

Aptámeros de DNA frente a la proteína quinasa VRK1 bloquean la proliferación celular en células MCF7 de cáncer de mama

Rebeca Carrión-Marchante, Valerio Frezza, Ana Salgado-Figueroa, M. Isabel Pérez-Morgado, M. Elena Martín, Víctor M. González

Familia VRKs (Vaccinia-related kinases)

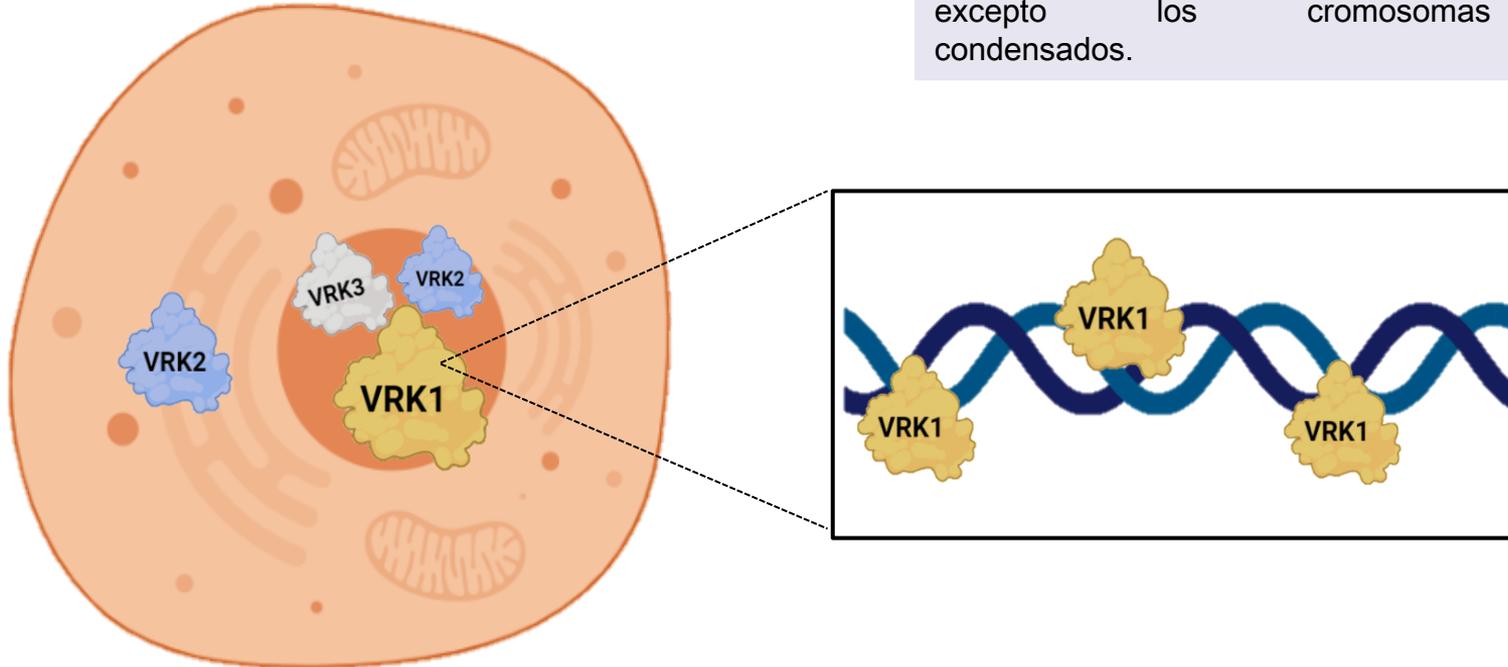
Formada por 3 miembros:

VRK1: mayoritariamente en el núcleo

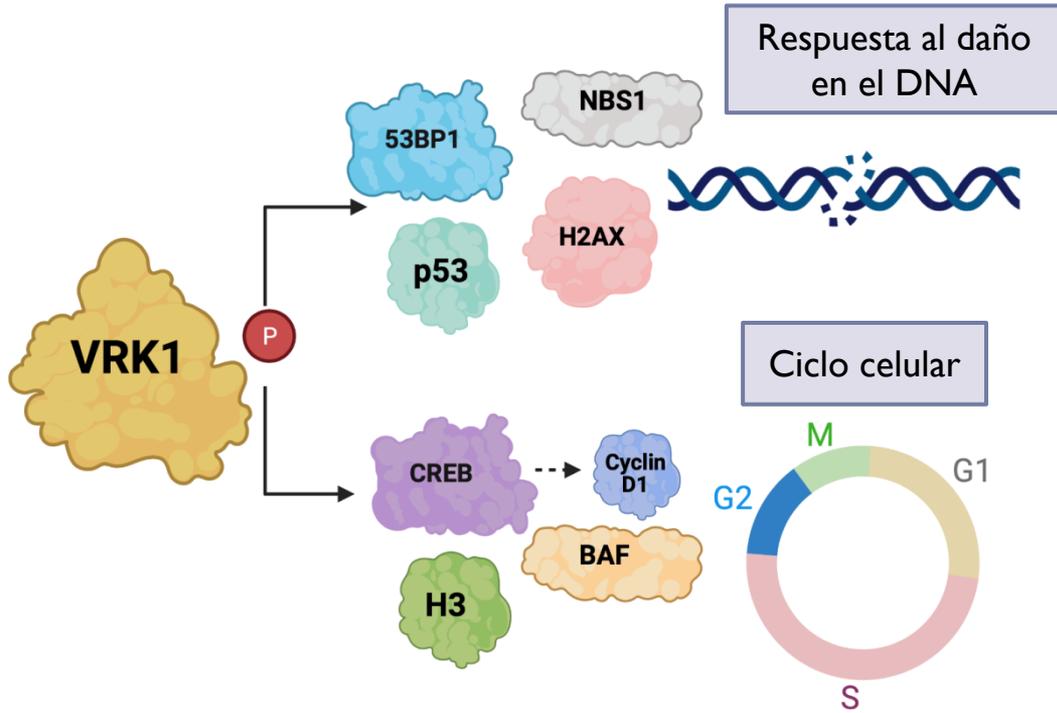
VRK2: localizada en retículo endoplasmático

VRK3: localizada en el núcleo

VRK1 se encuentra localizada en la cromatina, cubriendo todo el DNA, excepto los cromosomas condensados.



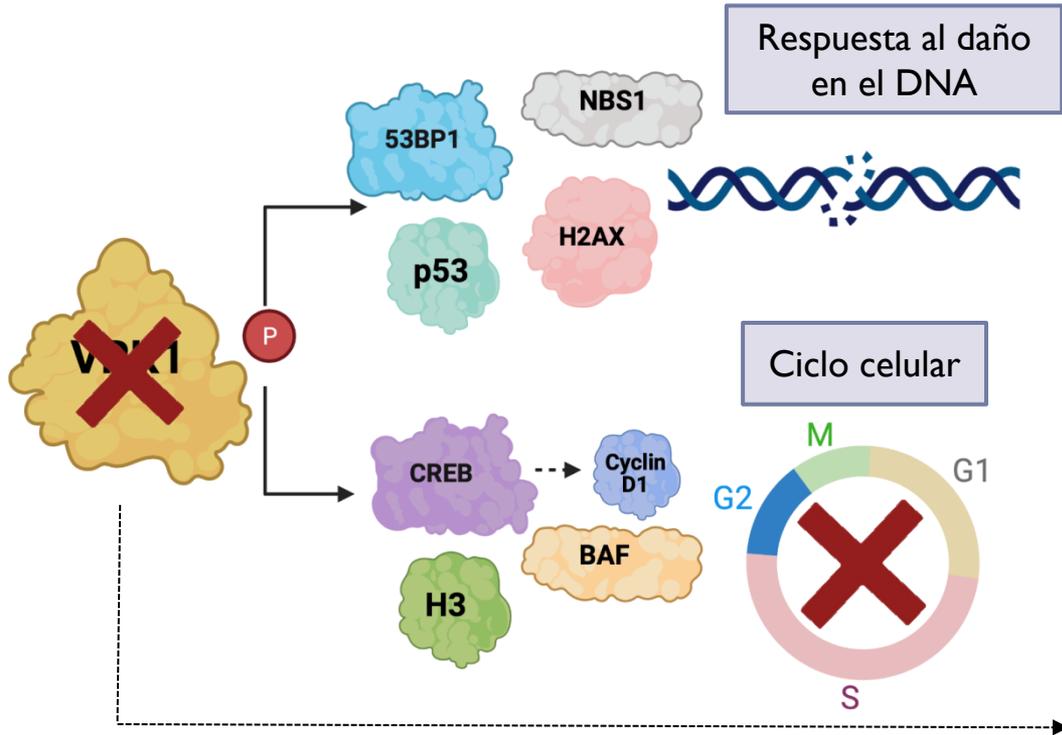
VRK1



VRK1 ejerce un papel importante en las respuestas al daño en el DNA, fosforilando algunas proteínas implicadas en este proceso.

Además, VRK1 interacciona con varias proteínas implicadas en ciclo celular, mediando la expresión de ciclina D1 y, por tanto, la transición de la fase G1 a la fase S.

VRK1

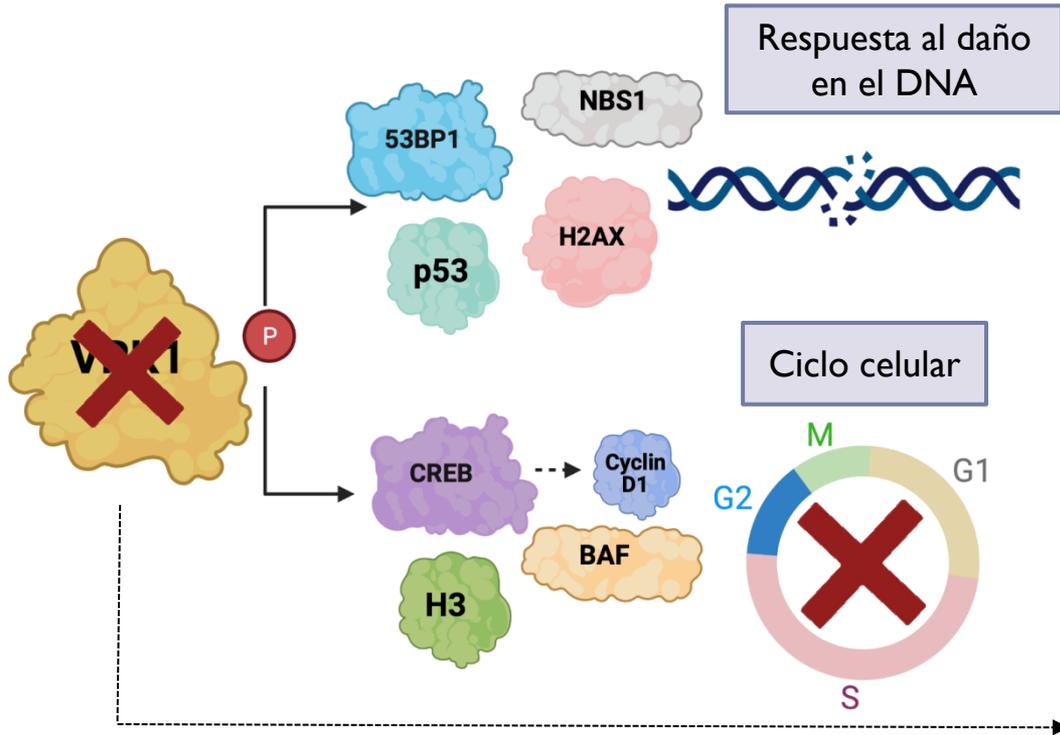


VRK1 ejerce un papel importante en las respuestas al daño en el DNA, fosforilando algunas proteínas implicadas en este proceso.

Además, VRK1 interacciona con varias proteínas implicadas en ciclo celular, mediando la expresión de ciclina D1 y, por tanto, la transición de la fase G1 a la fase S.

La pérdida de VRK1 bloquea la progresión del ciclo celular y causa infertilidad en ratones.

VRK1



VRK1 ejerce un papel importante en las respuestas al daño en el DNA, fosforilando algunas proteínas implicadas en este proceso.

Además, VRK1 interacciona con varias proteínas implicadas en ciclo celular, mediando la expresión de ciclina D1 y, por tanto, la transición de la fase G1 a la fase S.

La pérdida de VRK1 bloquea la progresión del ciclo celular y causa infertilidad en ratones.

Estos datos muestran la importante asociación de VRK1 con la proliferación celular.

VRK1 & CÁNCER

VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma

Claudio R Santos ¹, María Rodríguez-Pinilla, Francisco M Vega, José L Rodríguez-Peralto, Sandra Blanco, Ana Sevilla, Alberto Valbuena, Teresa Hernández, André J van Wijnen, Fengzhi Li, Enrique de Alava, Montserrat Sánchez-Céspedes, Pedro A Lazo

En epitelios escamosos normales humanos, VRK1 se expresa cerca de la capa basal, donde hay mayor proliferación celular, y su expresión se pierde a medida que las células epiteliales se diferencian, patrón de expresión similar al del marcador de proliferación Ki67.

Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase

J Nezu ¹, A Oku, M H Jones, M Shimane

VRK1 se expresa de manera ubicua, con altos niveles de expresión en tejidos con altas tasas de proliferación.

Molecular genetic analysis of VRK1 in mammary epithelial cells: depletion slows proliferation in vitro and tumor growth and metastasis in vivo

T P Molitor ¹, P Traktman

Además, se ha demostrado la correlación entre la sobreexpresión de VRK1 y un peor pronóstico en cáncer de mama.

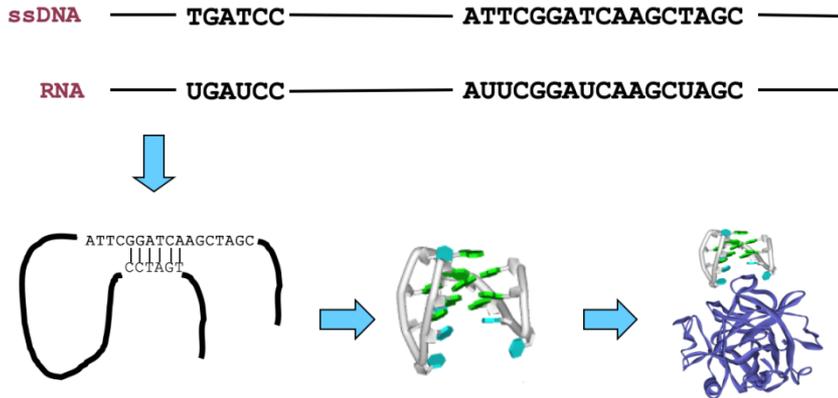


Potencial diana terapéutica en terapia contra el cáncer



APTÁMEROS

Los aptámeros son ácidos ribonucleicos (ARN) o desoxirribonucleicos (ADN) sintéticos, de cadena sencilla que, gracias a su habilidad para formar estructuras secundarias y terciarias, son capaces de unirse de forma específica a un amplio rango de dianas.



OBJETIVOS

Selección de aptámeros específicos frente a la proteína quinasa VRK1.

Caracterización y optimización de los aptámeros obtenidos.

Comprobar el efecto de los aptámeros en la línea tumoral de cáncer de mama MCF7:

- Ensayos de viabilidad
- Ensayos de ciclo celular
- Apoptosis

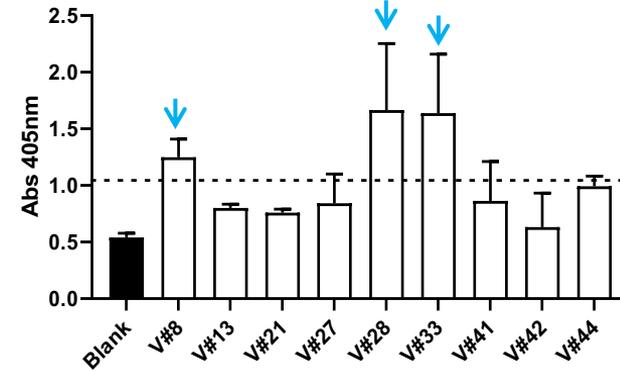
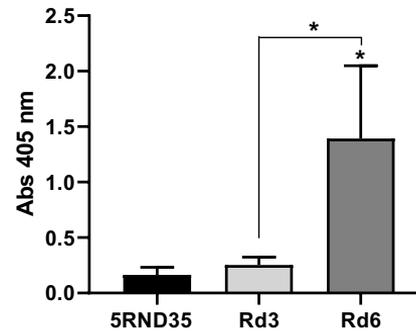
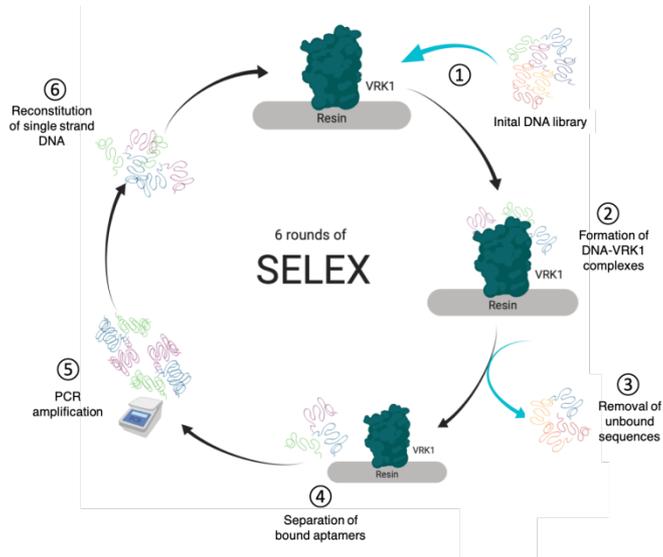
RESULTADOS

SELECCIÓN DE APTÁMEROS CON ALTA AFINIDAD FRENTE A VRK1

Tras 6 rondas de selección se comprobó el enriquecimiento de las poblaciones obtenidas mediante ensayos ELONA.

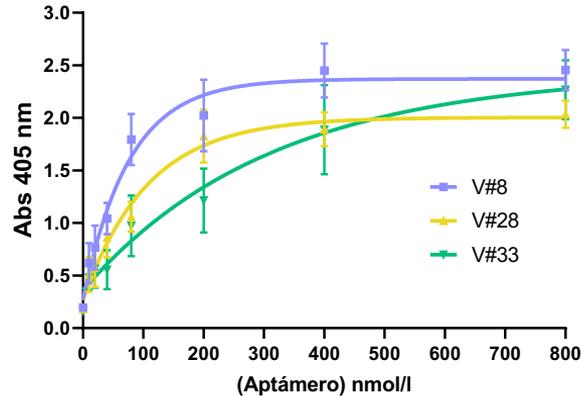
La ronda 6 (Rd6) mostró un incremento significativo de la señal respecto a la ronda 3 (Rd3) y la población inicial 5RND35.

La ronda 6 fue clonada y secuenciada. Los aptámeros con más afinidad hacia VRK1 fueron: V#8, V#28 y V#33



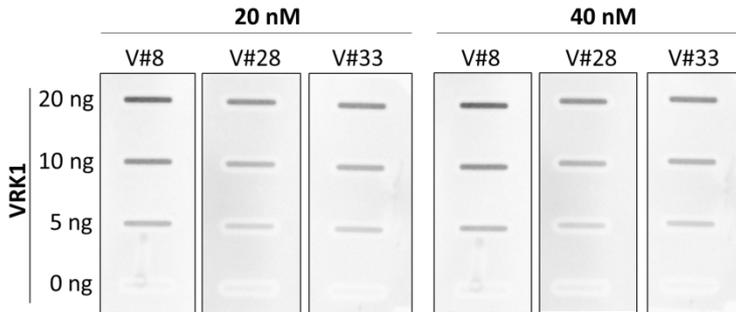
RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS OBTENIDOS



La afinidad de los aptámeros por VRK1 se estudió mediante ensayos ELONA en los que se incuban concentraciones crecientes de aptámero con una cantidad fija de proteína VRK1.

Los aptámeros V#8, V#28 y V#33 son capaces de detectar VRK1 de manera dependiente de la concentración con Kds de 45.82 ± 5.01 nM, 60.06 ± 7.05 nM y 128.8 ± 55.56 nM, respectivamente.



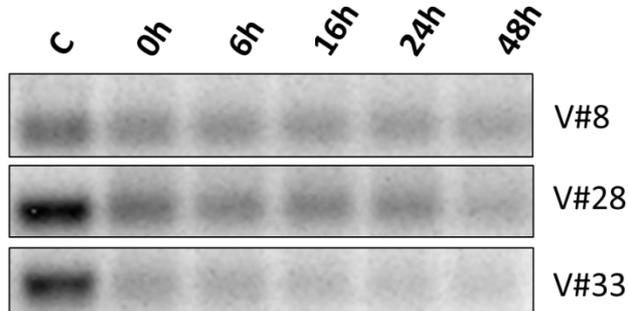
La sensibilidad de los aptámeros (mínima cantidad de proteína que es capaz de detectar una concentración fija de aptámero) se analizó por Slot blot.

Los tres aptámeros fueron capaces de detectar al menos 5 ng de la proteína VRK1.

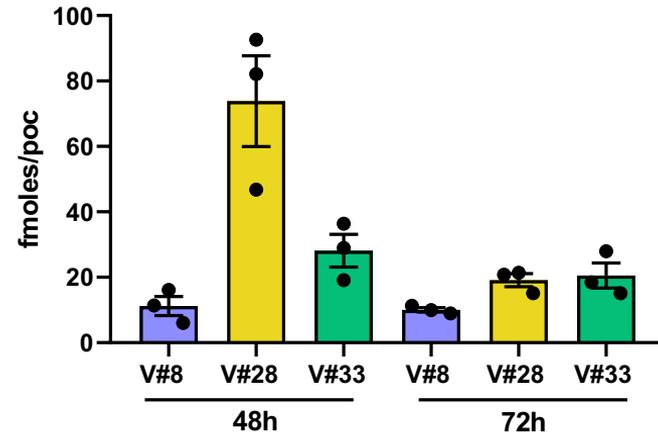
RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS OBTENIDOS

La estabilidad de los aptámeros se estudió midiendo su susceptibilidad a la degradación por enzimas presentes en el plasma, mostrando que los aptámeros V#8 y V#28 son los más estables.



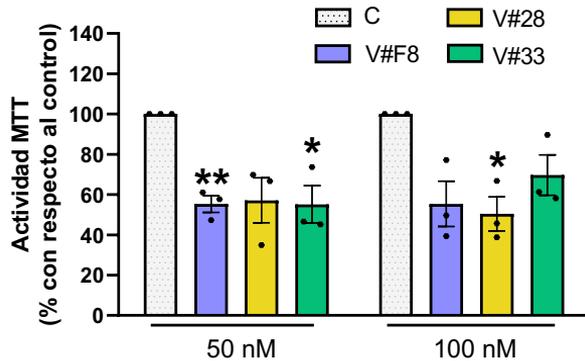
Antes de realizar ensayos funcionales en células, se midió la internalización de los aptámeros en las células mediante transfección con lipofectamina. Los tres aptámeros son capaces de entrar en las células, siendo la entrada de V#28 la más eficiente 48h post-transfección. A las 72h la concentración intracelular de los tres aptámeros es similar.



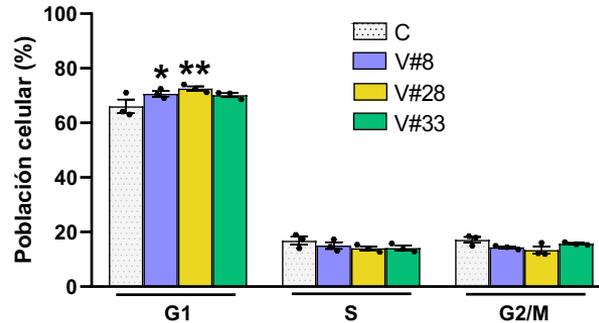
RESULTADOS

EFECTO DE LOS APTÁMEROS EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA MCF7

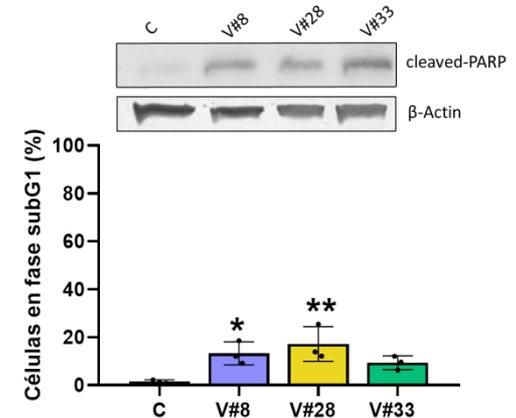
Los tres aptámeros disminuyen la viabilidad celular en la línea MCF7 a 50 nM y 100 nM.



Los aptámeros V#8 y V#28 incrementan significativamente la población de células en la fase G1 del ciclo celular, sugiriendo que ambos producen una parada en dicha fase.



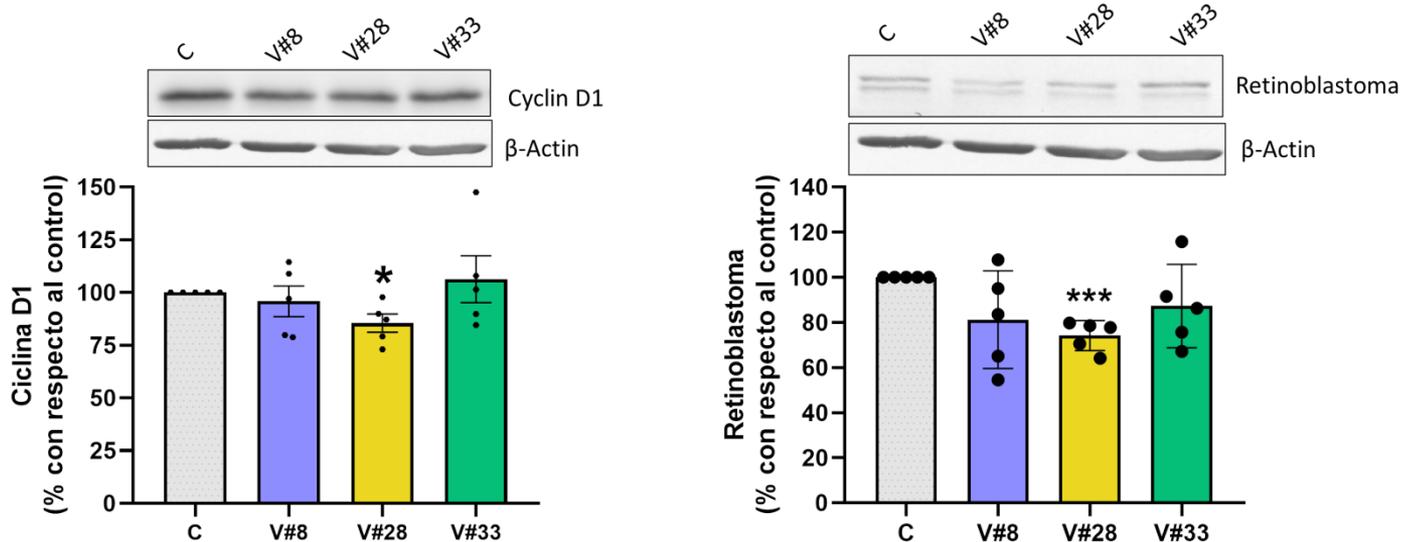
Además, V#8 y V#28 aumentan significativamente el porcentaje de células en fase subG1 indicando que inducen apoptosis en las células MCF7. Lo que se confirma también por el procesamiento del marcador apoptótico PARP.



RESULTADOS

EFECTO DE LOS APTÁMEROS EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA MCF7

Dada la implicación de VRK1 en la progresión del ciclo celular, se analizó el efecto de los aptámeros sobre los niveles de proteínas implicadas en el ciclo celular como ciclina D1 y retinoblastoma. El aptámero V#28 reduce significativamente los niveles de ambas proteínas.



CONCLUSIONES

Hemos seleccionado tres aptámeros que reconocen con alta afinidad la proteína quinasa VRK1.

Los resultados preliminares indican que los aptámeros V#8 y V#28 reducen la viabilidad celular en la línea tumoral de mama MCF7. Además, producen un bloqueo en la transición G1/S del ciclo celular mediada por la disminución en los niveles de ciclina D1, induciendo apoptosis en las células.

Estos resultados abren la posibilidad a futuros estudios en los que los aptámeros pueden ser usados en terapia contra el cáncer.

¡GRACIAS!

