

Estudio de la estabilidad de aptámeros generados frente a la proteína 4E-BP1.

Rebeca Carrión Marchante^{1, a}, Ana García Sacristán², Celia Pinto Díez², María Elena Martín², Víctor M. González²

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. 2. Departamento de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS, 28034, Madrid, España.

a. rebecacm93@gmail.com

Palabras clave: aptámero; cáncer; estabilidad; SELEX; terapia; 4E-BP1

Resumen

El control de la síntesis de proteínas juega un papel importante en el crecimiento y proliferación celular. En la mayoría de los organismos eucariotas se lleva a cabo una traducción dependiente de cap en la cual el factor eucariótico de iniciación (eIF) 4E juega un papel muy importante. La actividad de este factor está regulada por la proteína 4E-BP1 (proteína de unión a eIF4E), entre otras, cuya fosforilación permite la liberación del factor y su participación en la traducción. La sobreexpresión del factor eIF4E produce irregularidades en el ciclo celular relacionadas con el cáncer, enfermedad que produce 8.2 millones de muertes anuales en el mundo. La actividad reguladora de la proteína 4E-BP1 la convierte en una posible diana terapéutica, por lo que en el laboratorio se seleccionaron tres aptámeros frente a dicha proteína a través del método SELEX. Los aptámeros se conocen como 1R, 1F y 20F y poseen estructuras secundarias complejas y con posibilidad de formación de G-cuádruplex, lo que les confiere una alta estabilidad. Por ello en el presente trabajo se ha ampliado la caracterización estructural y funcional de estos aptámeros mediante parámetros como susceptibilidad a nucleasas, IC50, niveles intracelulares, efecto sobre la síntesis de proteínas y constante de disociación. Los resultados posicionan a los aptámeros 1R y 20F como los más estables y los principales candidatos como potenciales herramientas terapéuticas. Sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos funcionales así como estudiar la especificidad de los aptámeros frente a otras proteínas y otros aspectos importantes para su aplicación clínica.

Cita: Carrión Marchante, Rebeca; García Sacristán, Ana; Pinto Díez, Celia; Martín, María Elena; González, Víctor M. (2016) Estudio de la estabilidad de aptámeros generados frente a la proteína 4E-BP1. *Dianas* 5 (2): e20160909. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20160909](http://www3.uah.es/dianas?e20160909) <http://www3.uah.es/dianas?e20160909>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Carrión-Marchante R, García-Sacristán A, Pinto-Díez C, Martín ME, 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 papel de 4E-BP1 en la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas, también conocida como traducción, es uno de los procesos más importantes en el ciclo vital de las células ya que mantiene su crecimiento y proliferación. En la mayoría de los organismos eucariotas, se lleva a cabo una traducción dependiente de cap, en la cual se considera al factor de iniciación eucariótico (eIF) 4E un factor limitante en el proceso debido a que recluta el ribosoma facilitando el inicio de la síntesis proteica [1]. Su disponibilidad depende directamente de las proteínas de unión a eIF4E (4E-BPs), entre las que destaca 4E-BP1 por su papel crítico en el control de síntesis de proteínas, supervivencia y proliferación celular. Si 4E-BP1 se encuentra hipofosforilada interactúa fuertemente con eIF4E, mientras que su hiperfosforilación disminuye drásticamente la unión a dicho factor, aumentando la tasa de traducción [2]. La principal vía de fosforilación de la proteína 4E-BP1 es la ruta PI3K/Akt/mTOR [3], en la que factores de crecimiento desencadenan una cascada de señalización que acaba activando al complejo mTOR, serina-treonina-quinasa que fosforila a 4E-BP1, produciéndose la liberación del factor eIF4E.

La fosforilación de 4E-BP1 es un proceso relevante ya que de ella depende el crecimiento celular. Se ha visto que el incremento del factor eIF4E o la hiperfosforilación de 4E-BP1 a través de mTOR están relacionados con procesos tumorales y progresión cancerígena [3, 4] debido a un aumento en la producción de proteínas. Es más, se ha descrito en diferentes tipos de tumores [5] que la activación de la ruta PI3K/Akt/mTOR es una característica frecuente que implica un aumento en la cantidad de 4E-BP1 fosforilado (p-4E-BP1). Se ha visto que la expresión de este factor es mayor en aquellas zonas que acaban desarrollando un cáncer que en las que no y que, además, está asociado con un peor pronóstico y grado de malignidad del tumor [6-8]. Esto indica que 4E-BP1 se puede considerar como una buena diana

terapéutica en procesos cancerígenos. De acuerdo con esto parece de especial importancia el desarrollo de agentes terapéuticos que tengan como diana factores de iniciación traduccional. Por este motivo se seleccionaron moléculas que reconocen específicamente la proteína 4E-BP1, para su futura aplicación en terapia tumoral. Estas moléculas, descritas a continuación, se denominan aptámeros.

Aptámeros

Los aptámeros son ácidos ribonucleicos (ARN) o desoxirribonucleicos (ADN) sintéticos, de cadena sencilla [9, 10] que, gracias a su habilidad para formar estructuras secundarias y terciarias son capaces de unirse de forma específica a un amplio rango de dianas. Se seleccionan a través de un proceso denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), en el cual se parte de una extensa librería de oligonucleótidos de secuencia aleatoria que será enfrentada a una diana determinada. Las secuencias no unidas se eliminarán, mientras que aquellas que sean capaces de reconocer dicha diana, se amplificarán, completando una ronda de selección. Gracias a estos sucesivos ciclos, la librería inicial es reducida a unas pocas secuencias específicas para su diana [11].

En el presente trabajo se han utilizado tres aptámeros generados en el laboratorio frente a la proteína 4E-BP1. Los tres provienen de una extensa librería de oligonucleótidos de ADN cuya región central consta de 40 nucleótidos de secuencia aleatoria flanqueados por dos regiones de 18 nucleótidos de secuencia conocida. Tras 9 rondas de selección, la población final se clonó y se secuenció. Las secuencias repetidas con más frecuencia, fueron analizadas para estudiar su afinidad individual por la diana y, de aquellas más afines, se analizaron sus estructuras secundarias predictivas y posibles G-cuádruplex, zonas ricas en guaninas (G) que confieren gran estabilidad a la molécula [12]. A la vista de los resultados, se eligieron los aptámeros denominados 1R, 1F y 20F, los cuales presentan un porcentaje de GC superior al 50%. Como se observa en la Figura 1, las tres secuencias muestran estructuras secundarias complejas como tallos y bucles. De acuerdo con la energía libre de Gibbs (ΔG), 1R adoptaría la estructura más estable de los tres, seguido de 20F, y por último y menos estable, 1F. Además se vio que 1R podría formar dos estructuras G-cuádruplex, una con tres planos y otra con dos, 20F formaría una con dos planos y 1F no formaría dicha estructura [13].

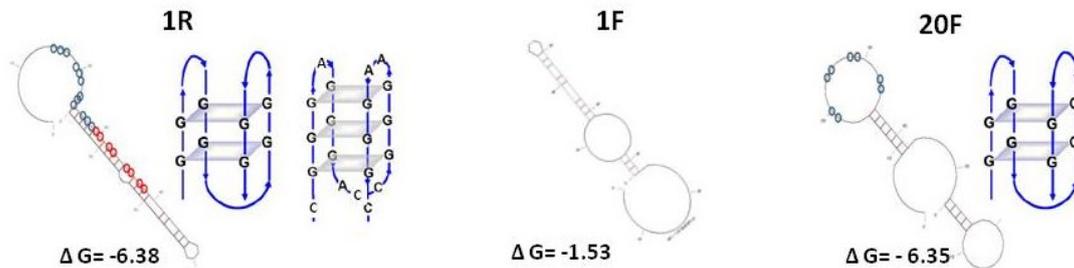


Figura 1.- Predicción de la estructura secundaria de los aptámeros y posibles estructuras G cuádruplex. Las secuencias de los aptámeros fueron analizadas mediante el programa mFold. Los círculos rojos y azules en 1R y 20F indican la posición de las G que muestran una alta probabilidad de participar en la formación de G-cuádruplex, basado en el algoritmo usado por el programa QGRS mapper. A la derecha, una aproximación de estas estructuras que formarían.

Los resultados identificaron a los tres oligonucleótidos como los más prometedores, ya que, mostraban las energías libres más bajas, a la vez que la posibilidad de formación de G-cuádruplex. Así se ha visto conveniente continuar su caracterización, por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar parámetros relacionados con la estabilidad de los aptámeros como la toxicidad, niveles intracelulares, susceptibilidad a nucleasas, etc. El estudio de la estabilidad de los aptámeros ofrece datos importantes que permitirán clasificar a estas moléculas como las candidatas adecuadas en futuras nuevas terapias anticancerígenas.

Materiales y Métodos

Ensayo de estabilidad de aptámeros

Se incubaron 300 ng de cada aptámero (previamente estructurados durante 10 minutos a 95°C y 10 minutos a 4°C en tampón I (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1mM, KCl 5mM)) con 0.05 U de la endonucleasa DNasa I (Thermo Scientific) durante 30 minutos. Durante este tiempo se recogieron alícuotas a los 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos, incubándolas a 65°C durante 10 minutos para parar la reacción de degradación. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Conda) al 2.5% en tampón TAE 1x (Tris-HCl 40 mM, pH 7.4; ácido acético 0.112% y etilendiaminotetracético (EDTA) 1mM) y Gel Red (Biotium) 1x. Las muestras se prepararon en tampón de carga (azul de bromofenol y glicerol al 30%) y el marcador de peso molecular empleado fue pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) (Thermo Scientific). La electroforesis se resolvió en tampón TAE 1x durante 30-45 minutos a 120 V.

Cultivos celulares

La línea celular epitelial SW480, derivada de adenocarcinoma colorectal humano (ATCC® CCL-228™), se mantuvo en cultivos monocapa en frascos de 75 cm² con medio DMEM: Ham's F12 (PAA) 1:0.8, 1% de piruvato, 1% de glutamina (Invitrogen), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina y 10% de suero bovino fetal en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂. Las células se levantaron con tripsina 1x (Gibco) y fueron lavadas con PBS (tampón fosfato salino) (PAA). Para la prevención de la contaminación por micoplasma se añadió Plasmocin 1:5000 (Invitrogen) al medio de cultivo durante el mantenimiento de las células.

Transfección de células

Las células se sembraron en diferentes placas a una densidad apropiada en función del ensayo, 10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos (p96) y 5x10⁴ en placas de 24 pocillos (p24). A las 24 horas fueron transfectadas con los aptámeros estructurados en tampón I a distintas concentraciones (según el ensayo correspondiente), mediante Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, y acondicionando los reactivos a cada densidad celular, tipo de placa y ensayo realizado. Las células se lavaron dos veces con medio sin antibiótico y posteriormente se añadieron los complejos lipofectamina-ADN en medio Opti-MEM I (Gibco). Las células transfectadas se incubaron a 37°C el tiempo necesario hasta la realización del ensayo correspondiente.

Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT)

Las células se sembraron en placas p96 y 48 horas después de la transfección se retiró el medio y se añadieron 100 µl /pocillo de sales de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml en medio de cultivo, incubando durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de lisis (10% de dodecil sulfato sódico (SDS) y 10 mM de HCl). Tras 16-24 horas a 37°C se determinó por espectrofotometría la reducción de MTT a 540 nm en el SPECTRA FLUOR. Los resultados son expresados como porcentaje de viabilidad con respecto al control.

Estudio de los niveles intracelulares de los aptámeros en células transfectadas

Se llevó a cabo a las 24 y 48 horas post-transfección. Las células fueron lavadas con PBS, levantadas y lisadas en 30 µl de agua durante 5 minutos. Posteriormente, los lisados se incubaron durante 10 minutos a 90°C y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se realizó PCR a tiempo real (qPCR) empleando *Quantimix Easy Kit* (Biotools) siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo iQ5. El sedimento fue resuspendido en 10 µl de NaOH 0.1M y cuantificado mediante el ensayo BCA (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante. Para la realización de la qPCR se emplearon los cebadores de los aptámeros denominados F3 (5'-GCG GAT GAA GAC TGG TGT-3') y R3 (5'-GTT GCT CGT ATT TAG GGC-3') a 0.125 µM, 1 µl de molde, tampón Quantimix Easy Mater Mix 1x y agua hasta completar un volumen final de 20 µl/tubo. El programa de PCR usado fue: 5 minutos a 95°C en 1 ciclo y, 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C durante 40 ciclos. Posteriormente y durante 81 ciclos, se pasó de una temperatura inicial de 55°C hasta una temperatura final de 95°C cada 30 segundos. Para cuantificar las cantidades intracelulares de aptámero, se hizo una recta patrón con cantidades conocidas de cada aptámero entre 100 fmol y 10 amol. Los valores de aptámero intracelular fueron corregidos por la cantidad de proteína/pocillo, y son expresados en fmoles de aptámero por µg de proteína.

Los aptámeros recogidos en los lisados celulares se amplificaron también mediante PCR semicuantitativa, con los cebadores a 0.4 µM cada uno, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a 0.2 µM, MgCl₂ 3 mM y 1U de Taq Polimerasa (Biotools) en tampón de PCR 1x en un volumen final de 20µl. El programa de PCR empleado fue el mismo de la qPCR durante 15 ciclos. La amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El gel fue cuantificado mediante el programa Image Quant™. Los resultados fueron corregidos por la cantidad de proteína/pocillo y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.) por µg de proteína.

Cuantificación de síntesis de proteínas con ensayo SUnSET®

Las células transfectadas en placas p24 fueron tratadas con puromicina a las 24 horas [14]. Como control se añadió cicloheximida 25 µM en medio de cultivo a células sin transfectar y se incubó 5 minutos a 37°C. Tras esto, se retiró el medio del resto de pocillos y se añadió puromicina 2 µM en medio de cultivo incubando 30 minutos a 37°C. Posteriormente se cambió el medio y se incubó 1 hora a 37°C. A continuación se levantaron las células añadiendo a cada pocillo 500 µl de tampón de lisis celular (TLC) (Tris-HCl 20 mM, pH 7.6; ditiotreitól (DTT) 1mM; EDTA 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM; pepstatina A 1µg/ml; antipaina 10 µg/ml; leupeptina 1 mg/ml; molibdato sódico 10 mM, β-glicerofosfato 10 mM; ortovanadato sódico 1 mM; KCl 120 mM y benzamidina 1 mM) y centrifugando a 400 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de células fue lisado con TLC/Tritón 1% en una proporción

1:2 y centrifugado 10 minutos a 12000 g y 4°C. La proteína presente en el sobrenadante se valoró mediante el ensayo BCA (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se llevó a cabo mediante el empleo de un sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas de BIORAD (Miniprotean II Cell) utilizando geles de poliacrilamida del 12% en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE). Como agentes polimerizantes se utilizaron N-N'-N''-tetrametilendiamina (TEMED) al 0.86% y persulfato amónico a una concentración final de 0.45 µg/µl. La electroforesis se realizó en presencia de SDS al 10%, en un tampón de electroforesis (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; Glicina 192 mM y SDS al 10%). Como marcador de peso molecular se usó PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Las muestras se prepararon en tampón de carga (Tris-HCl 180 mM, pH 6.8; 9% de SDS; 6% de β-mercaptoetanol; 15% de glicerol y 0.025% de azul de bromofenol) en un volumen final de 30 µl y se resolvieron a 200 V durante 45 minutos-1 hora.

Transferencia de proteínas e inmunodetección (Western blot)

Las proteínas resueltas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema continuo y húmedo en solución de transferencia TrisGlicina/Metanol (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM y metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora. Las membranas fueron bloqueadas 1 hora en PBS-Blotto (o leche en polvo desnatada) al 5% a temperatura ambiente antes de incubarlas con el anticuerpo primario. Los anticuerpos se diluyeron en PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 1% o en PBS-Blotto al 1%. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4°C, y los secundarios, 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo de dos maneras diferentes en función del anticuerpo empleado: para los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se empleó un sistema de quimioluminiscencia con Clarity™ Western ECL Substrate (BIO RAD), mientras que para los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina se emplearon reactivos para ensayos colorimétricos. Entre anticuerpos y revelado se realizaron lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0.05%. La cuantificación de bandas se realizó en un analizador de imágenes equipado con el programa Image Quant™. Los datos fueron obtenidos en unidades de densidad óptica/mm².

Ensayo enzimático en placa con aptámeros (ELONA).

Se emplearon placas de 96 pocillos *Maxisorp Nunc* (Thermo Scientific) en las cuales se añadió 50 ng de la proteína 4E-BP1 y 250 ng/pocillo de BSA diluidos en solución coating (KPL) en un volumen final de 100 µl/pocillo. La placa se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se realizaron 4 lavados de 200 µl/pocillo de tampón I con BSA 0.2% y Tween 0.1%. Se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón I con BSA al 5%. Posteriormente se añadieron cantidades crecientes de aptámero previamente estructurado y marcado con biotina, en un volumen final de 100 µl de tampón I y se incubaron durante 1 hora a 37°C. El exceso de aptámero no unido se retiró mediante 4 lavados iguales a los anteriores. Para detectar la unión del aptámero a la proteína se añadieron 100 µl/pocillo de estreptavidina conjugada con peroxidasa diluida 1:1000 en tampón I con BSA 0.2%, incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron 4 lavados y se añadieron 100 µl/pocillo de solución ABTS (Roche) para su revelado. Se incubó a temperatura ambiente y oscuridad realizando medidas a una longitud de onda de 405 nm cada 10 minutos durante 1 hora en el SPECTRAFLUOR.

Resultados

Sensibilidad de los aptámeros a nucleasas

La alta susceptibilidad de los aptámeros a ser degradados por nucleasas limita su aplicación en clínica. Con el fin de analizar su estabilidad, los aptámeros seleccionados se incubaron con la endonucleasa DNAsa I a diferentes tiempos. Los resultados muestran que el aptámero 1F es el más sensible a la actividad de la enzima debido a que se degrada más rápidamente que los otros dos, alcanzándose una degradación del 50% a los 5 minutos de incubación. Por otra parte, 1R y 20F son menos susceptibles a ser degradados por la enzima, siendo éste último el más resistente ya que se observa una cantidad superior al 90% del aptámero inicial incluso a los 30 minutos de incubación (Figura 2).

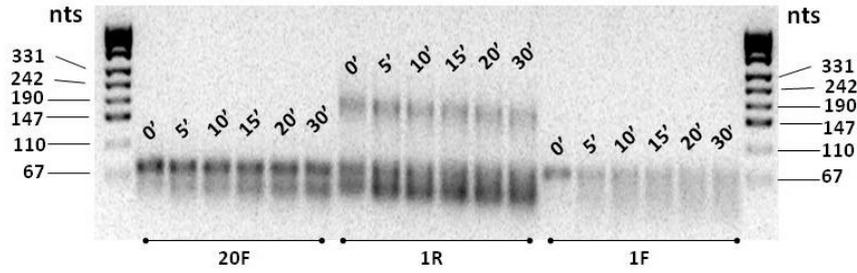


Figura 2.- Gel de agarosa de los aptámeros incubados con DNAsI. Los aptámeros se incubaron con la enzima y se recogieron alícuotas cada 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. nts: nucleótidos.

Efectos de los aptámeros seleccionados en células SW480

Con el objetivo de estudiar el efecto de los aptámeros en la viabilidad de las células, se realizaron ensayos en los que células SW480 fueron transfectadas con los aptámeros 1R, 1F y 20F a las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 nM. La viabilidad celular se midió a las 48 horas mediante la reducción de MTT como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados revelaron que los aptámeros 1R, 1F y 20F inhibían el crecimiento celular con valores de IC₅₀ de 75, 150 y 87 nM respectivamente (Figura 3).

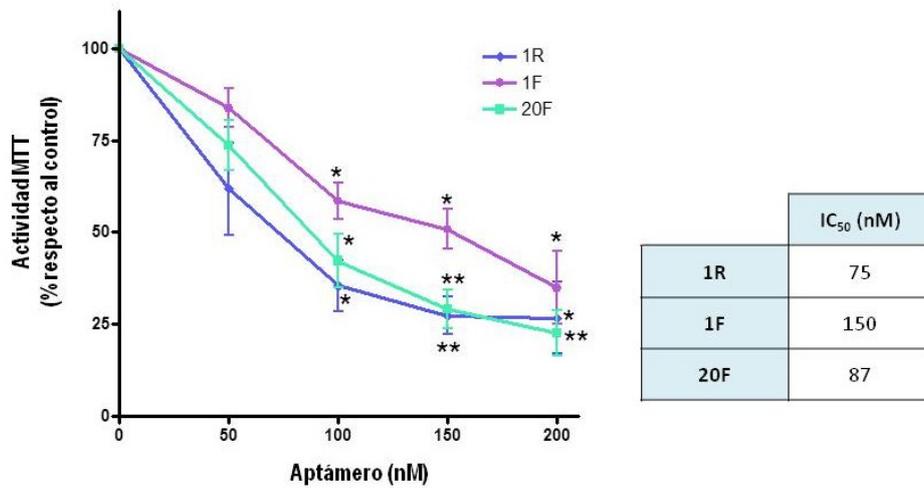


Figura 3.- IC₅₀ de los aptámeros 1R, 1F y 20F. La gráfica representa la media ± SEM de tres experimentos independientes. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control).

Uno de los aspectos más importantes a la hora de poder utilizar los aptámeros para regular la actividad de dianas intracelulares es conocer su vida media en el interior celular, que puede estar afectada tanto por su estructura como por su naturaleza molecular. Con el fin de estudiar la estabilidad intracelular de los aptámeros, se realizaron ensayos en los que células SW480 fueron transfectadas con 1R, 1F y 20F a una concentración de 50 nM, a la que se produce una muerte celular inferior al 50% para todos los aptámeros. Después de 24 y 48 horas, se procesaron las células y se cuantificaron los niveles de aptámero intracelular mediante qPCR y PCR a tiempo final semicuantitativa.

Los resultados de la qPCR (Figura 4) muestran que el aptámero 1R es el más estable en el interior celular ya que es el que muestra mayores concentraciones a ambos tiempos. El aptámero 20F es menos estable que 1R ya que se observa que a ambos tiempos sus niveles son inferiores y, además, se reduce más de un 50% a las 48 horas de transfección. Por último, el aptámero 1F es el menos estable en el interior celular ya que sus niveles intracelulares son casi inexistentes.

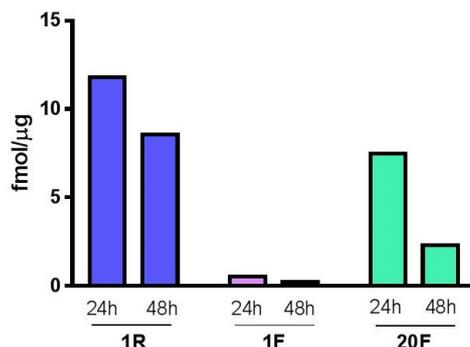


Figura 4.- Estudio de los niveles de los aptámeros en células SW480 mediante qPCR.

Por otra parte, la amplificación por PCR a tiempo final y electroforesis en gel de agarosa muestran los mismos resultados (Figura 5), confirmando que los niveles intracelulares de 1R son los más altos en comparación con el resto de aptámeros, mientras que los niveles de 20F siguen siendo inferiores en comparación con 1R y se aprecia una disminución del 50% al tiempo de 48 horas. Por último, 1F se sigue considerando el menos estable ya que sus niveles son prácticamente inexistentes ya a las 24 horas.

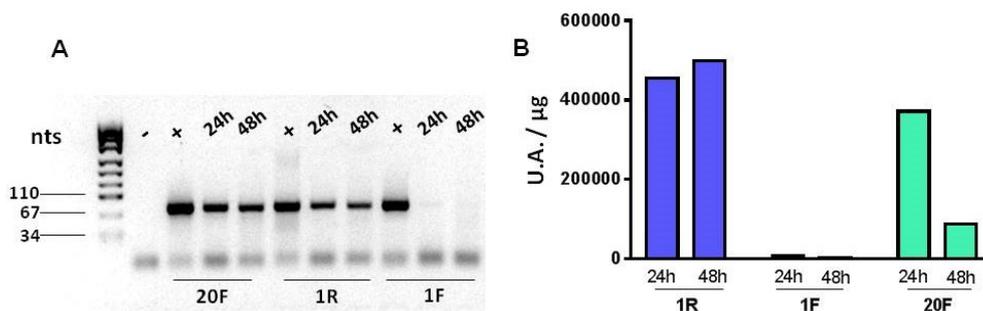


Figura 5.- Estudio de los niveles intracelulares de los aptámeros en las células SW480 mediante PCR a tiempo final. (A) Gel de agarosa en el que se muestra la amplificación por PCR de los aptámeros a 24 y 48 horas post-transfección. (B) Cuantificación intracelular de aptámero a partir del gel de agarosa. (U.A.: Unidades Arbitrarias).

A continuación, se estudió el efecto de los aptámeros sobre la síntesis de proteínas. Para ello, las células fueron transfectadas con la concentración de aptámero correspondiente a la IC_{50} determinada en el ensayo de MTT (Figura 3). A las 24 horas, se trataron con puromicina, antibiótico que a la concentración utilizada reprime parcialmente la síntesis de proteínas. Como control de valoración de la síntesis de proteínas, se empleó el antibiótico cicloheximida (CH) en altas concentraciones para producir una inhibición total en la síntesis. Las proteínas truncadas por puromicina quedan marcadas para su posterior detección mediante anticuerpos. Además, debido a las diferencias entre las IC_{50} , se emplearon dos controles de transfección: C, como control de los aptámeros 1R y 20F con IC_{50} similares, y C', como control del aptámero 1F con una IC_{50} superior. La cuantificación de proteínas sintetizadas se realizó mediante ELISA (datos no mostrados) y Western blot, el cual indicó una disminución de la síntesis proteica de células transfectadas con todos los aptámeros, siendo mayor el efecto producido por el aptámero 1R (Figura 6).

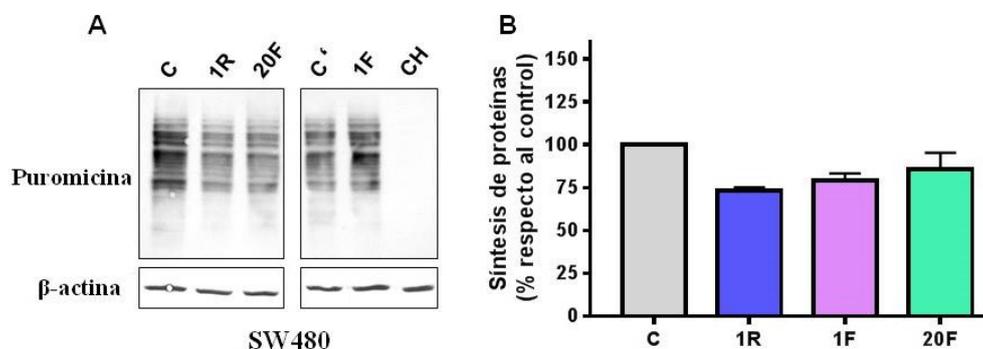


Figura 6.- Efecto de los aptámeros sobre la síntesis de proteínas en células SW480. (A) Western blot de células transfectadas tratadas con puromicina. C: control de transfección de los aptámeros 1R y 20F. C': control de transfección del aptámero 1F. CH: cicloheximida. (B) Cuantificación de la síntesis total de proteínas normalizada frente a β -actina en las células SW480. Las barras representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Caracterización de la afinidad del aptámero 20F

Los aptámeros 1R, 1F y 20F, fueron seleccionados frente a la proteína 4E-BP1 en el laboratorio, previamente a la realización de este estudio, mediante el método SELEX. Después de diferentes ensayos, el aptámero 20F se posiciona como el más afín por la proteína 4E-BP1 por lo que se selecciona para caracterizar su constante de disociación (Kd) por la proteína diana mediante el ensayo ELONA.

Los datos obtenidos, fueron analizados usando una regresión no lineal, mostrando que responden a una curva hipérbola cuya ecuación es $y = (X \times B_{\text{máx}})/(X + K_d)$, donde $B_{\text{máx}}$ es la unión máxima y K_d es la concentración de aptámero requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima. El aptámero 20F es capaz de detectar la proteína 4E-BP1 de forma dependiente de la concentración, con una K_d de 254 ± 44.02 nM (Figura 7).

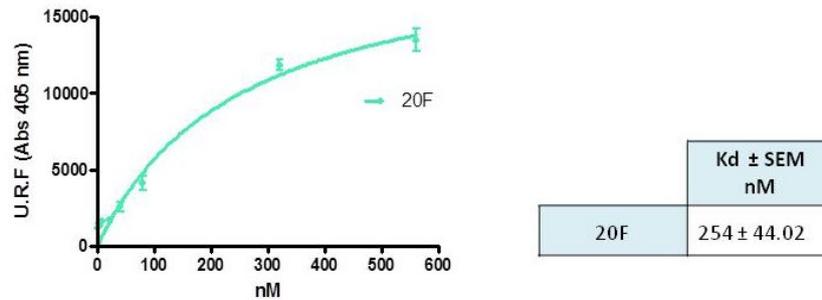


Figura 7.- Caracterización de la interacción del aptámero 20F con 4E-BP1 mediante ELONA. El aptámero unido a biotina a 8, 20, 40, 80, 320 y 560 nM se incubó con 4E-BP1 previamente dispuesta en placa a 50 ng/pocillo. En el cuadro se representa la media \pm SEM para la Kd del aptámero 20F de 3 experimentos independientes. U.R.F. (Unidades Relativas de Fluorescencia). Abs (absorbancia).

Discusión

Los aptámeros, gracias a su capacidad para formar estructuras terciarias definidas, son capaces de reconocer determinadas dianas de forma específica, demostrando un enorme potencial como herramientas biotecnológicas y biomédicas. Así, se han desarrollado aptámeros con el objetivo de diagnosticar o tratar distintas patologías [15]. El cáncer es una enfermedad que produce 8.2 millones de muertes al año en todo el mundo [16]. A rasgos generales, se caracteriza por una proliferación descontrolada y una capacidad invasiva por parte de las células cancerígenas [17]. Este aumento en la proliferación celular se sostiene, entre otras causas, debido a una síntesis elevada de proteínas, originada por la expresión aberrante de factores implicados en el proceso de traducción. Por todo esto, y dada la implicación de 4E-BP1 en procesos tumorales, se seleccionaron aptámeros que reconocen dicha proteína con fines terapéuticos.

El proceso de selección de aptámeros constó de 9 rondas e identificó a los aptámeros 1R, 1F y 20F como los más prometedores en futuros estudios, debido a la estabilidad que muestran sus estructuras secundarias, así como la posible formación de G-cuádruplex.

Continuando en esta línea de trabajo, se probó la susceptibilidad de estos oligonucleótidos a ser degradados por la nucleasa DNAsaI, con el objetivo de corroborar la estabilidad estructural. Los resultados coinciden con los datos que ofrecen las estructuras secundarias predichas, ya que muestran el aptámero 1F como el más susceptible a degradación, lo que indica que su estructura es la menos estable, coincidiendo con la ausencia de estructuras G-cuádruplex y energía libre más alta de los tres. Los aptámeros 1R y 20F se posicionan como los más estables estructuralmente, confirmando los resultados mostrados por los programas predictivos de estructura, siendo éste último aptámero el más resistente de los tres, por lo que, a primera vista, es el mejor candidato.

Como se puede observar en la Figura 2, los aptámeros tienen un tamaño de 76 nucleótidos. Es interesante señalar que a medida que aumenta el tiempo de incubación con la DNAsa I desaparece la banda de este tamaño en el caso de los aptámeros 1R y 20F, los cuales poseen estructuras G-cuádruplex, observándose la aparición de una banda de menor tamaño. Estos resultados sugieren que las estructuras G cuádruplex podrían ser más resistentes a la acción de la DNAsa I, formándose estructuras más pequeñas y estables. Además, en el caso del aptámero 1R se observan unas bandas superiores a 76 nucleótidos, lo que puede explicarse por la formación de dímeros. Además dichos dímeros se comportarían igual que la estructura de 76 nucleótidos, degradándose a medida que aumenta el tiempo de incubación con la enzima.

Una vez confirmados los resultados estructurales, se estudió la toxicidad de los aptámeros en la línea celular SW480. Se hizo un ensayo de viabilidad celular a las 48 horas post-transfección para establecer la concentración de aptámero a la que se producía una muerte celular del 50% (IC_{50}). Los resultados mostraron IC_{50} de 75 nM y 87 nM para los aptámeros 1R y 20F respectivamente, y de 150 nM para el aptámero 1F, lo que indica que se necesita más cantidad de este aptámero que de 1R y 20F para producir una muerte celular del 50%, debido probablemente, a su menor estabilidad y/o posible degradación en el interior celular.

Para los ensayos en células, se eligió una línea celular tumoral debido a la implicación de la proteína diana en los procesos tumorigénicos. Dada la importancia de la especificidad en las terapias antitumorales, sería necesario ampliar los ensayos a otras líneas celulares no tumorales con el objetivo de analizar la toxicidad inespecífica de estos aptámeros.

Los estudios de cuantificación intracelular de los aptámeros confirman los resultados anteriores observándose que los niveles de 1R y 20F son superiores a los de 1F, siendo estos prácticamente indetectables a los tiempos estudiados. El hecho de que el 20F disminuya a las 48 horas casi a la mitad respecto a las 24 horas indicaría que es menos estable que el 1R. Por tanto estos resultados demuestran que el aptámero 1R es el más estable en el interior celular. Aunque los niveles de 1F a 24 y 48 horas eran inexistentes, sí se producía muerte celular, lo que sugiere que el aptámero entra en el interior celular y

produce su efecto, pero se degrada muy rápido. Para comprobar esto sería necesario cuantificar sus niveles intracelulares a tiempos más cortos, además de repetir los experimentos más veces para poder obtener resultados estadísticamente significativos.

En cuanto al efecto de los aptámeros en la síntesis total de proteínas, se observa una disminución de la síntesis en células transfectadas con todos los aptámeros, siendo del 25% en aquellas células transfectadas con el aptámero 1R. Aún así, habría que corroborar estos resultados con nuevos ensayos.

Por tanto, los resultados de este trabajo confirman los obtenidos a partir del análisis de estructuras secundarias de los aptámeros: 1R es el aptámero más estable ya que posee la energía libre de Gibbs (ΔG) más baja de los tres, puede formar dos estructuras G-cuádruplex y es el que más tiempo permanece en el interior celular, produciendo además, una muerte celular del 50% a la concentración más baja de los tres. El segundo aptámero más estable es 20F, su ΔG es superior a la de 1R, posee una estructura muy estable con posible formación de una G-cuádruplex y es la estructura menos susceptible a degradación por la DNAsaI. Al ser menos estable, se degrada antes en el interior celular y a las 48 horas de transfección sus niveles descienden más del 50% en comparación a las 24 horas. El aptámero menos estable es 1F, su ΔG es la más alta y no tiene posibilidad de formación de G-cuádruplex, por lo que la ausencia de estas estructuras hace que sea el más susceptible a degradación por endonucleasas y el que antes se degrade en el interior celular, impidiendo así su cuantificación a nivel intracelular.

Por otra parte, datos preliminares del laboratorio mostraron que de los tres aptámeros, 20F era el que muestra mayor afinidad por la proteína 4E-BP1. A la vista de todos estos resultados, se determinó su constante de disociación a través del ensayo ELONA obteniéndose un valor de 254 ± 44 nM. Aunque este valor está en el rango nanomolar, es superior al de otros aptámeros obtenidos en el laboratorio [18]. Esto sugiere que se podría tratar de optimizar el aptámero con objeto de aumentar su afinidad por la diana, probablemente eliminando regiones de secuencia que puedan estar desestabilizando la interacción [19].

El hecho de que los aptámeros formen estructuras G-cuádruplex que confieren una estabilidad importante a la molécula, puede suponer una gran ventaja para el desarrollo de terapias frente a patologías como el cáncer, las cuales exigen tratamientos a largo plazo [20]. Sin embargo, el hecho de que un aptámero no forme G-cuádruplex, como es el caso de 1F, puede ser útil para tratamientos de enfermedades agudas, ya que ejerce el efecto en la célula produciendo su muerte y se degrada en menos de 24 horas. De esta forma, produce menos toxicidad que otra molécula que permanezca más tiempo en las células, como es el caso del aptámero 1R, cuyos niveles permanecen aún a las 48 horas de transfección.

En resumen, en el presente trabajo se amplía la caracterización estructural y funcional de estos aptámeros demostrándose que estas moléculas podrían ser utilizadas como herramientas en futuras terapias antitumorales. Sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos funcionales así como estudiar la especificidad de los aptámeros frente a otras proteínas o las regiones de 4E-BP1 implicadas en la interacción.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todo el equipo de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal su gran ayuda y apoyo durante estos meses de trabajo. Especialmente a los doctores Víctor M. González, M. Elena Martín y Ana García Sacristán, por su gran esfuerzo, paciencia y dedicación. También a Celia, por su constante ayuda en cada momento, por haberme enseñado tanto durante este periodo. Al resto de compañeros de laboratorio, amigos y familia, gracias.

Referencias

1. Hinnebusch, A.G. and Lorsch, J.R. 2012. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10). pii: a011544.
2. Qin, X., Jiang, B. and Zhang, Y. 2016. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, 15(6):781-6.
3. Martineau, Y., Azar, R., Bousquet, C. and Pyronnet, S. 2013. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene*, 32(6):671-7.
4. Musa, J., Orth, M.F., Dallmayer, M., Baldauf, M., Pardo, C., Rotblat, B., Kirchner, T., Leprévier, G. and Grünwald, T.G. 2016. Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis. *Oncogene* Feb 1. doi:10.1038/onc.2015.515. [Epub ahead of print]
5. Armengol, G., Rojo, F., Castellví, J., Iglesias, C., Cuatrecasas, M., Pons, B., Baselga, J. and Ramón y Cajal, S. 2007. 4E-binding protein 1: A key molecular “funnel factor” in human cancer with clinical implications. *Cancer Research*, 67(16):7551-5.

6. Rojo, F., Najera, L., Lirola, J., Jiménez, J., Guzmán, M., Sabadell, M.D., Baselga, J. and Ramón y Cajal, S. 2007. 4E-binding protein 1, a cell signalling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic and prognosis. *Clinical Cancer Research*, 13(1):81-9.
7. Qu, Y., Zhao, Rui., Wang, H., Chang, K., Yang, X., Zhou, X., Dai, Bo., Zhu, Y., Shi, G., Zhang, H. and Ye, D. 2016. Phosphorylated 4EBP1 is associated with tumor progression and poor prognosis in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, 6:23594. doi: 10.1038/srep23594.
8. Roh, M.S., Lee, J.H., Kang, K.W., Nam, H.Y., Jung, S.B., Kim, K., Lee, E.H., Park, M.I., Kim, M.S. and Lee, H.W. 2015. Phosphorylated 4E-binding protein 1 expression is associated with poor prognosis in small-cell lung cancer. *Virchows Arch*, 467(6):667-73.
9. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818-22.
10. Tuerk, C. and Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968):505-10.
11. Maier, K.E. and Levy, M. 2016. From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Molecular Therapy. Methods and Clinical Development*, 5:16014. doi: 10.1038/mtm.2016.14.
12. Gatto, B., Palumbo, M. and Sissi, C. 2009. Nucleic acid aptamers based on the G-quadruplex structure: therapeutic and diagnostic potential. *Current Medicinal Chemistry*, 16(10):1248-65.
13. Carrión, R. 2015. Selección y caracterización de aptámeros frente a la proteína 4E-BP1. Unpublished Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Alcalá.
14. Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M. and Pierre, P. 2009. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature*, 6(4):275-7.
15. Lao, Y., Phua, K.K.L. and Leong, K.W. 2015. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation. *ACS Nano*, 9(3):2235-54.
16. Cáncer, datos y cifras. 2016 (11 june). In World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/11/06/2016>
17. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74.
18. García-Recio, E.M., Pinto-Díez, C., Pérez-Morgado, M.I., García-Hernández, M., Fernández, G., Martín, M.E. and González, V.M. 2016. Characterization of MNK1b DNA aptamers that inhibit proliferation in MDA-MB231 breast cancer cells. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5:e275. doi: 10.1038/mtna.2015.50.
19. Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K. and Ikebukuro, K. 2016. Methods for improving aptamer binding affinity. *Molecules*, 21(4). pii: E421. doi: 10.3390/molecules21040421.
20. Bates, P.J., Laber, D.A., Miller, D.M., Thomas, S.D. and Trent, J.O. 2010. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3):151-64.