

Implicación de PGAM en el mecanismo de acción del apMNKQ2.

Raquel Morales García^{1,2, a}, Raquel Ferreras Martín^{2, b}, Victor Manuel González^{2, c}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de aptámeros, IRYCIS-Hospital Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar km 9,100, 28034 Madrid, España.

a. raquel.moralesg@edu.uah.es b. raquel.ferreras@hrc.es c. victor.m.gonzalez@hrc.es

Palabras clave: Mnk1b; PGAM1; Transfección estable; mecanismo de acción

Resumen

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) se caracteriza por su alta agresividad y falta de terapias dirigidas, lo que limita su tratamiento a la quimioterapia convencional. En este contexto, se han identificado nuevas dianas terapéuticas como las quinasas MNK, reguladas por la vía MAPK e implicadas en la progresión tumoral. La isoforma Mnk1b se ha asociado con peor pronóstico en pacientes con TNBC. El aptámero apMNKQ2, con alta afinidad por Mnk1b, ha mostrado efectos antitumorales en modelos de cáncer de mama. Estudios previos apuntan a un posible papel de la enzima glicolítica PGAM1 en el mecanismo de acción del aptámero, al observarse una disminución de su actividad y de la glucólisis celular tras el tratamiento, y una disminución de la forma ácida de la enzima, que podría asociarse con la reducción de fosforilaciones y/o acetilaciones. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la implicación funcional de PGAM1 en el mecanismo de apMNKQ2, mediante la generación de un modelo de TNBC con sobreexpresión estable de PGAM1 en la línea MDA-MB-231. Los métodos de transfección utilizados produjeron poblaciones celulares con baja eficiencia de expresión del transgén, probablemente debido a la integración aleatoria del plásmido y a procesamiento no deseado. Por ello, se generaron clones celulares con expresión homogénea. Los ensayos de viabilidad indicaron que la sobreexpresión de PGAM1 parece atenuar la citotoxicidad del aptámero, sin afectar a la expresión de la enzima, pero sí reduciendo su actividad. Esto podría deberse a modificaciones postraduccionales de PGAM. Aunque el análisis del perfil de fosforilación mediante Phos-tagTM no mostró diferencias notables, la baja resolución de la técnica limita su interpretación. En conjunto, estos resultados preliminares apoyan una posible implicación de PGAM1 en la acción de apMNKQ2 y resaltan la necesidad de explorar su regulación postraduccional en estudios futuros.

Cita: Morales García, Raquel; Ferreras Martín, Raquel; González, Victor Manuel (2025) Implicación de PGAM en el mecanismo de acción del apMNKQ2. *dianas* 14 (2): e202509fp03. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202509fp03](https://dianas.web.uah.es/journal/e202509fp03) <https://dianas.web.uah.es/journal/e202509fp03>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

Copyright: © Morales-García R, Ferreras-Martín R, González VM. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

El cáncer de mama fue el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia en 2022, con 2,3 millones de nuevos casos y es la cuarta causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo, representando un 6,9% de todas las muertes por cáncer [1]. Para 2040, se prevé que aumente a más de 3 millones de nuevos casos y 1 millón de muertes cada año debido al crecimiento de la población y al envejecimiento [2]. Se han descrito diferentes tipos moleculares de cánceres de mama, entre los que se encuentra el Cáncer de mama Triple Negativo (TNBC, por sus siglas en inglés), que carece de expresión de PR, ER y HER2, además de tener una alta proliferación [3,4]. El TNBC se compone de varios subtipos moleculares, cuyo tratamiento se ha limitado principalmente a la quimioterapia [3,4].

Las MNK, proteínas quinasas que interaccionan con proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), son una familia de proteínas que integran señales de la vía de las MAPK. En humanos, están codificadas por dos genes, Mnk1 y Mnk2, que mediante *splicing* alternativo generan 4 isoformas: Mnk1a, Mnk1b, Mnk2a y Mnk2b [5]. Este evento produce un cambio en el marco de lectura produciendo el intercambio de los últimos 89 aminoácidos de la isoforma Mnk1a por 12 aminoácidos diferentes que caracterizan a la Mnk1b [6]. De esta manera, Mnk1b carece del dominio de unión a MAPK localizado en la región C-terminal, lo que la hace parcialmente independiente de las MAPK [7], cuenta con una actividad basal más elevada que Mnk1a y su activación no depende de la fosforilación de los residuos del bucle de activación. El sustrato principal de las Mnk1 es el factor de iniciación de traducción eIF4E, regulador clave de la traducción de proteínas asociadas al ciclo celular, supervivencia y motilidad. También se han descrito otros sustratos como Sprouty2, la ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 (hnRNPA1), el factor de *splicing* asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF) y la fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2) [8]. Mnk1 se ha implicado en la tumorigénesis de diversos tipos de cáncer, incluyendo pulmón, ovario, glioblastoma y cáncer de mama [5], donde su sobreexpresión se correlaciona con un peor pronóstico clínico. Asociado a una menor supervivencia [9], se han registrado niveles de MNK1b elevados tanto a nivel

proteico como de RNAm en TNBC, implicados en procesos como migración, invasión y proliferación celular. Esta participación en el cáncer ha sido relacionada tradicionalmente con la fosforilación del eIF4E [10]. Sin embargo, futuros estudios sobre el rol de las isoformas de Mnk1 en otras rutas de señalización celular independientemente de la fosforilación de eIF4E, como Ras/MNK y PI3K/AKT/mTOR [11], y su acción sobre otros sustratos, como hnRNP A1, PSF, cPLA2 o Sprouty2, aún son necesarios para detallar su papel en la patología. Además, se ha demostrado que la ausencia de Mnk1/2 no altera el desarrollo normal en ratones y retrasa la progresión tumoral [12, 13], convirtiéndolas en una potencial diana terapéutica hacia las que centrar los estudios en búsqueda de tratamientos potencialmente seguros [14].

Los aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios (DNA o RNA) de pequeño tamaño que adquieren estructuras tridimensionales específicas que les permite unirse a sus dianas con alta afinidad y especificidad [15]. Se seleccionan mediante la tecnología SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), a partir de bibliotecas aleatorias de oligonucleótidos [16]. En los últimos años, han destacado como potenciales agentes terapéuticos debido a sus ventajas frente a otros fármacos, como los basados en anticuerpos [17]. Han sido estudiados como agentes antineoplásicos, y algunos han alcanzado fases clínicas [18]. En consecuencia, los aptámeros se consideran herramientas terapéuticas con gran potencial en el tratamiento de aquellos tumores en los que las opciones terapéuticas son limitadas, como en el TNBC. El aptámero apMNKQ2 es una versión optimizada de 29 nucleótidos derivada del aptámero parental apMNK2F, que ha mostrado efectos antitumorales en cáncer de pulmón y de mama [19, 20]. Se ha comprobado *in vitro* que el aptámero presenta una alta afinidad y especificidad hacia Mnk1b en comparación con otras quinasas. En estudios funcionales, apMNKQ2 inhibe procesos clave del cáncer de mama como la proliferación celular, la formación de colonias, la migración, la invasión y la transición epitelio-mesénquima *in vitro*, además de reducir el crecimiento tumoral y el número de metástasis en modelos murinos de esta enfermedad [21, 22].

Como parte del estudio del mecanismo de acción del aptámero apMNKQ2, se realizó un análisis proteómico basado en electroforesis bidimensional (2D-DIGE) e identificación de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se detectó una disminución de la forma ácida de la enzima glicolítica fosfogliceraldehído mutasa 1 (PGAM1) en células TNBC de la línea MDA-MB-231 tratadas con apMNKQ2, lo que podría relacionarse con una disminución de ciertas modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones y/o acetilaciones, modificaciones activadoras de PGAM1 [21–23]. Además, en ensayos de actividad de la PGAM se observó una disminución significativa pero leve de la actividad enzimática frente a células no tratadas con apMNKQ2 [24], y en los ensayos de la tasa de glucólisis en el Agilent Seahorse XF Analyzer se observó una disminución de la glucólisis basal y de la compensatoria tras el tratamiento.

En este contexto, los objetivos del presente estudio fueron caracterizar la posible implicación de PGAM1 en el mecanismo de acción de apMNKQ2 por medio de la obtención de un modelo experimental basado en la sobreexpresión estable de PGAM1 en la línea MDA-MB-231, así como el análisis del efecto del aptámero sobre la viabilidad celular, la expresión de PGAM-myc, la actividad enzimática y los niveles de fosforilación de la enzima glicolítica.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

La línea celular MDA-MB-231 se cultivó en medio Ham's F12 (Biowest) y DMEM (Biowest) a partes iguales, enriquecidos con 2 mM L-glutamina (Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 100 µg/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 0.25 µg/ml de anfotericina (antibiótico-antimicótico, Gibco), mantenidos en atmósfera húmeda, 5% de CO₂ y 37°C de temperatura en un incubador. Alcanzada una confluencia del 70-80% de las células sembradas en monocapa, se realizaron los pases y la siembra de células lavando los frascos con PBS 1x (VWR) y levantándolas enzimáticamente con tripsina 0.25% EDTA 0.53 mM (Gibco) a 37°C durante 3 minutos. Luego, se neutralizó la tripsina diluyendo en una relación 1:9 con medio. Las células se sembraron en placas de cultivo celular de 1, 6, 8, 12, 18 o 96 pocillos (Corning).

Transfección de células

El plásmido pCDNA3.1(+) con el gen de resistencia a la geneticina, el gen de PGAM-Myc y con un sitio único de restricción ScaI (figura 1) se obtuvo de Thermo Fisher (vector PGAM1), como el plásmido pCDNA3.1(+) sin el gen de la enzima glicolítica (vector vacío).

Previo a la transfección, los vectores PGAM/vacío fueron digeridos con FastDigest ScaI™ (Thermo Scientific) durante 15 minutos. Los productos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 1% teñido con GelRed™ (Sigma-Aldrich) a 110 V y revelados en un transiluminador UV (Nippon).

El aptámero apMNKQ2 fue sintetizado por Biospring con la siguiente secuencia: TGGGGTGGGCGGGCGGGGTGGGGTGGT. Antes de la transfección, los aptámeros fueron

polvo durante 1 h. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario (mouse anti-C-Myc, dilución 1:1000 en PBS-Tween 0,1 %, (Santa cruz)) a 4 °C en agitación *overnight*. Las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario (rabbit anti-mouse) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), diluido a 1:5000 en PBS al 1% de leche desnatada. Finalmente, se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit Clarity Western ECL Substrate (BioRad), 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). La actina (β -Actin) fue utilizada como control de carga.

Inmunocitoquímica (ICQ)

Las células se sembraron en placas previamente tratadas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) a 0.05 mg/ml. Tras 24 h, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos. Se incubaron con PBS con FBS al 10% durante 1 h a temperatura ambiente y, después, con el anticuerpo primario frente a c-Myc (dilución 1:200 en PBS-FBS al 10%) durante 16 h a 4°C. Tras sucesivos lavados con PBS, las células se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario fluorescente Alexa 568-anti-IgG de conejo (ThermoFisher) (dilución 1:300 en PBS-FBS al 10%). Después, se realizaron lavados con PBS y se trató con DAPI para teñir los núcleos. Las imágenes se tomaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus IX70) y se calculó la eficiencia de la generación de líneas estables haciendo una media del porcentaje de células con fluorescencia en 4 cuadrantes diferentes. Como controles se omitió el anticuerpo primario y se usó células transfectadas con vector vacío (Estb -).

Ensayos de viabilidad celular (MTT)

El análisis de la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Sigma-Aldrich). 10^4 células fueron sembradas por triplicado y tratadas con aptámero a 0 nM, 70 nM, 140 nM, 280 nM y 400 nM. Tras 48h de la transfección, fueron incubadas durante 3h a 37°C con 5% de CO₂ con 100 μ l de reactivo MTT (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml en medio de cultivo. Los cristales de formazán se disolvieron en SDS (Sigma-Aldrich) al 10% y 10mM HCL durante 16h a 37°C. La absorbancia fue medida a 540nm en el lector de placas Infinite M Plex (TECAN), y los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de viabilidad relativa respecto al control.

Ensayo de actividad fosfoglicerato mutasa (PGAM)

La actividad enzimática de la PGAM1 se evaluó acoplando la conversión de 3-PG a 2-PG con las reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por la enolasa, la piruvato quinasa (PK) y la lactato deshidrogenasa (LDH). La actividad de la PGAM1 se calculó indirectamente a partir de la pendiente de la fase lineal de la curva de la absorbancia a 340nm obtenida de la oxidación de NADH por la LDH. Los ensayos se realizaron por triplicado, 24 horas después del tratamiento con o sin aptámero, utilizando 20 μ g de lisado celular en 50 μ L de tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 100 μ L de mezcla de reacción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0,4 mM NADH, 3 mM ADP, 20 μ M 2,3-bisfosfoglicerato, 1,2 U/mL de LDH, 1 U/mL de PK y 0,6 U/mL de enolasa (todos Sigma-Aldrich)). Las mezclas se incubaron durante 15 minutos a 37°C en placas p96. Para iniciar la reacción, se añadieron 50 μ L de la solución de 4mM 3-PG (Sigma-Aldrich) en Tris-HCl 100 mM, pH 8.0. La absorbancia a 340 nm se midió en el lector de placas cada 15 segundos durante 20-30 minutos. Se incluyeron controles negativos sin lisado celular [24].

Inmunoprecipitación (IP)

La IP de PGAM1-Myc se llevó a cabo utilizando una resina de agarosa conjugada con anticuerpo α -c-Myc (Pierce™ Anti-c-Myc Agarose, Thermo Scientific). Se emplearon 250 μ g de lisado a 1 μ g/ μ l de células tratadas con apMNKQ2 140 nM. Los lisados se incubaron con 30 μ L resina al 50% en TLC a 4°C, 3h en rotación. Luego se lavó 5 veces con 500 μ l de TLC mediante centrifugación (12000 g, 45segundos). El primer sobrenadante se conservó para evaluar la eficiencia de la IP. Después, se añadieron 15 μ l de tampón de carga de electroforesis sobre la resina, y las muestras se calentaron a 95°C 5 minutos y fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE, seguida de WB o tinción con Phos-tag™ (NARD) y tinción con azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) coomassie.

Phos-tag

Phos-tag™ cuenta con un fluoróforo que se une específicamente a grupos fosfato dando lugar a un producto colorimétrico medible. Los geles se trataron siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se tiñeron con azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y se destiñeron en solución etanol al 20% y ácido acético al 7%. Los geles se revelaron con el sistema de detección ChemiDoc (BioRad) y las bandas obtenidas se cuantificaron y fueron analizadas con el programa Imagelab.

Resultados

La digestión del vector aumenta la eficacia de la generación de células estables PGAM1-myc.

Con el objetivo de establecer una línea celular estable que sobreexpresara PGAM1, se emplearon dos estrategias basadas en la transfección del vector PGAM1/vacío y la posterior selección de células transfectadas con geneticina. En la primera estrategia, se utilizó el vector en su forma circular (método 1) mientras que en la segunda se empleó el vector linealizado mediante digestión con ScaI (figura 2.B) (método 2) [25]. En primer lugar, se estableció una concentración letal de geneticina para la línea MDA-MB-231 a partir de una curva de viabilidad con concentraciones crecientes de geneticina (figura 2.A). Según los resultados obtenidos, se estableció una concentración de 1500 µg/ml para la selección. La expresión de PGAM1-myc se confirmó mediante WB en lisados (figura 2.C) e ICQ (figura 2.D), lo que permitió evaluar la eficacia del proceso de generación de líneas estables. En ambos métodos se obtuvieron células que expresaban PGAM1-myc. Sin embargo, estas representan un bajo porcentaje de la población total: 3,75% en el método 1 y 7,01% en el método 2. Esto sugiere que la previa linealización del vector mejora la eficacia del protocolo, aunque las células que expresan la enzima de interés no son representativas de la población obtenida.

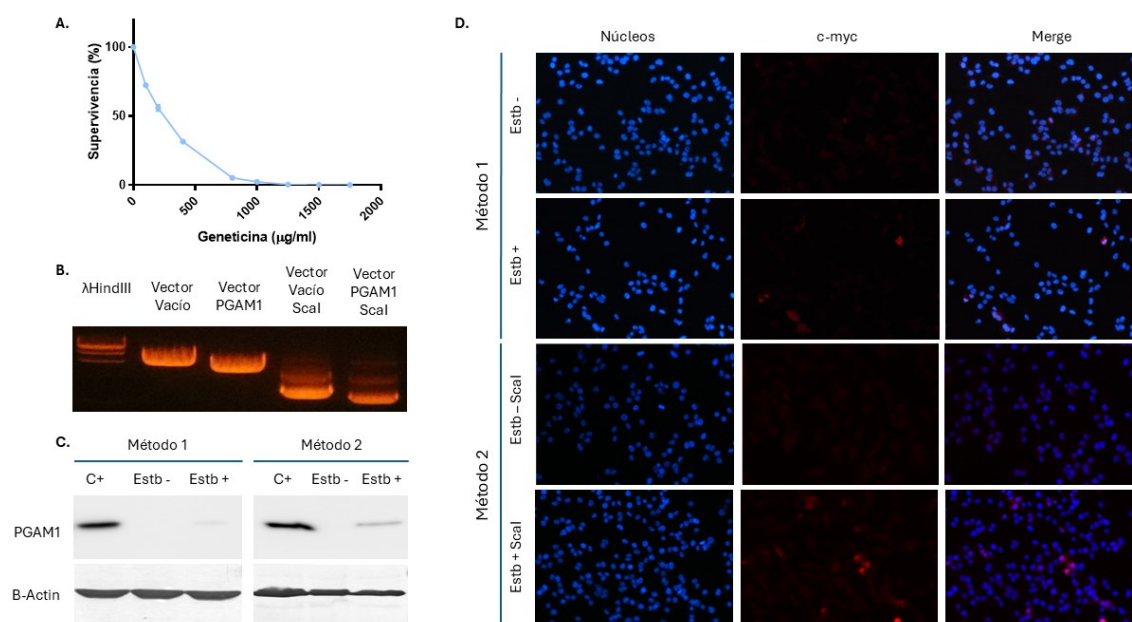


Figura 2- Sensibilidad a la geneticina y comparación de los dos métodos de obtención de poblaciones celulares estables para PGAM1-myc. A. Curva de sensibilidad a la geneticina. B. Digestión del vector y Electroforesis en gel de agarosa (1%). λHindIII: marcador de tamaño de DNA; vector vacío: plásmido sin inserto; vector PGAM1: plásmido con inserto; ScaI: Digestión con enzima de restricción ScaI. C. Representación del WB de poblaciones estables. Se utilizó una muestra con sobreexpresión PGAM-Myc transitoria como control positivo (C+). D. Imagen representativa de la ICQ de las poblaciones estables obtenidas por método 1 y 2. En rojo se marca c-myc y en azul DAPI. Estb-: células transfectadas con vector vacío. Estb+: células transfectadas con vector PGAM1

Los clones 10 y 25 constituyen poblaciones celulares que expresan establemente PGAM1-myc

Dada la baja eficiencia de la generación de líneas estables, se obtuvieron 37 clones con el fin de conseguir poblaciones en las que hubiera un mayor porcentaje de células que expresaran el inserto, que fueron analizados por ICQ (figura 3.A) y WB (figura 3.B). Los clones 10 y 25 fueron positivos, observándose en la ICQ una mayor expresión de PGAM1-myc en el clon 10.

El apMNKQ2 tiende a una menor citotoxicidad en el clon 10 y reduce la actividad PGAM en todas las poblaciones, independientemente de la expresión de PGAM1-myc.

Se realizaron ensayos MTT 48h después de la transfección de apMNKQ2 a diferentes concentraciones para determinar si la sobreexpresión de PGAM1-myc suponía una mejor supervivencia frente a la línea control estable. El clon 10 presenta valores ligeramente más altos de supervivencia en las concentraciones más elevadas de aptámero; en valores de aptámero 280 nM la línea estable cuenta con un 35% de supervivencia, frente al 45% de supervivencia del clon 10. Mientras tanto, el clon 25 se comporta igual que la línea control (figura 4.A). Además, se comparó la viabilidad de las poblaciones celulares en ausencia de aptámero a las 48h (figura 4.B), observándose que la PGAM1 no aporta una mayor viabilidad a los clones por sí misma.

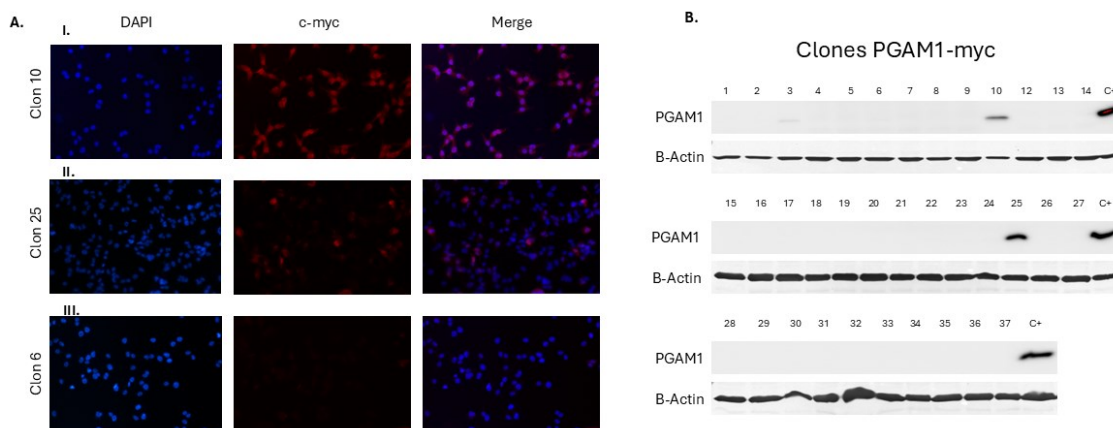


Figura 3- Obtención de clones a partir de las poblaciones estables PGAM1-Myc. A. ICQ de los clones. Clon 6: ejemplo de clon negativo B. Verificación de la expresión de PGAM1-myc en las poblaciones clonales por WB.

Para comprobar que el menor efecto inhibitorio de la viabilidad de apMKNKQ2 sobre el clon 10 no se debe a una disminución de la expresión de PGAM1-myc. Se realizaron WB de lisados obtenidos 24h después de tratar con apMKNKQ2 a 140nM (figura 4.C y 4.D). El aptámero no parece disminuir los niveles proteicos de PGAM1 de los clones, ya que estos se mantuvieron o aumentaron en las dos repeticiones del ensayo. Además, podemos observar una mayor expresión de PGAM1-myc en el clon 10 respecto al 25, lo que puede explicar el diferente comportamiento de los clones ante apMKNKQ2. Por lo tanto, la PGAM1 podría estar implicada en la distinta inhibición de la viabilidad provocada por el aptámero.

Por otro lado, se realizaron ensayos de actividad PGAM para determinar el efecto del aptámero sobre su actividad enzimática en los clones 10 y 25 (figura 4.E). El apMKNKQ2 es proclive a inhibir levemente la actividad enzimática en todos los grupos estudiados. También se analizó la actividad de PGAM de los clones 10 y 25 sin tratamiento, obteniendo un 145,95% y un 113,95% frente a la población Estable- respectivamente (figura 4.F), lo que concuerda con los niveles de expresión de PGAM-myc de las líneas.

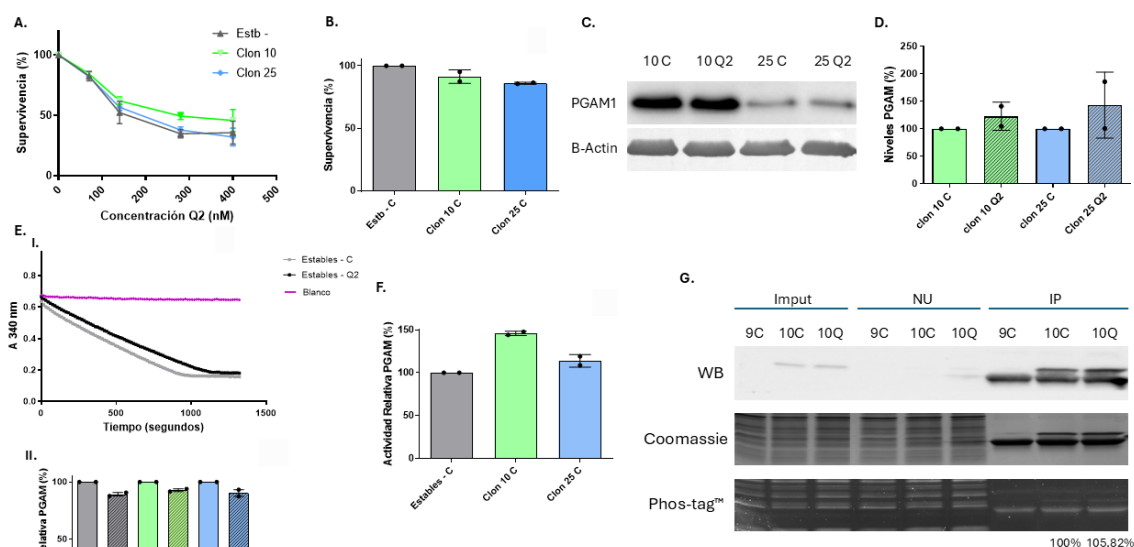


Figura 4- Efecto de apMKNKQ2 sobre la viabilidad celular, la actividad PGAM, expresión y su perfil de fosforilación. A. Representación de la viabilidad de células MDA-MB-231 analizada mediante ensayos MTT. Se representan los resultados de 2 ensayos independientes. B. Gráfica representativa de la viabilidad de las distintas poblaciones clonales respecto a la población Estb-, (media de 2 ensayos independientes). C. efecto de apMKNKQ2 a 140nM sobre los niveles de PGAM1-myc por WB de clones D. Cuantificación de la expresión de PGAM-myc. E. I) Ejemplo de Absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo representativa de la actividad PGAM en un ensayo de población Estable - y II) Actividad PGAM en lisado de los clones 24h después de la transfección con apMKNKQ2. Representa la media $\pm$ SEM de la actividad de la PGAM1 de 2 ensayos independientes en porcentaje respecto al control. F. Actividad PGAM basal de los clones respecto al control en 2 ensayos independientes. G. Efecto de apMKNKQ2 sobre la fosforilación de PGAM. IP revelada por WB, tinción coomassie y Phos-tag™, en 1 ensayo. 9C: control IP con células Estb-; Imput: 20 μ g de proteínas de lisado celular completo; NU: Fracción no unida.

El apMNKQ2 no produce cambios en la fosforilación de PGAM1-myc

El estudio de la fosforilación de PGAM1-myc se llevó a cabo para comprobar si el apMNKQ2 provoca cambios en la fosforilación de PGAM1. La IP se verificó mediante WB utilizando Ac frente a c-myc (figura 4.G). No se observaron diferencias en la fosforilación de PGAM1-myc, lo que indica que el aptámero no produce cambios en los niveles de fosforilación de PGAM cuando se analizan por tinción con Phos-tag TM.

DISCUSIÓN

En estudios previos, nuestro grupo de investigación observó algunos mecanismos de acción de apMNKQ2 que podrían ser independientes de la inhibición de la actividad quinasa de Mnk1 sobre eIF4E. Paralelamente se identificó a PGAM1 como una posible mediadora de los efectos citotóxicos del tratamiento, al observarse que, tras la exposición a apMNKQ2, disminuía la forma ácida de la enzima (pI 6.2), lo que se podría asociar a una leve pero significativa reducción de su actividad enzimática, así como de la glicólisis basal y compensatoria observadas tras el tratamiento. Esta reducción de la forma ácida podría deberse a pérdida de modificaciones postraduccionales activadoras, como fosforilaciones. Luego, los objetivos de este estudio fueron establecer una población de MDA-MB-231 con expresión estable de PGAM1 y evaluar el efecto del aptámero en la viabilidad, expresión de PGAM-myc, actividad enzimática y sus niveles de fosforilación.

El vector PGAM1/vacío empleado fue seleccionado por su eficacia en trabajos anteriores para obtener poblaciones con expresión recombinante transitoria en MDA-MB-231 y por contener el gen de resistencia a geneticina, lo que permite la selección y obtención de sobreexpresión estable. Entre los dos métodos de generación de líneas estables utilizados, el método 2 presenta el doble de eficacia porque el plásmido fue digerido por ScaI previo a la transfección, lo que posiblemente reduzca la posibilidad de que el transgen sea procesado de manera no deseada favoreciendo la correcta integración en el genoma [26]. En ambos métodos, las células fueron sometidas a selección en medio de cultivo con 1500 µg/ml de geneticina. Debido a que hubo crecimiento celular, el casete de resistencia del plásmido fue integrado correctamente en el genoma de las células seleccionadas y expresado a un nivel suficiente para permitir la supervivencia celular, mientras que sólo una pequeña parte de las células expresaba la proteína de interés. Varias hipótesis pueden explicar estos resultados. Primero, la integración aleatoria del plásmido [27] en el genoma puede exponer al transgén a lo que se conoce como *position effect*, es decir, la influencia del entorno genómico sobre su expresión. La inserción puede ocurrir tanto en regiones de eucromatina, más accesibles y transcripcionalmente activas, como en regiones de heterocromatina, compactas y reprimidas [28-30] y la presencia de elementos reguladores represivos o un contexto epigenético desfavorable pueden impedir la expresión eficiente del transgen [31]. Otra hipótesis consiste en la diferencia de susceptibilidad de los promotores del plásmido al silenciamiento epigenético. En este sentido, se ha descrito que el promotor CMV, promotor de PGAM1-myc, puede ser más propenso a sufrir silenciamiento epigenético, mientras que el promotor SV40 [32] del gen de resistencia a la geneticina (NeoR) puede no ser tan susceptible, por lo que podría expresarse NeoR en niveles necesarios para generar la resistencia sin expresar el gen de la PGAM1. También es posible que durante el proceso de integración se haya producido una pérdida parcial o una reorganización estructural del plásmido [33]. En este caso, podría haberse integrado únicamente el casete de resistencia, perdiéndose total o parcialmente el gen de PGAM1 o integrándose una forma truncada de este, perdiéndose la expresión de la región C-terminal, donde se encuentra la etiqueta c-myc, de manera que los anticuerpos empleados dirigidos específicamente a esa región serían ineficaces. Futuros estudios podrían abordar esta cuestión mediante PCR genómica para verificar la integración completa del transgén, WB con anticuerpos dirigidos a diferentes regiones de PGAM1, o técnicas como Southern blot o secuenciación [34, 35]. Estas aproximaciones permitirían identificar el origen de la baja eficiencia observada y optimizar la técnica. Alternativas más eficientes y precisas que la estrategia de transfección empleada podrían mejorar significativamente la expresión del transgén, como el sistema *Flp-In*, transposones como *Sleeping Beauty*, vectores lentivirales o herramientas basadas en *CRISPR/Cas9* con *Knock-in* dirigido [36, 37].

Por otro lado, obtuvimos 37 poblaciones clonales por el método de dilución límite. De estas, se seleccionaron los clones 10 y 25 para los ensayos posteriores, debido a su adecuada sobreexpresión de PGAM1, verificada por ICQ y WB (Figura 3). Este procedimiento es uno de los más empleados en estudios funcionales a la hora de generar poblaciones clonales recombinantes debido a su relativa sencillez técnica, aunque su implementación requiere una inversión considerable de tiempo y recursos económicos [38]. El empleo de los clones permitió lograr una sobreexpresión más homogénea y estable de PGAM1 sin afectar la viabilidad basal de las células, lo que ha permitido interpretar con mayor precisión la implicación funcional de PGAM1 en el mecanismo de acción de apMNKQ2 en los ensayos de viabilidad celular, actividad enzimática, IP y nivel de fosforilación. No obstante, trabajar con clones también implica importantes limitaciones. La principal limitación es el riesgo de inducir sesgo poblacional reduciendo la variabilidad celular original de la línea MDA-MB-231 [39] al seleccionar inintencionalmente clones que han experimentado cambios fenotípicos no deseados, debidos a 3 posibles razones: I) adaptaciones celulares y cambios epigenéticos ante el estrés inducido por las condiciones experimentales [40, 41]; II) diferente sitio de integración del transgen debido a la integración aleatoria del vector en cada célula [42]; y III)

características celulares propias de la diversidad inherente de la población [43]. De hecho, algunos estudios han profundizado en los efectos de la clonación a nivel genómico, transcriptómico y proteómico. Bernhard et al. estudiaron el impacto a nivel proteómico en líneas celulares de cáncer pancreático de la obtención de clones. Observaron como el procedimiento afectó significativamente en el metabolismo, proliferación, estrés y adhesión celular, de manera característica a cada línea celular [44]. Estos hallazgos junto con otros, como los del equipo de Funnell et al., que analizaron líneas celulares sanas y de TNBC mediante secuenciación genómica unicelular [45], nos hacen concluir que cada clon presenta un perfil genómico, transcripcional y proteómico propio, por lo que los clones 10 y 25 podrían no representar completamente la población parental. Estudios recientes sugieren que la utilización de sistemas de integración dirigida en loci específicos puede mitigar el sesgo inducido por la integración aleatoria del transgen y posterior clonación, dando lugar a poblaciones clonales más homogéneas y reproducibles, [42] lo que sería una estrategia alternativa para futuros estudios de la función de PGAM1 en modelos clonales. A pesar de estas limitaciones, el uso de clones permitió una caracterización más controlada del papel de PGAM1 en la respuesta al tratamiento con apMNKQ2. No obstante, los resultados obtenidos deben interpretarse teniendo en cuenta estas posibles fuentes de sesgo biológico.

Los ensayos de actividad de PGAM mostraron que, aunque las poblaciones con mayor expresión de PGAM1 presentaron una mayor actividad basal, la inhibición causada por apMNKQ2 fue similar en todas las poblaciones estudiadas, lo que sugieren que el aptámero afecta a la función de PGAM1 independientemente de su nivel de expresión. Además, la expresión total de PGAM1-myc en las poblaciones clonales detectada por WB no parece reducirse con el tratamiento con el aptámero, ya que en los resultados obtenidos los niveles proteicos se mantenían o aumentaban. La disminución de la actividad enzimática podría estar relacionada con modificaciones postraduccionales que regulan su actividad fosfomutasa [22–24]. La disminución de la forma ácida (pI 6.2) observada en estudios anteriores [24] se podría asociar con disminución de fosforilaciones y/o acetilaciones. En este trabajo, el ensayo con Phos-tag™ no mostró diferencias entre las condiciones tratadas con y sin aptámero, por lo que son necesarios ensayos más resolutivos como el uso de Ac específicos frente a residuos fosforilados concretos. Dado que se ha descrito que la acetilación de PGAM1 puede regular su actividad enzimática [23] y que cambios en los niveles de acetilaciones podrían explicar la reducción de la actividad PGAM observada ante el tratamiento con apMNKQ2, sería interesante realizar ensayos específicos para determinar las variaciones en las acetilaciones de PGAM1 posiblemente relacionadas con el mecanismo de acción del apMNKQ2, como detección de acetilaciones por espectrometría de masas [46] o WB con Ac α -acetil-lisina [47]. Finalmente, los ensayos de viabilidad indican que la sobreexpresión de PGAM1 por sí misma no parece afectar a la supervivencia basal de las células, pero sí tiende a atenuar parcialmente el efecto citotóxico de apMNKQ2, lo que sugiere que PGAM1 podría estar implicada en su mecanismo de acción. Aunque estas observaciones son preliminares y deben confirmarse mediante un mayor número de réplicas y análisis estadísticos, proporcionan un punto de partida para futuros estudios dirigidos a esclarecer el papel de PGAM1 en el efecto antitumoral de apMNKQ2.

Conclusión

La digestión del vector mejora la eficiencia de generación de células estables PGAM1-myc. ApMNKQ2 no parece alterar la fosforilación total de la enzima ni disminuir su expresión, pero inhibe la actividad PGAM. Este estudio ofrece resultados preliminares que sugieren una posible implicación funcional de PGAM1 en el mecanismo de acción del aptámero y la caracterización de las modificaciones postraduccionales en futuros estudios podrán esclarecer el rol de la enzima en el funcionamiento del aptámero.

Referencias

1. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263.
2. Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 66, 15–23.
3. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66.
4. Balkrishna, A., Kumar, S., Malik, R., Mehra, K. S., Chaturvedi, H., Okeshwar, & Mittal, R. (2025). Unveiling role of oncogenic signalling pathways in complicating breast cancer. *BioMedicine*, 15(1), 13–21.
5. Pinto-Díez, C., Ferreras-Martín, R., Carrión-Marchante, R., González, V. M., & Martín, M. E. (2020). Deeping in the Role of the MAP-Kinases Interacting Kinases (MNKs) in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2967.
6. O’Loughlin A, Gonzalez VM, Pineiro D, Perez-Morgado MI, Salinas M, Martin ME. Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1. *Exp Cell Res*. 2004; 299:343–55
7. O’Loughlin, A., González, V.M., Jurado, T., Salinas, M., and Martín, M.E. (2007). Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1416–1427.

8. Buxade, M., Parra-Palau, J. L., & Proud, C. G. (2008). The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 5359–537.
9. Pinto-Díez, C., García-Recio, E. M., Pérez-Morgado, M. I., García-Hernández, M., Sanz-Criado, L., Sacristán, S., Toledo-Lobo, M. V., Pérez-Mies, B., Esteban-Rodríguez, I., Pascual, A., García-Villanueva, M., Martínez-Jañez, N., González, V. M., & Martín, M. E. (2018). Increased expression of MNK1b, the spliced isoform of MNK1, predicts poor prognosis and is associated with triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 9(17), 13501–13516.
10. Wendel, H. G., Silva, R. L., Malina, A., Mills, J. R., Zhu, H., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Teruya-Feldstein, J., Pelletier, J., & Lowe, S. W. (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes & development*, 21(24), 3232–3237.
11. Xie, J., Merrett, J. E., Jensen, K. B., & Proud, C. G. (2019). The MAP kinase-interacting kinases (MNKs) as targets in oncology. *Expert opinion on therapeutic targets*, 23(3), 187–199.
12. Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S., & Fukunaga, R. (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and cellular biology*, 24(15), 6539–6549.
13. Ueda, T., Sasaki, M., Elia, A. J., Chio, I. I., Hamada, K., Fukunaga, R., & Mak, T. W. (2010). Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 13984–13990.
14. Jin, X., Yu, R., Wang, X., Proud, C. G., & Jiang, T. (2021). Progress in developing MNK inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 219, 113420.
15. Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(7), 537–550.
16. Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822.
17. Pereira, R. L., Nascimento, I. C., Santos, A. P., Ogusuku, I. E. Y., Lameu, C., Mayer, G., & Ulrich, H. (2018). Aptamers: novelty tools for cancer biology. *Oncotarget*, 9(42), 26934–26953.
18. Fu, Z., & Xiang, J. (2020). Aptamers, the Nucleic Acid Antibodies, in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2793.
19. Carrión-Marchante, R., Pinto-Díez, C., Klett-Mingo, J. I., Palacios, E., Barragán-Usero, M., Pérez-Morgado, M. I., Pascual-Mellado, M., Alcalá, S., Ruiz-Cañas, L., Sainz, B., Jr, González, V. M., & Martín, M. E. (2023). An Aptamer against MNK1 for Non-Small Cell Lung Cancer Treatment. *Pharmaceutics*, 15(4), 1273.
20. Pinto-Díez, C., Ferreras-Martín, R., Carrión-Marchante, R., Klett-Mingo, J. I., García-Hernández, M., Pérez-Morgado, M. I., Sacristán, S., Barragán, M., Seijo-Vila, M., Tundidor, I., Blasco-Benito, S., Pérez-Gómez, E., Gómez-Pinto, I., Sánchez, C., González, C., González, V. M., & Martín, M. E. (2022). An optimized MNK1b aptamer, apMNKQ2, and its potential use as a therapeutic agent in breast cancer. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 30, 553–568.
21. Hitosugi, T., Zhou, L., Fan, J., Elf, S., Zhang, L., Xie, J., Wang, Y., Gu, T. L., Alečković, M., LeRoy, G., Kang, Y., Kang, H. B., Seo, J. H., Shan, C., Jin, P., Gong, W., Lonial, S., Arellano, M. L., Khoury, H. J., Chen, G. Z., ... Chen, J. (2013). Tyr26 phosphorylation of PGAM1 provides a metabolic advantage to tumours by stabilizing the active conformation. *Nature communications*, 4, 1790.
22. Wang, Y., Shu, H., Qu, Y., Jin, X., Liu, J., Peng, W., Wang, L., Hao, M., Xia, M., Zhao, Z., Dong, K., Di, Y., Tian, M., Hao, F., Xia, C., Zhang, W., Ba, X., Feng, Y., & Wei, M. (2024). PKM2 functions as a histidine kinase to phosphorylate PGAM1 and increase glycolysis shunts in cancer. *The EMBO journal*, 43(12), 2368–2396.
23. Hallows, W. C., Yu, W., & Denu, J. M. (2012). Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation. *The Journal of biological chemistry*, 287(6), 3850–3858.
24. Ferreras Martín, R. (2024). Mecanismo de acción de un aptámero frente a MNK1 en cáncer de mama.
25. Yamamoto, Y., & Gerbi, S. A. (2018). Making ends meet: targeted integration of DNA fragments by genome editing. *Chromosoma*, 127(4), 405–420.
26. Smith K. (2001). Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reproduction, nutrition, development*, 41(6), 465–485.
27. Würtele, H., Little, K. C., & Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene therapy*, 10(21), 1791–1799.
28. Festenstein, R., Sharghi-Namini, S., Fox, M., Roderick, K., Tolaini, M., Norton, T., Saveliev, A., Kioussis, D., & Singh, P. (1999). Heterochromatin protein 1 modifies mammalian PEV in a dose- and chromosomal-context-dependent manner. *Nature genetics*, 23(4), 457–461.
29. Williams, A., Harker, N., Ktistaki, E., Veiga-Fernandes, H., Roderick, K., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., & Kioussis, D. (2008). Position effect variegation and imprinting of transgenes in lymphocytes. *Nucleic acids research*, 36(7), 2320–2329.
30. Robertson, G., Garrick, D., Wu, W., Kearns, M., Martin, D., & Whitelaw, E. (1995). Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5371–5375.
31. Spencer, S., Gugliotta, A., Koenitzer, J., Hauser, H., & Wirth, D. (2015). Stability of single copy transgene expression in CHO1 cells is affected by histone modifications but not by DNA methylation. *Journal of biotechnology*, 195, 15–29.
32. Yang, L. L., Zhang, M., Guo, J. L., Han, M. M., Qiu, L. L., Gao, L. J., Cui, L. S., Wang, X. Y., Wang, T. Y., & Jia, Y. L. (2025). Epigenetic regulation of histone methyltransferase SUV39H1 on the expression of recombinant protein in CHO cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 109(1), 118.

33. Stadermann, A., Gamer, M., Fieder, J., Lindner, B., Fehrmann, S., Schmidt, M., Schulz, P., & Gorr, I. H. (2022). Structural analysis of random transgene integration in CHO manufacturing cell lines by targeted sequencing. *Biotechnology and bioengineering*, 119(3), 868–880.
34. Aebischer-Gumy, C., Moretti, P., Little, T. A., & Bertschinger, M. (2018). Analytical assessment of clonal derivation of eukaryotic/CHO cell populations. *Journal of biotechnology*, 286, 17–26.
35. Langsdorf, E., Yu, L., Kanevskaia, L., Felkner, R., Sturner, S., McVey, D., & Khetan, A. (2021). Retrospective assessment of clonal origin of cell lines. *Biotechnology progress*, 37(4), e3157.
36. Hacker, D. L., & Balasubramanian, S. (2016). Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. *Current opinion in structural biology*, 38, 129–136.
37. Wu, S., Guo, F., Li, M., Chen, W., & Jin, L. (2024). Overexpression of SLAP2 inhibits triple-negative breast cancer progression by promoting macrophage M1-type polarization. *Scientific reports*, 14(1), 26035.
38. Tonetti, D. A., Rubenstein, R., DeLeon, M., Zhao, H., Pappas, S. G., Bentrem, D. J., Chen, B., Constantinou, A., & Craig Jordan, V. (2003). Stable transfection of an estrogen receptor beta cDNA isoform into MDA-MB-231 breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 87(1), 47–55.
39. Salehi S, Kabeer F, Ceglia N, Andronescu M, Williams MJ, Campbell KR, Masud T, Wang B, Biele J, Brimhall J, Gee D, Lee H, Ting J, Zhang AW, Tran H, O'Flanagan C, Dorri F, Rusk N, de Algara TR, Lee SR, Cheng BYC, Eirew P, Kono T, Pham J, Grewal D, Lai D, Moore R, Mungall AJ, Marra MA; IMAXT Consortium; McPherson A, Bouchard-Côté A, Aparicio S, Shah SP. Clonal fitness inferred from time-series modelling of single-cell cancer genomes. *Nature*. 2021 Jul;595(7868):585-590. doi: 10.1038/s41586-021-03648-3. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34163070; PMCID: PMC8396073.
40. Vasudevan S, Adejumbi IA, Alkhatib H, Roy Chowdhury S, Stefansky S, Rubinstein AM, Kravchenko-Balasha N. Drug-Induced Resistance and Phenotypic Switch in Triple-Negative Breast Cancer Can Be Controlled via Resolution and Targeting of Individualized Signaling Signatures. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 6;13(19):5009. doi: 10.3390/cancers13195009. PMID: 34638492; PMCID: PMC8507629.
41. Kabeer F, Tran H, Andronescu M, Singh G, Lee H, Salehi S, Wang B, Biele J, Brimhall J, Gee D, Cerda V, O'Flanagan C, Algara T, Kono T, Beatty S, Zaikova E, Lai D, Lee E, Moore R, Mungall AJ; IMAXT Consortium; Williams MJ, Roth A, Campbell KR, Shah SP, Aparicio S. Single-cell decoding of drug induced transcriptomic reprogramming in triple negative breast cancers. *Genome Biol*. 2024 Jul 18;25(1):191. doi: 10.1186/s13059-024-03318-3. PMID: 39026273; PMCID: PMC11256464.
42. Lee, J. S., Kildegard, H. F., Lewis, N. E., & Lee, G. M. (2019). Mitigating Clonal Variation in Recombinant Mammalian Cell Lines. *Trends in biotechnology*, 37(9), 931–942.
43. Li M, Yan T, Wang M, Cai Y, Wei Y. Advances in Single-Cell Sequencing Technology and Its Applications in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2022 Dec 14;14:465-474. doi: 10.2147/BCTT.S388534. PMID: 36540278; PMCID: PMC9760048.
44. Bernhard, P., Feilen, T., Rogg, M., Fröhlich, K., Cosenza-Contreras, M., Hause, F., Schell, C., & Schilling, O. (2022). Proteome alterations during clonal isolation of established human pancreatic cancer cell lines. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS, 79(11), 561. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04584-9>
45. Funnell T, O'Flanagan CH, Williams MJ, McPherson A, McKinney S, Kabeer F, Lee H, Salehi S, Vázquez-García I, Shi H, Leventhal E, Masud T, Eirew P, Yap D, Zhang AW, Lim JLP, Wang B, Brimhall J, Biele J, Ting J, Au V, Van Vliet M, Liu YF, Beatty S, Lai D, Pham J, Grewal D, Abrams D, Havasov E, Leung S, Bojilova V, Moore RA, Rusk N, Uhlitz F, Ceglia N, Weiner AC, Zaikova E, Douglas JM, Zamarin D, Weigelt B, Kim SH, Da Cruz Paula A, Reis-Filho JS, Martin SD, Li Y, Xu H, de Algara TR, Lee SR, Llanos VC, Huntsman DG, McAlpine JN; IMAXT Consortium; Shah SP, Aparicio S. Single-cell genomic variation induced by mutational processes in cancer. *Nature*. 2022 Dec;612(7938):106-115. doi: 10.1038/s41586-022-05249-0. Epub 2022 Oct 26. PMID: 36289342; PMCID: PMC9712114.
46. Schilling, B., Meyer, J. G., Wei, L., Ott, M., & Verdin, E. (2019). High-Resolution Mass Spectrometry to Identify and Quantify Acetylation Protein Targets. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1983, 3–16.
47. Chen, J., & Chen, L. F. (2015). Methods to detect NF-κB acetylation and methylation. *Methods in molecularbiology* (Clifton, N.J.), 1280, 395–409.