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms. *Oncotarget [Internet]*. 2015 Jun 10;6(16):14556–71.
 485. Shum MSY, Pasquier E, Po'uha ST, O'Neill GM, Chaponnier C, Gunning PW, et al. γ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway. *The FASEB Journal [Internet]*. 2011 Dec 9;25(12):4423–33.
 486. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem*. 2004 Oct 1;93(2):242–50.

487. Po'uha ST, Kavallaris M. Gamma-actin is involved in regulating centrosome function and mitotic progression in cancer cells. *Cell Cycle*. 2015 Dec 17;14(24):3908–19.
488. Prieto-Fernández L, Menéndez ST, Otero-Rosales M, Montoro-Jiménez I, Hermida-Prado F, García-Pedrero JM, et al. Pathobiological functions and clinical implications of annexin dysregulation in human cancers. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Sep 28;10.
489. Jeong JJ, Park N, Kwon YJ, Ye DJ, Moon A, Chun YJ. Role of Annexin A5 in Cisplatin-induced Toxicity in Renal Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Jan;289(4):2469–81.
490. Hong M, Park N, Chun YJ. Role of Annexin A5 on Mitochondria-Dependent Apoptosis Induced by Tetramethoxystilbene in Human Breast Cancer Cells. *Biomol Ther (Seoul)* [Internet]. 2014 Nov 30;22(6):519–24.
491. de Graauw M, Cao L, Winkel L, van Miltenburg MHAM, le Dévédec SE, Klop M, et al. Annexin A2 depletion delays EGFR endocytic trafficking via cofilin activation and enhances EGFR signaling and metastasis formation. *Oncogene*. 2014 May 15;33(20):2610–9.
492. Gladman NP, Marshall RS, Lee KH, Vierstra RD. The Proteasome Stress Regulon Is Controlled by a Pair of NAC Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* [Internet]. 2016 Jun;28(6):1279–96.
493. Yokota S ichi, Yanagi H, Yura T, Kubota H. Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 Mar;267(6):1658–64.
494. Smith TM, Willardson BM. Mechanistic insights into protein folding by the eukaryotic chaperonin complex CCT. *Biochem Soc Trans*. 2022 Oct 31;50(5):1403–14.
495. Hernández-Vargas H, von Kobbe C, Sánchez-Estévez C, Julián-Tendero M, Palacios J, Moreno-Bueno G. Inhibition of Paclitaxel-Induced Proteasome Activation Influences Paclitaxel Cytotoxicity in Breast Cancer Cells in a Sequence-Dependent Manner. *Cell Cycle*. 2007 Nov 28;6(21):2662–8.
496. Zheng PZ, Wang KK, Zhang QY, Huang QH, Du YZ, Zhang QH, et al. Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 May 24;102(21):7653–8.
497. Carter BZ, Mak DH, Wang Z, Ma W, Mak PY, Andreeff M, et al. XIAP downregulation promotes caspase-dependent inhibition of proteasome activity in AML cells. *Leuk Res*. 2013 Aug;37(8):974–9.
498. Braems E, Bercier V, Van Schoor E, Heeren K, Beckers J, Fumagalli L, et al. HNRNPK alleviates RNA toxicity by counteracting DNA damage in C9orf72 ALS. *Acta Neuropathol*. 2022 Sep 27;144(3):465–88.
499. Gao X, Feng J, He Y, Xu F, Fan X, Huang W, et al. hnRNP K inhibits GSK3 β Ser9 phosphorylation, thereby stabilizing c-FLIP and contributes to TRAIL resistance in H1299 lung adenocarcinoma cells. *Sci Rep*. 2016 Mar 14;6(1):22999.
500. Wang X, Xie J, Proud C. Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017 Nov 27;9(12):162.
501. Meleady P. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. In 2018. p. 3–14.
502. Martínez-Alonso E, Guerra-Pérez N, Escobar-Peso A, Regidor I, Masjuan J, Alcázar A. Differential Association of 4E-BP2-Interacting Proteins Is Related to Selective Delayed Neuronal Death after Ischemia. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 25;22(19):10327.
503. Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2013 Sep 25;13(9):637–51.
504. Bendinelli P, Maroni P, Matteucci E, Luzzati A, Perrucchini G, Desiderio MA. Microenvironmental stimuli affect Endothelin-1 signaling responsible for invasiveness and osteomimicry of bone metastasis from breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014 Apr;1843(4):815–26.

505. Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [Internet]. 2012 Dec 4;31(1):43.
506. Sugimoto H, Nagahara M, Bae Y, Nakagawa T, Ishikawa T, Sato T, et al. Clinicopathologic Relevance of Claudin 5 Expression in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Apr 1;143(4):540–6.
507. Psilopatis I, Souferi-Chronopoulou E, Vrettou K, Troungos C, Theocharis S. EPH/Ephrin-Targeting Treatment in Breast Cancer: A New Chapter in Breast Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 3;23(23):15275.
508. Kawano T, Inokuchi J, Eto M, Murata M, Kang JH. Protein Kinase C (PKC) Isozymes as Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Nov 3;14(21):5425.
509. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 2019 Dec 19;18(1):26.
510. Zhu J, Li K, Yu L, Chen Y, Cai Y, Jin J, et al. Targeting phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3K γ): Discovery and development of its selective inhibitors. *Med Res Rev*. 2021 May 10;41(3):1599–621.
511. Mabeta P, Steenkamp V. The VEGF/VEGFR Axis Revisited: Implications for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 9;23(24):15585.
512. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol*. 2019 May 20;234(5):5683–99.
513. Cardenas MG, Oswald E, Yu W, Xue F, MacKerell AD, Melnick AM. The Expanding Role of the BCL6 Oncoprotein as a Cancer Therapeutic Target. *Clinical Cancer Research*. 2017 Feb 15;23(4):885–93.
514. Nilsson M, Heymach J V. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006 Oct;1(8):768–70.
515. Lau A, Le N, Nguyen C, Kandpal RP. Signals transduced by Eph receptors and ephrin ligands converge on MAP kinase and AKT pathways in human cancers. *Cell Signal*. 2023 Apr;104:110579.
516. Yang Z, Zhang H, Yin M, Cheng Z, Jiang P, Feng M, et al. Neurotrophin3 promotes hepatocellular carcinoma apoptosis through the JNK and P38 MAPK pathways. *Int J Biol Sci*. 2022;18(15):5963–77.
517. Costa-Pereira AP. Regulation of IL-6-type cytokine responses by MAPKs. *Biochem Soc Trans*. 2014 Feb 1;42(1):59–62.
518. Takekawa M, Saito H. A Family of Stress-Inducible GADD45-like Proteins Mediate Activation of the Stress-Responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*. 1998 Nov;95(4):521–30.
519. Gao PP, Qi XW, Sun N, Sun YY, Zhang Y, Tan XN, et al. The emerging roles of dual-specificity phosphatases and their specific characteristics in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2021 Aug;1876(1):188562.
520. Fernández-Medarde A, Santos E. The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2011 Apr;1815(2):170–88.
521. Chalmers CJ, Gilley R, March HN, Balmanno K, Cook SJ. The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cell Signal*. 2007 Apr;19(4):695–704.
522. Kerkhoff E, Houben R, Löffler S, Troppmair J, Lee JE, Rapp UR. Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene*. 1998 Jan 15;16(2):211–6.
523. ZHANG W, LIU HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002 Mar;12(1):9–18.
524. Hanazawa S, Takeshita A, Amano S, Semba T, Nirazuka T, Katoh H, et al. Tumor necrosis factor- α induces expression of monocyte chemoattractant JE via fos and jun genes in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9526–32.

525. Brucoleri A, Gallucci R, Germolec DR, Blackshear P, Simeonova P, Thurman RG, et al. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor ? contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology*. 1997 Jan;25(1):133–41.
526. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. 2013 Jan;328(2):222–5.
527. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(16):2449–61.
528. Trop-Steinberg S, Azar Y. AP-1 Expression and its Clinical Relevance in Immune Disorders and Cancer. *Am J Med Sci [Internet]*. 2017 May;353(5):474–83.
529. Meng Q, Xia Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell*. 2011 Nov 17;2(11):889–98.
530. Ku HC, Cheng CF. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Aug 14;11.
531. Wang B, Guo H, Yu H, Chen Y, Xu H, Zhao G. The Role of the Transcription Factor EGR1 in Cancer. *Front Oncol*. 2021 Mar 24;11.
532. Yin X, Wolford CC, Chang YS, McConoughey SJ, Ramsey SA, Aderem A, et al. ATF3 , an adaptive-response gene, enhances TGF β signaling and cancer-initiating cell features in breast cancer cells. *J Cell Sci*. 2010 Oct 15;123(20):3558–65.
533. Kwok S, Rittling SR, Partridge NC, Benson CS, Thiyagaraj M, Srinivasan N, et al. Transforming growth factor- β 1 regulation of ATF-3 and identification of ATF-3 target genes in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2009 Oct 1;108(2):408–14.
534. Sundqvist A, Vasilaki E, Voytyuk O, Bai Y, Morikawa M, Moustakas A, et al. TGF β and EGF signaling orchestrates the AP-1- and p63 transcriptional regulation of breast cancer invasiveness. *Oncogene*. 2020 May 28;39(22):4436–49.
535. Spruill LS, McDermott PJ, Spruill LS, McDermott PJ. Regulation of c-jun mRNA expression in adult cardiocytes by MAP kinase interacting kinase-1 (MNK1). *The FASEB Journal*. 2006 Oct 29;20(12):2133–5.
536. Wang Z, Li Y, Xiao Y, Lin H, Yang P, Humphries B, et al. Integrin α 9 depletion promotes β -catenin degradation to suppress triple-negative breast cancer tumor growth and metastasis. *Int J Cancer*. 2019 Nov 15;145(10):2767–80.
537. Aburjania Z, Jang S, Whitt J, Jaskula-Stzul R, Chen H, Rose JB. The Role of *Notch3* in Cancer. *Oncologist*. 2018 Aug 1;23(8):900–11.
538. Yang B, Wang F, Zheng G. Transmembrane protein TMEM119 facilitates the stemness of breast cancer cells by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Bioengineered*. 2021 Jan 1;12(1):4856–67.
539. Drilon A, Jenkins C, Iyer S, Schoenfeld A, Keddy C, Davare MA. ROS1-dependent cancers — biology, diagnostics and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Jan 5;18(1):35–55.
540. Hsieh YL, Tu HJ, Pan SL, Liou JP, Yang CR. Anti-metastatic activity of MPT0G211, a novel HDAC6 inhibitor, in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2019 Jun;1866(6):992–1003.
541. Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Baron B, Yoshino S, Maehara SI, et al. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Lett*. 2015 May;360(2):171–6.
542. Chen C, Maimaiti Y, Zhijun S, Zeming L, Yawen G, Pan Y, et al. Slingshot-1L, a cofilin phosphatase, induces primary breast cancer metastasis. *Oncotarget*. 2017 Sep 12;8(39):66195–203.
543. Weiss TC, Zhai GG, Bhatia SS, Romaniuk PJ. An RNA Aptamer with High Affinity and Broad Specificity for Zinc Finger Proteins. *Biochemistry*. 2010 Mar 30;49(12):2732–40.

- 544. Kaiser L, Weisser J, Kohl M, Deigner HP. Small molecule detection with aptamer based lateral flow assays: Applying aptamer-C-reactive protein cross-recognition for ampicillin detection. *Sci Rep*. 2018 Apr 4;8(1):5628.
- 545. Lakhin A V, Tarantul VZ, Gening L V. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae*. 2013 Oct;5(4):34–43.

ANEXO

Tabla 1. Enriquecimiento funcional de las proteínas identificadas por espectrometría de masas por GO en las categorías de procesos biológicos, función molecular y componentes celulares. En la primera columna se muestra el término identificativo (T.I.) de GO y su descripción y a continuación las proteínas que pertenecen a esa categoría y el valor de P ajustada.

PROCESOS BIOLÓGICOS			
T.I. GO	Descripción	Proteínas coincidentes	P ajustada
GO:0043069	Negative Regulation Of Programmed Cell Death	HNRNPK;GLO1;ANXA5;CFL1	0.0165
GO:0032212	Positive Regulation Of Telomere Maintenance Via Telomerase	CCT2;CCT8	0.0165
GO:1904358	Positive Regulation Of Telomere Maintenance Via Telomere Lengthening	CCT2;CCT8	0.0165
GO:0070527	Platelet Aggregation	TLN1;ACTG1	0.0165
GO:0043066	Negative Regulation Of Apoptotic Process	HNRNPK;GLO1;ANXA5;CFL1	0.0165
GO:0048260	Positive Regulation Of Receptor-Mediated Endocytosis	HNRNPK;ANXA2	0.0165
GO:0034109	Homotypic Cell-Cell Adhesion	TLN1;ACTG1	0.0165
GO:0032210	Regulation Of Telomere Maintenance Via Telomerase	CCT2;CCT8	0.0173
GO:0051893	Regulation Of Focal Adhesion Assembly	TLN1;ACTG1	0.0173
GO:0006006	Glucose Metabolic Process	G6PD;PGAM1	0.0173
GO:0000281	Mitotic Cytokinesis	CFL1;STMN1	0.0173
GO:2000573	Positive Regulation Of DNA Biosynthetic Process	CCT2;CCT8	0.0177
GO:0001952	Regulation Of Cell-Matrix Adhesion	TLN1;ACTG1	0.0177
GO:0007043	Cell-Cell Junction Assembly	TLN1;ACTG1	0.0188
GO:1900182	Positive Regulation Of Protein Localization To Nucleus	CCT2;CCT8	0.0188
GO:0051492	Regulation Of Stress Fiber Assembly	STMN1;ACTG1	0.0191
GO:0061640	Cytoskeleton-Dependent Cytokinesis	CFL1;STMN1	0.0209
GO:0042981	Regulation Of Apoptotic Process	HNRNPK;GLO1;ANXA5;CFL1	0.0210
GO:0048024	Regulation Of mRNA Splicing, Via Spliceosome	HNRNPK;PRDX6	0.0251
GO:0043484	Regulation Of RNA Splicing	HNRNPK;PRDX6	0.0280

FUNCIÓN MOLECULAR			
T.I. GO	Descripción	Proteínas coincidentes	P ajustada
GO:0045296	Cadherin Binding	HNRNPK;ANXA2;CCT8;TLN1;PRDX6	1.36E-06
GO:0004859	Phospholipase Inhibitor Activity	ANXA2;ANXA5	3.88E-06
GO:0005544	Calcium-Dependent Phospholipid Binding	ANXA2;ANXA5	7.62E-03
GO:0031625	Ubiquitin Protein Ligase Binding	CCT2;PRDX6;ACTG1	1.05E-02
GO:0044389	Ubiquitin-Like Protein Ligase Binding	CCT2;PRDX6;ACTG1	1.05E-02

COMPONENTES CELULARES			
T.I. GO	Descripción	Proteínas coincidentes	P ajustada
GO:0035578	Azurophil Granule Lumen	CCT2;ANXA2;CCT8;PRDX6	2.43E-05
GO:0034774	Secretory Granule Lumen	CCT2;ANXA2;PGAM1;CCT8;PRDX6	6.49E-04
GO:0042582	Azurophil Granule	CCT2;ANXA2;CCT8;PRDX6	6.49E-04
GO:0005775	Vacuolar Lumen	CCT2;ANXA2;CCT8;PRDX6	6.49E-04
GO:0005925	Focal Adhesion	HNRNPK;ANXA5;CFL1;TLN1;ACTG1	6.77E-04
GO:0030055	Cell-Substrate Junction	HNRNPK;ANXA5;CFL1;TLN1;ACTG1	6.77E-04
GO:0099513	Polymeric Cytoskeletal Fiber	CCT2;CCT8;ACTG1	6.15E-03
GO:0005911	Cell-Cell Junction	ANXA2;TLN1;ACTG1	7.62E-03
GO:0060205	Cytoplasmic Vesicle Lumen	PGAM1;CCT8	1.58E-02
GO:1904813	Ficolin-1-Rich Granule Lumen	PGAM1;CCT8	1.62E-02
GO:0005912	Adherens Junction	ANXA2;TLN1	2.16E-02
GO:0030688	Preribosome, Small Subunit Precursor	RIOK2	2.40E-02
GO:0101002	Ficolin-1-Rich Granule	PGAM1;CCT8	2.40E-02
GO:0005874	Microtubule	CCT2;CCT8	2.40E-02
GO:0043231	Intracellular Membrane-Bounded Organelle	STIP1;G6PD;HNRNPK;ANXA2;PSMB2;CFL1;RIOK2;PRDX6;ACTG1	2.40E-02
GO:0005856	Cytoskeleton	CFL1;CCT8;ACTG1	2.66E-02
GO:0005634	Nucleus	STIP1;HNRNPK;ANXA2;PSMB2;CFL1;RIOK2;PRDX6;ACTG1	3.12E-02
GO:0031982	Vesicle	ANXA2;CFL1	3.12E-02

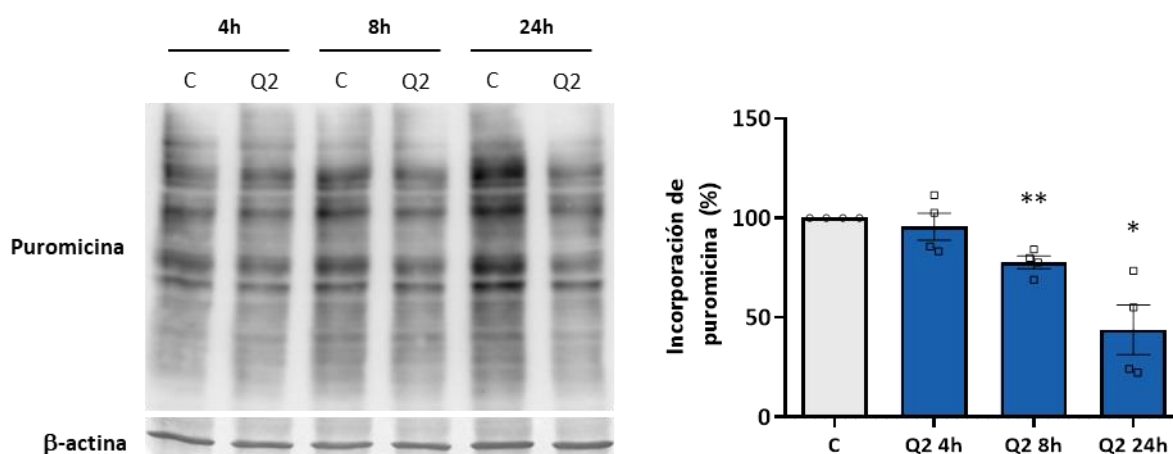


Figura 1. ApMNKQ2 inhibe la traducción global de proteínas a partir de las 8h. La tasa de traducción global se evaluó mediante el método SUnSET (marcaje de proteínas con puromicina y su posterior inmunodetección). Las células MDA-MB-231 se transfectaron con apMNKQ2 a 400 nM y se lisaron a las 4, 8, y 24h, incubando previamente las células durante 30 minutos con puromicina 2 μ M. La gráfica representa la media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes normalizados frente a los niveles de β -actina y expresados en porcentaje respecto al control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control).

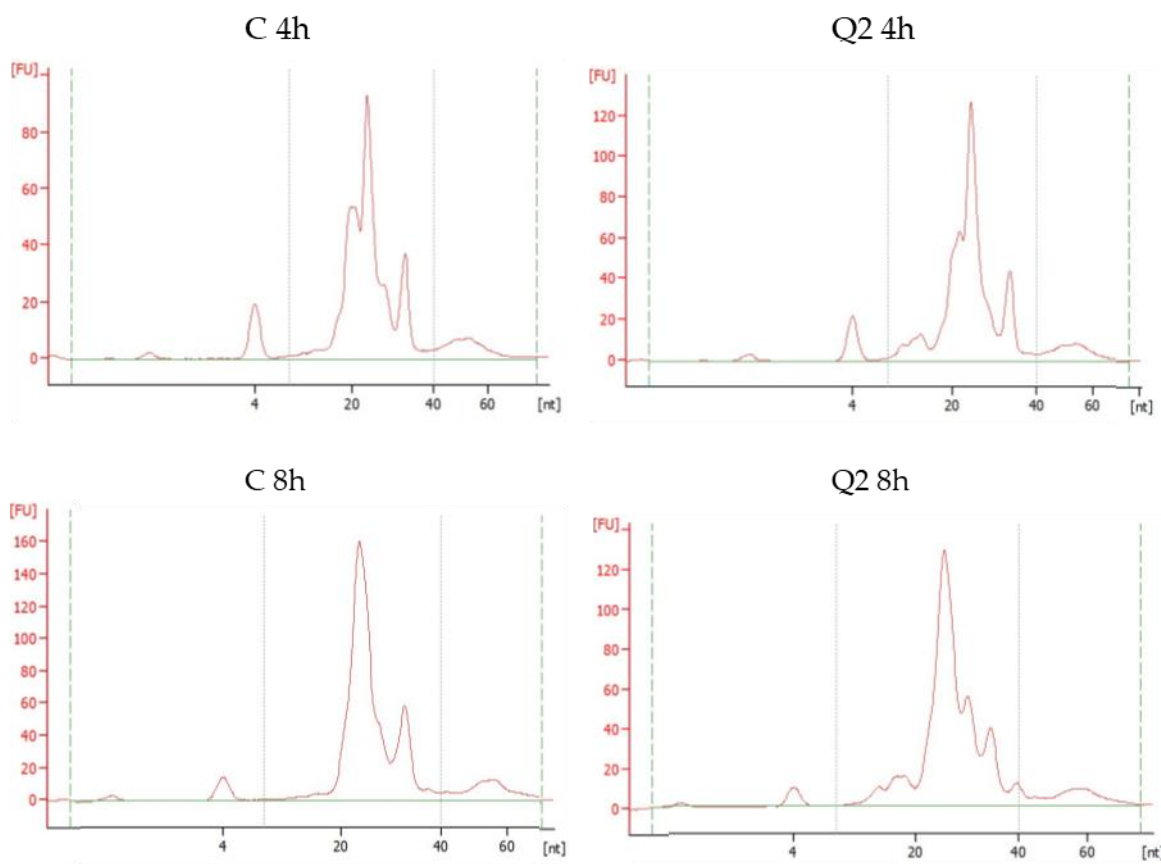


Figura 2. Análisis de la calidad del RNA aislado tras la digestión con RNAsa I. La integridad de los RPFs se analizó en el Bioanalyzer Agilent 2100 con el chip Agilent Small RNA reagents a partir del RNA aislado tras la digestión con RNAsa I de lisados de células MDA-MB-231 tratados con apMNKQ2 a las 4 y 8h y su selección por tamaño en geles de poliacrilamida. En las gráficas se muestra la intensidad de la señal de fluorescencia respecto al número de nucleótidos para uno de los ensayos representativo de cada grupo experimental.

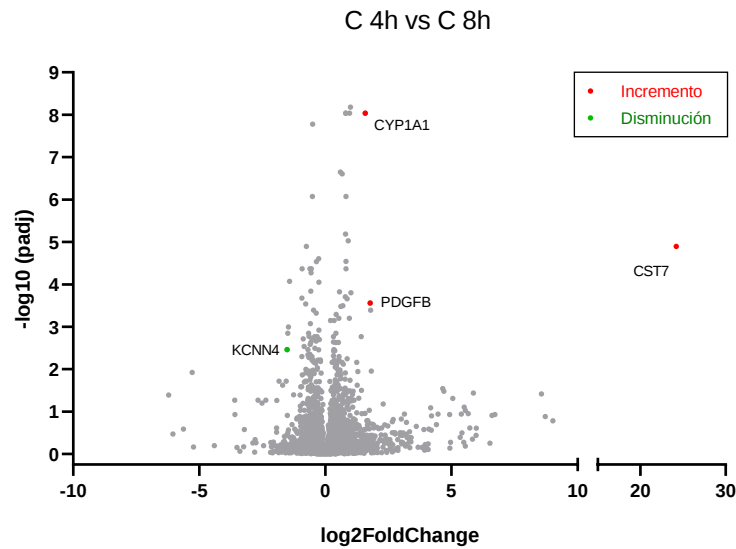


Figura 3. Expresión diferencial de genes entre células control lisadas a las 4h y 8h. Los puntos verdes representan aquellos transcritos con una menor expresión en las células tratadas con apMNKQ2, mientras que los puntos rojos representan los transcritos sobreexpresados con apMNKQ2. Los puntos grises representan los genes cuya expresión no varía respecto al control de acuerdo a los criterios seleccionados ($p_{adj} < 0.01$ y $|\log_2\text{FoldChange}| > 1.5$). La identidad de los genes con mayor expresión diferencial se muestra en la gráfica. El eje de las X muestra el cambio en la expresión de cada transcrito respecto al control en $\log_2$ y el eje de las Y el valor de p corregido en $-\log_{10}$.

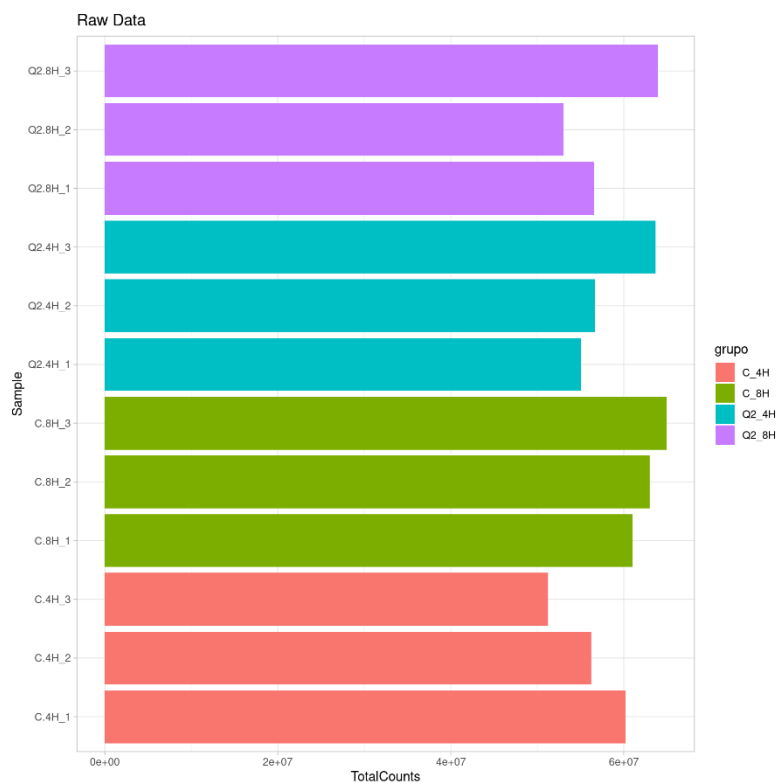


Figura 4. Número total de lecturas total. La gráfica representa el número total de lecturas en crudo alineadas con el genoma humano obtenidas para cada réplica tras la secuenciación del mRNA total de células MDA-MB-231 tratadas con apMNKQ2 durante 4 y 8h.

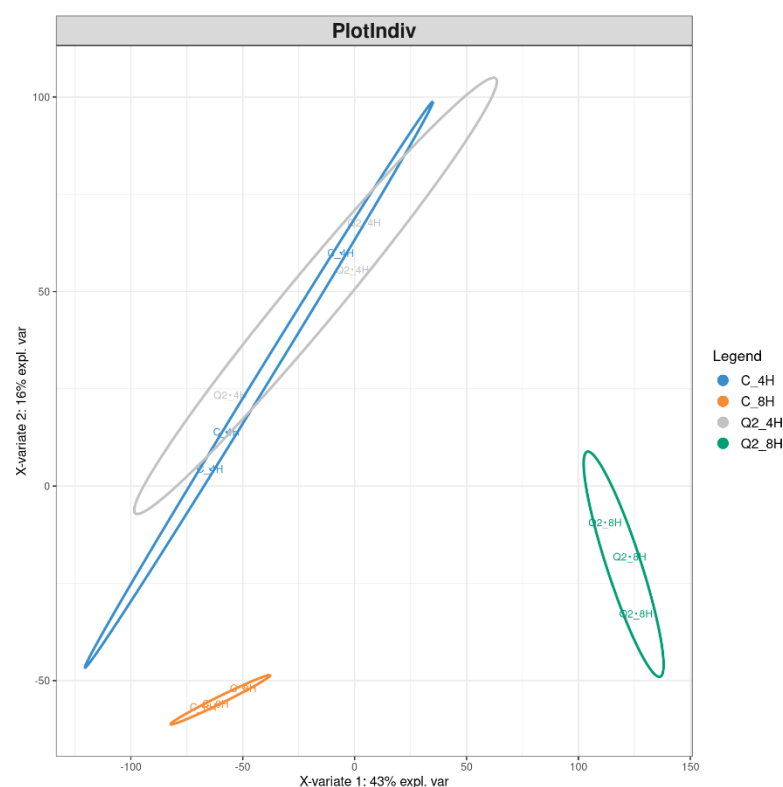


Figura 5. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los niveles de expresión de mRNA en células MDA-MB-231. Cada punto representa el perfil transcriptómico de una réplica experimental y su color, el grupo al que pertenece. La elíptica muestra el intervalo de confianza del 95%. Los ejes representan los dos componentes que explican la mayor variabilidad entre los datos. La menor distancia entre los puntos se asocia con la similitud en los valores de sus variables (genes).

Tabla 2. Enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados en las bases de datos GO (categorías de procesos biológicos), KEGG y Reactome. En la primera columna se muestra el término identificativo (T.I.) de GO y su descripción y a continuación las proteínas que pertenecen a esa categoría y el valor de P ajustada.

PROCESOS BIOLÓGICOS			
T.I. GO	Descripción	Genes	P ajustado
GO:1900744	Regulation Of p38MAPK Cascade	NCF1;GADD45B;DUSP1;GADD45A;IL1B;ZC3H12A;SASH1;VEGFA	0.0004
GO:1900745	Positive Regulation Of p38MAPK Cascade	GADD45B;NCF1;GADD45A;IL1B;ZC3H12A;SASH1;VEGFA	0.0004
GO:0050731	Positive Regulation Of Peptidyl-Tyrosine Phosphorylation	CNTF;CSF2;IL20;NEDD9;THBS4;VEGFA;GREM1;IL6;RETN;NTF3;ENPP2;IL12A;FCGR1A	0.0007
GO:2000319	Regulation Of T-helper 17 Cell Differentiation	NFKB1;ZC3H12A;RC3H1;JUNB;SMAD7	0.0066
GO:0150077	Regulation Of Neuroinflammatory Response	CD200R1;IL6;IL1B;NR1D1;PTGS2	0.0088
GO:0045623	Negative Regulation Of T-helper Cell Differentiation	TNFSF4;ZC3H12A;RC3H1;SMAD7	0.0088
GO:0045765	Regulation Of Angiogenesis	FLT1;KLF4;PIK3CG;THBS4;VEGFA;CLDN5;IL1A;IL6;IL1B;ZC3H12A;STAB1;HMOX1;SASH1;EPHA2	0.0125
GO:0150079	Negative Regulation Of Neuroinflammatory Response	CD200R1;NR1D1;CST7;LDLR	0.0216
GO:1903978	Regulation Of Microglial Cell Activation	IL6;NR1D1;CST7;LDLR	0.0264
GO:0055007	Cardiac Muscle Cell Differentiation	GREM1;ALPK3;SIK1;ASB2;VEGFA	0.0266
GO:0043031	Negative Regulation Of Macrophage Activation	ZC3H12A;NR1D1;CST7;LDLR	0.0266
GO:2000317	Negative Regulation Of T-helper 17 Type Immune Response	ZC3H12A;RC3H1;SMAD7	0.0266
GO:0050727	Regulation Of Inflammatory Response	IL20;NR1D1;NLRC4;ADAMTS12;PTGS2;KLF4;NLRP14;BST1;CD200R1;IL6;BCL6;TNFSF4;IL1B;NFKB1	0.0295
GO:0042509	Regulation Of Tyrosine Phosphorylation Of STAT Protein	SOCS3;CNTF;IL6;CSF2;IL20;IL12A;VEGFA	0.0295
GO:0090049	Regulation Of Cell Migration Involved In Sprouting Angiogenesis	HMOX1;PTGS2;KLF4;HDAC9;VEGFA	0.0295
GO:0090050	Positive Regulation Of Cell Migration Involved In Sprouting Angiogenesis	HMOX1;PTGS2;HDAC9;VEGFA	0.0295
GO:2000320	Negative Regulation Of T-helper 17 Cell Differentiation	ZC3H12A;RC3H1;SMAD7	0.0295
GO:0002042	Cell Migration Involved In Sprouting Angiogenesis	GREM1;NR4A1;EGR3;VEGFA	0.0300
GO:2000630	Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process	EGR1;JUN;MYC;ZC3H12A;FOS;KLF4	0.0361
GO:0043406	Positive Regulation Of MAP Kinase Activity	EDN1;FLT1;IL1B;NTF3;NEK10;PIK3CG;SASH1;VEGFA	0.0363
GO:0035767	Endothelial Cell Chemotaxis	NR4A1;EGR3;VEGFA	0.0363
GO:0005977	Glycogen Metabolic Process	GYS2;PER2;PYGM;NR1D1	0.0388
GO:0042981	Regulation Of Apoptotic Process	FOXO3;FMN2;NLRC4;SOCS3;NUAK2;MYC;NTF3;ANKRD1;EPC1;CD38;IER3;EGR1;JUN;EGR3;OPN3;GADD45B;GADD45A;PLK2;AZU1;DUSP6;HYPK;VEGFA;TNFRSF10D;GREM1;IL6;BCL6;KCNMA1	0.0389
GO:0010634	Positive Regulation Of Epithelial Cell Migration	EDN1;PRKCE;ZC3H12A;ENPP2;RIN2;PIK3CG;SASH1;VEGFA	0.0389
GO:0048738	Cardiac Muscle Tissue Development	GREM1;MYLK2;ANKRD1;SIK1;SCN5A;ASB2	0.0389
GO:0032722	Positive Regulation Of Chemokine Production	EGR1;IL6;IL1B;TNFSF4;HMOX1;AZU1	0.0389
GO:0060291	Long-Term Synaptic Potentiation	GRIN2A;PLK2;GRIN2B;SLC8A2	0.0389
GO:0009250	Glucan Biosynthetic Process	GYS2;PER2;NR1D1	0.0389
GO:0005978	Glycogen Biosynthetic Process	GYS2;PER2;NR1D1	0.0389

GO:0071222	Cellular Response To Lipopolysaccharide	IL1A;IL6;PRKCE;TNFSF4;IL1B;ZC3H12A;ANKRD1;NR1D1;CXCL2	0.0428
GO:0042531	Positive Regulation Of Tyrosine Phosphorylation Of STAT Protein	CNTF;IL6;CSF2;IL20;IL12A;VEGFA	0.0428
GO:0030334	Regulation Of Cell Migration	EDN1;FLT1;NEDD9;VEGFA;SMAD7;CLDN5;PARD6B;RELN;CDH1;IL1B;NTF3;SNAI1;ENPP2;AMOTL2;SRGAP3;PLXNA4;SASH1;EPHA2;FERMT3	0.0467
GO:0043534	Blood Vessel Endothelial Cell Migration	GREM1;NR4A1;EGR3;VEGFA	0.0467

T.I. KEGG	Genes	Valor P ajustado
MAPK signaling pathway	DUSP5;JUN;FLT1;GADD45B;GADD45A;DUSP1;HSPA6;RASGRF1;FOS;DUSP6;VEGFA;IL1A;NR4A1;PPP3R2;EFNA2;MYC;IL1B;NTF3;EPHA2	9.501E-04
TNF signaling pathway	SOCS3;JUN;IL6;EDN1;CSF2;IL1B;FOS;PTGS2;JUNB;CXCL2	4.320E-03
Rheumatoid arthritis	IL1A;JUN;IL6;CSF2;FLT1;IL1B;FOS;CXCL2;VEGFA	4.320E-03
Fluid shear stress and atherosclerosis	IL1A;JUN;EDN1;NCF1;GSTO2;DUSP1;IL1B;HMOX1;SUMO4;FOS;VEGFA	4.320E-03
Leishmaniasis	IL1A;JUN;NCF1;IL1B;IL12A;FOS;PTGS2;FCGR1A	5.067E-03
Osteoclast differentiation	SOCS3;IL1A;JUN;PPP3R2;NCF1;IL1B;FOSB;FOS;FCGR1A;JUNB	6.347E-03
Transcriptional misregulation in cancer	PER2;ARNT2;IL6;CSF2;FLT1;GADD45B;BCL6;GADD45A;MYC;NFKB1;FCGR1A;DUSP6	9.896E-03
Amphetamine addiction	ARC;GRIN2A;JUN;PPP3R2;FOSB;FOS;GRIN2B	9.896E-03
IL-17 signaling pathway	JUN;IL6;CSF2;IL1B;FOSB;FOS;PTGS2;CXCL2	1.125E-02
Hematopoietic cell lineage	IL1A;IL6;CSF2;ANPEP;IL1B;CD7;CD38;FCGR1A	1.395E-02
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	EGR1;IL1A;JUN;IL6;EDN1;PRKCE;IL1B;VEGFA	1.395E-02
Legionellosis	IL6;IL1B;HSPA6;IL12A;NLRC4;CXCL2	1.439E-02
C-type lectin receptor signaling pathway	JUN;IL6;PPP3R2;EGR3;IL1B;CARD9;IL12A;PTGS2	1.509E-02
Lipid and atherosclerosis	VAV3;JUN;IL6;PPP3R2;NCF1;IL1B;HSPA6;CYP1A1;IL12A;FOS;LDLR;CXCL2	1.509E-02
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	JUN;CD200R1;IL6;PPP3R2;CSF2;MYC;FOS;PTGS2;CXCL2;PIK3CG;VEGFA	1.926E-02
Herpes simplex virus 1 infection	ZNF473;ZNF560;ZNF490;CARD9;ZNF57;SOCS3;IL6;ZNF805;IL1B;ZNF627;ZNF614;ZNF679;IL12A;ZNF699;ZNF433;ZNF432;ZNF773;ZNF850;ZNF596;ZNF442	2.192E-02
Pertussis	IL1A;JUN;IL6;IL1B;IL12A;FOS	4.525E-02

T.I. Reactome	Genes	Valor P ajustado
Interleukin-10 Signaling R-HSA-6783783	IL1A;IL6;CSF2;IL1B;PTAFR;IL12A;PTGS2;CXCL2	0.0013
Interleukin-4 And Interleukin-13 Signaling R-HSA-6785807	SOCS3;IL1A;IL6;BCL6;MYC;IL1B;HMOX1;IL12A;FOS;PTGS2;VEGFA	0.0022

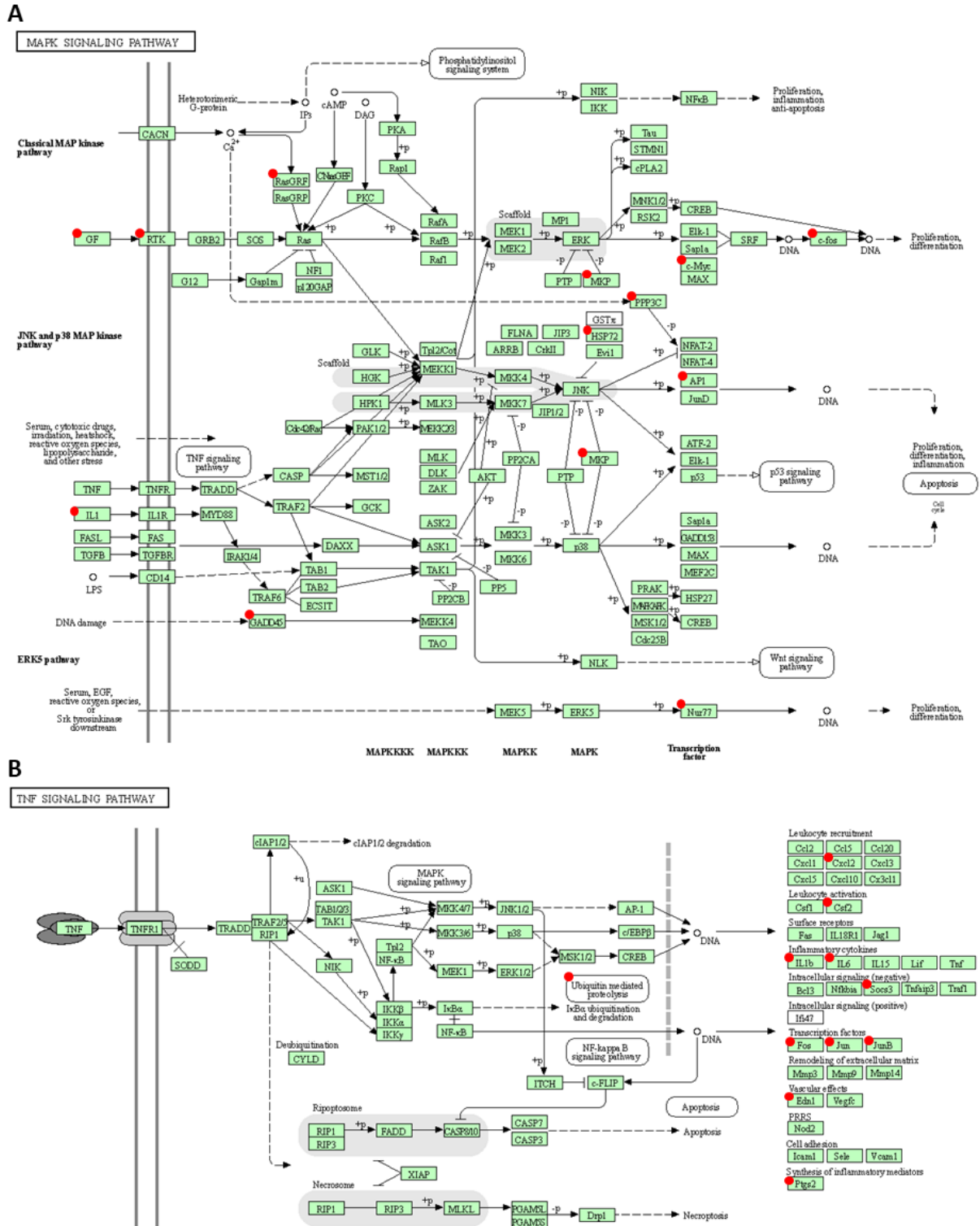


Figura 7. Ruta de señalización de las MAPK (A) y TNF (B) obtenida en KEGG. Los genes diferencialmente expresados en presencia de apMNKQ2 que se agrupan dentro de la categoría de señalización por MAPK y TNF se marcan con un punto rojo.