



Universidad
de Alcalá



Estudio bibliográfico sobre la posible relación entre la regulación de la expresión de la ADN polimerasa theta y la desregulación metabólica en células tumorales

Autor: Carolina Guerrero Amelín
Tutor: Pedro Antonio Mateos Gómez

TFM 2020

Dianas Terapéuticas en Señalización Celular: Investigación y Desarrollo

Buenos días a todos, soy Carolina y el título de mi TFM es “Estudio bibliográfico sobre la posible relación entre la regulación de la expresión de la ADN polimerasa θ y la desregulación metabólica en células tumorales.

01 INTRODUCCIÓN

02 HIPÓTESIS

03 DESARROLLO DEL ESTUDIO

04 CONCLUSIONES OBTENIDAS

05 PERSPECTIVA DE FUTURO

TABLA DE CONTENIDOS



Este es el esquema que voy a seguir durante la presentación.

01 INTRODUCCIÓN



Integridad

- Mutaciones
- Deleciones y duplicaciones de secuencia
- Translocaciones
- Aneuploidía

- Modificaciones en nucleótidos
- Roturas de cadena sencilla/ doble cadena

Células tumorales



Predisposición a las consecuencias por daño en ADN



Mecanismos de reparación deficiente

Aumento en tasa de proliferación

Daño por agentes citotóxicos en ttos. oncológicos

El ADN de las células sufre daño constantemente y precisa de su reparación para mantener su integridad. Existen diferentes tipos de daños como son las modificaciones en nucleótidos y las roturas de cadena sencilla y de doble cadena (siendo éstas últimas las más peligrosas) que, si no son reparadas eficientemente, la célula puede sufrir ciertas consecuencias que van desde pequeñas mutaciones, deleciones y duplicaciones de secuencia, translocaciones e incluso aneuploidías. Las células tumorales presentan una mayor predisposición a sufrir estas consecuencias en el ADN por diversos motivos, como son tener mecanismos de reparación el ADN deficientes, un aumento en la tasa de proliferación e incluso por el daño causado por agentes citotóxicos en tratamientos oncológicos.

02 HIPÓTESIS

Disfunción mitocondrial



“Efecto Warburg”

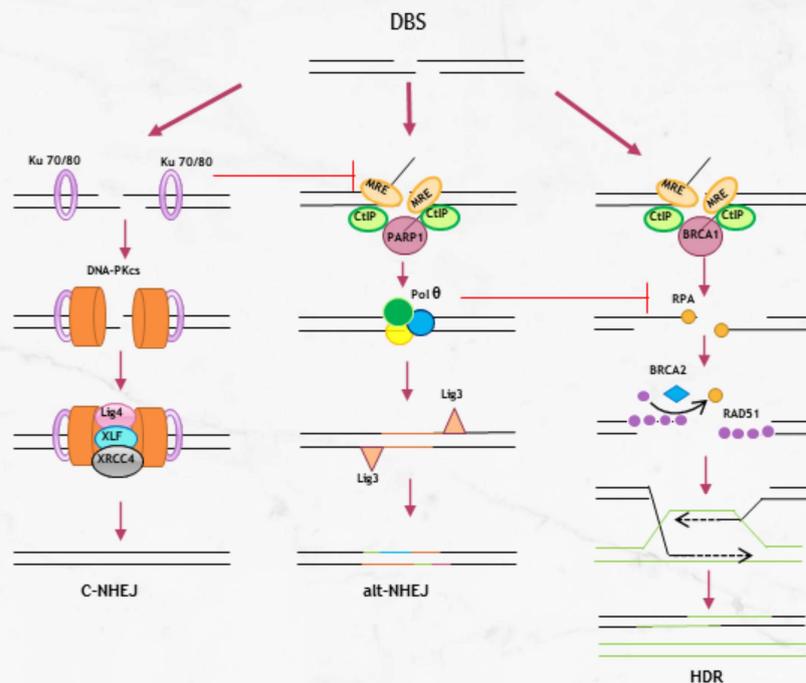


Expresión de ADN polimerasa θ

Nuestra hipótesis de trabajo es que la disfunción mitocondrial o efecto Warburg puede estar implicado en la regulación o puede ser el detonante de la expresión de la ADN polimerasa θ . Esto lo pensamos porque la expresión de la polimerasa solo se da en células tumorales y en algunas células tumorales y, una característica de las células tumorales es el efecto Warburg.

Entonces, ¿quién es la ADN polimerasa theta y por qué nos interesa?

¿Todas las células tumorales tienen efecto Warburg? → No tengo el dato para decir que todas las células tumorales lo tienen, pero sí que es cierto que el efecto Warburg es una característica de las células tumorales y además que se descubrió el efecto en ellas.



La ADN polimerasa θ nos interesa porque los mecanismos de reparación del ADN están los de doble stand break o DBS que son los más difíciles de reparar y los más peligrosos porque son los que mayores consecuencias pueden tener y los que más van a afectar a la integridad del genoma.

En cuanto a la reparación del DBS existen 3 mecanismos que actúan en diferentes momentos del ciclo celular.

- C-NHEJ: actúa en fase G1 y no hay prácticamente procesamiento de los extremos, aunque algunas veces pueden meter pequeños indels (inserciones y deleciones de 1-2 nucleótidos), sobretodo deleciones.
- HDR: Es un mecanismo fiel ya que permite mantener la secuencia del ADN por que es un mecanismo que utiliza la cromátida hermana. Como se necesita una cromátida hermana, se necesita que el ADN ya se haya replicado, por lo que solo va a actuar este mecanismo en fase S si ya está replicado y en la G2 sobre todo.
- Alt-NHEJ: Es el mecanismo de reparación que desde nuestro punto de vista nos interesa. Es un mecanismo que requiere procesamiento de los extremos y que es muy mutagénico, es decir, que todos los eventos de reparación acaban con una deleción, a veces inserciones de secuencia (20-25%). Esto es debido a cómo funciona la polimerasa. La micromología (pequeñas secuencias homólogas a ambos lados de la rotura) es lo que permite que los extremos se unan. Si no hay ningunos nucleótidos que puedan aparear, la polimerasa lo que hace es o bien extender la cadena sin necesidad de tener un molde (porque tiene actividad transferasa terminal), o bien como es una polimerasa poco fiel, ante un extremo de cadena sencilla, este se pliega sobre sí mismo y ya se obtiene un molde, de forma que esto se extiende pero con nucleótidos de la

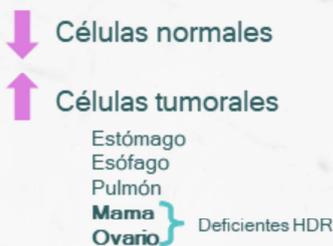
propia cadena. También puede ocurrir que si se pega al otro extremo, copia varios nucleótidos. → **Observado en estudios del doctor Mateos-Gómez**
La ADN polimerasa θ es un factor fundamental

PARP1: está implicado en la reparación de roturas de cadena sencilla y de bases modificadas químicamente. Cuando hay una deficiencia de HDR y o se inhibe PARP1, no hay reparación de roturas de cadena sencilla por lo que de las 2 cadenas, una tendría una rotura. El problema surge cuando se produce la replicación ya que las cadenas se abren y deben de replicarse, apareciendo el DBS. → **Todos los SSB que no se reparan porque PARP1 está inhibido, se convierten en DBS todos a la vez en fase S. Como no tienen recombinación homóloga, la célula muere.**

Se ha observado que el reclutamiento de la ADN polimerasa θ está mediado en parte por PARP1, pero no es totalmente seguro. → **Observado en estudios del doctor Mateos-Gómez que si se inhibe PARP1, la Pol θ se recluta en un 50%.**

ADN polimerasa θ 

ADN polimerasa θ : Familia A, baja fidelidad, síntesis sobre bases dañadas...

Expresión

➔ Peor pronóstico clínico
Resistencia a tos.

Tasa mutación

↓
¿Beneficios?

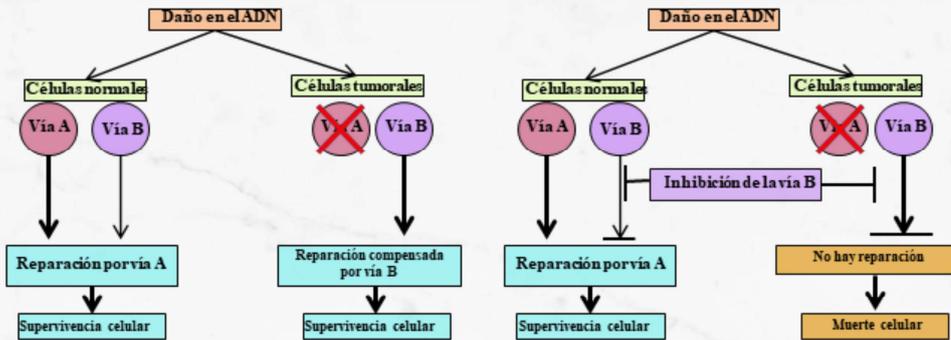
Entonces, ¿quién es la ADN polimerasa theta y por qué nos interesa?

Características de la ADN polimerasa theta:

- Baja fidelidad
- La estructura primaria de las subunidades catalíticas hace que pertenezca a la Familia A
- 3 dominios:
 - N-terminal o dominio de tipo helicasa (el dominio más conservado y con actividad ATPasa dependiente de ADN)
 - Dominio central
 - Dominio C-terminal o dominio de ADN polimerasa, dentro del cual se encuentra un dominio de exonucleasa no funcional, y 3 inserciones de secuencia que no están presentes en ninguna otra polimerasa
- Síntesis sobre bases dañadas (la Pol θ tiene actividad TdT (las polimerasas necesitan molde)). Se cree que la inserción 2 es la que le otorga la actividad TdT.

Las células tumorales al tener esta polimerasa parece ser que eso puede beneficiarlas ya que el tener una tasa de mutación mayor hace que aumente la capacidad de evolución del tumor y de generar variantes clones, es decir de células que dentro del tumor son diferentes genéticamente, esto puede generarle ventajas.

Diana Terapéutica



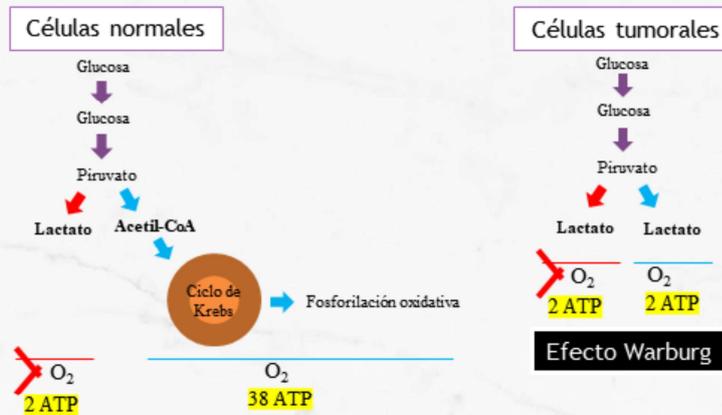
Vía A: HDR
Vía B: alt-NHEJ

¿Por qué se usa la ADN polimerasa θ como diana terapéutica?

La vía HDR y la alt-NHEJ actúan a la vez en fase S, por lo que si hay tumores que tienen mutada la vía A (HDR), utilizan la vía B (alt-NHEJ) llevada a cabo por la ADN polimerasa θ .

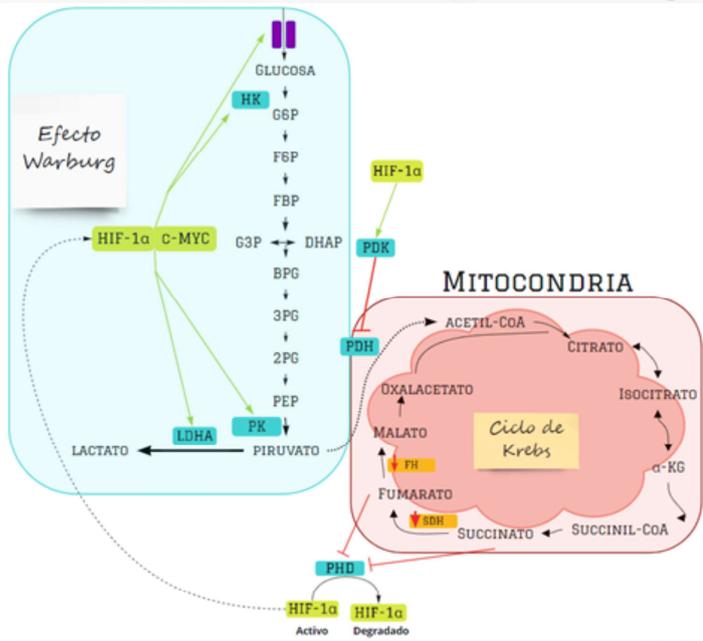
Muerte celular:

- Como las células no pueden reparar ni por HDR ni por alt-NHEJ, lo que ocurre es que no les queda otra que reparar por c-NHEJ. Empiezan a aparecer cromosomas rotos o que se pegan entre sí, de manera que al pasar por mitosis estos se rompen y aparecen aberraciones cromosómicas \rightarrow la célula muere
- Hay células que con HDR también se mueren (aunque no con tanta frecuencia). Como las células tumorales tienen más estrés replicativo y esto genera más daño y más roturas, el tener la ADN polimerasa θ les ayuda a repararlos.



En cuanto al efecto Warburg, el cual fue descubierto en células tumorales, se caracteriza porque las células presentan un elevado consumo de glucosa que utilizan en lugar de para fabricar ATP en grandes cantidades, para fabricar intermediarios que permitan sintetizar nucleótidos, aminoácidos... moléculas biológicas utilizadas para su crecimiento y proliferación tanto en presencia como en ausencia de oxígeno

Efecto Warburg en células tumorales



- ✓ Crecimiento incontrolado
- ✓ Elevadas cantidades de carbono
- ✓ Biosíntesis moléculas
- ✓ Regeneración NAD⁺ a partir de NADH

Como he mencionado anteriormente, el efecto Warburg es una característica de las células tumorales. Cuando una célula tumoral lleva a cabo una glucólisis anaeróbica o efecto Warburg, se observan diferentes cambios en las mitocondrias de forma que reorientan el proceso metabólico ya que el piruvato en lugar de ser usado en una producción eficiente de ATP a través de la fosforilación oxidativa es empleado para obtener intermediarios del ciclo de Krebs. De esta forma, el consumo de glucosa se desvía de una función estrictamente energética a una función energética y anabólica. En la mitocondria, la succinato deshidrogenasa (SDH) y la fumarasa (FH) pierden su actividad lo que conlleva a una acumulación de intermediarios que inhiben a la PHD (prolil-hidroxilasa HIF) la cual se encarga de la degradación de HIF-1 y que mencionaremos de nuevo más adelante

Efecto Warburg en células normales

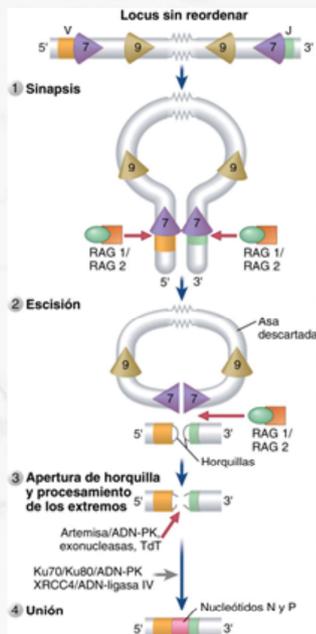
Testículo
Tejido placentario humano
Células hematopoyéticas

↑ Expresión Pol θ

Células mieloides	Metabolismo
Neutrófilos Basófilos Eosinófilos	Glucólisis anaeróbica (ATP) y ruta de las pentosas fosfato (NADPH)
Macrófagos M1 (cels.dendríticas) M2	Glucólisis anaeróbica (ATP) y ruta de las pentosas fosfato (NADPH) Oxidación ácidos grasos
Células linfoides	
Linfocitos T Naïve Efectores Memoria (T reg)	Glucólisis anaeróbica Glucólisis anaeróbica + Fosforilación oxidativa Fosforilación oxidativa y Oxidación ácidos grasos
Linfocitos B	Glucólisis anaeróbica + Fosforilación oxidativa

Además, se ha observado efecto Warburg en células normales, como son en los testículos, en tejido placentario y en células hematopoyéticas, observándose además una sobre expresión de pol θ en testículo y en linfocitos. En cuanto a los tipos y subtipos de linfocitos, los he recogido en esta tabla para indicar que principalmente utilizan la glucólisis anaeróbica o efecto Warburg y que además el cambio de metabolismo está propiciado por la activación o el retorno al estado basal de los linfocitos.

Efecto Warburg en células normales



Recombinación V(D)J → TCR
Ig

Recombinación somática

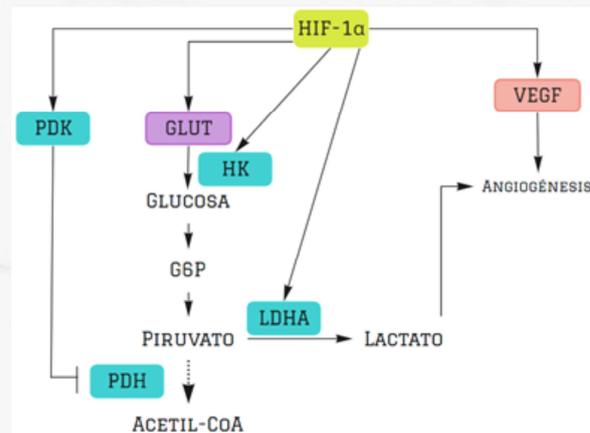
- RAG 1 y RAG 2
- Reparación c-NHEJ
- TdT

Hipermutación somática → ADN polimerasa η → A/T
ADN polimerasa θ → C/G

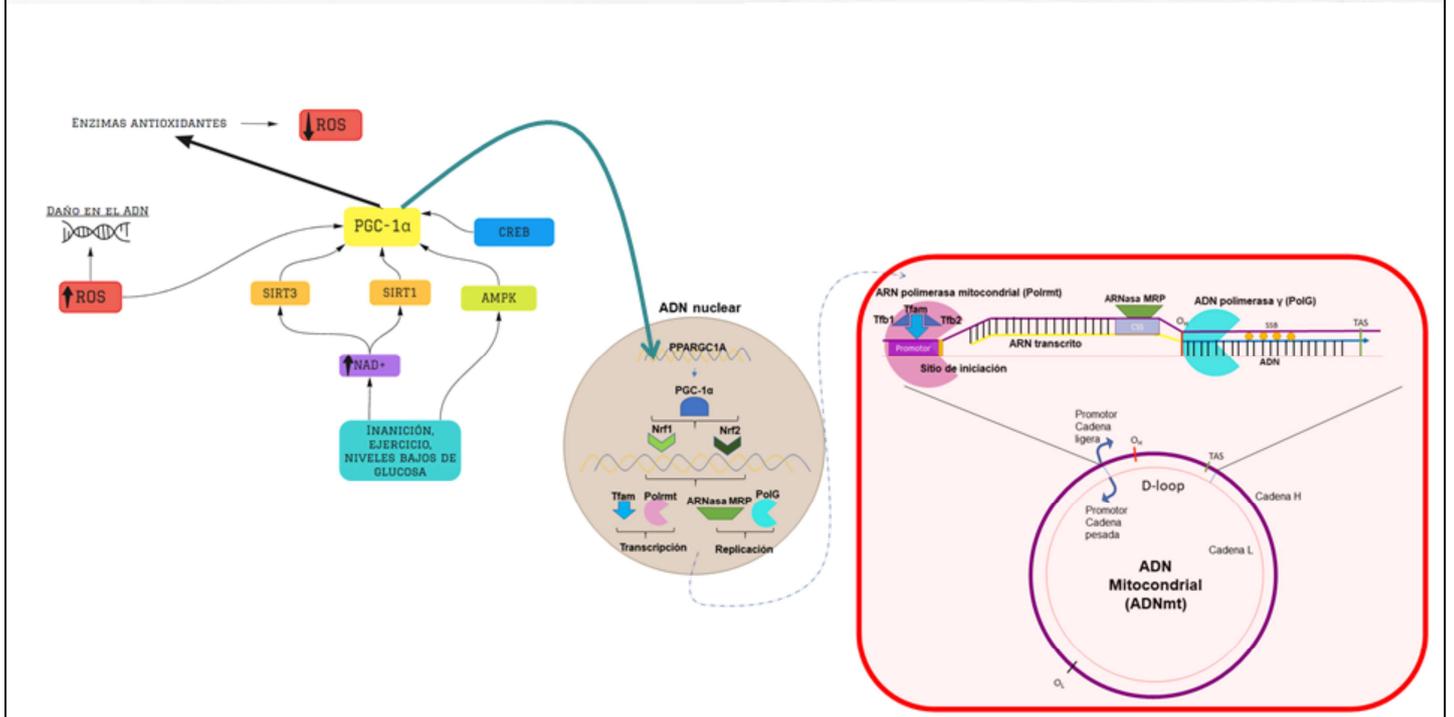
↑ Variabilidad

Abbas, A.K., Pillai, S. and Lichtman, A.H. 2018. Desarrollo del linfocito y reordenamiento del gen del receptor para el antígeno. In: Abbas A.K., Pillai S., Lichtman A.H., editors. Inmunología celular y molecular. 9 ed. Barcelona: Elsevier España; 179-207

Las células normales que tienen efecto Warburg, en concreto centrándonos en los linfocitos T y B, necesitan reparar el ADN ya que crean a propósito DSB para crear variabilidad. Para ello, utilizan la recombinación V(D)J para generar combinaciones al azar de los segmentos V, D y J, formándose los TCR y las Ig de los linfocitos B. Para llevarlo a cabo, durante la recombinación somática, las RAG1 y RAG2 que son las recombinasas eligen al azar los segmentos y los cortan. Después, los segmentos se reparan por c-NHEJ y finalmente, la TdT une los segmentos añadiendo nucleótidos al azar. En el caso de los linfocitos B, cuando cambian la región variable de las IG para aumentar la afinidad y mejorarla, proceso denominado hipermutación somática, también es usado para aumentar la variabilidad. Además, para aumentar las mutaciones y de nuevo generar aún más variabilidad, intervienen las ADN polimerasas η que intercambia nucleótidos A/T y la ADN polimerasa θ cambiando C/G. Es lógico por tanto que la ADN polimerasa θ esté implicada



Continuando con nuestra hipótesis, pensamos que debe de haber un mediador o intermediario entre el efecto Warburg y la expresión de la ADN polimerasa θ . Es por ello que habíamos pensado en HIF-1. Las células tumorales presentan una elevada tasa de crecimiento, lo que provoca que las células induzcan angiogénesis para poder obtener oxígeno y nutrientes, pero además es cierto que las células más alejadas de los vasos se encuentran en un ambiente hipóxico y ácido. Ante la falta de oxígeno, se transcribe el factor HIF-1 que regula las enzimas PDK, GLUT, HK, LDHA y VEGF favoreciendo la angiogénesis



Cuando hay un metabolismo oxidativo deficiente, se producen más ROS y esto provoca más daño en el ADN. Se ha postulado que la ADN polimerasa θ puede estar implicada en la reparación de la mitocondria que es donde más daño va a haber por que es donde más se producen. El aumento de ROS hace que PGC-1 se active y se expresen genes para enzimas antioxidantes.

Tanto PGC-1 como HIF-1 son dos proteínas que se activan en un contexto de efecto Warburg, de daño en el ADN por aumento de ROS y puede ser que esto sea lo que detone que se exprese la ADN polimerasa θ .

04 CONCLUSIONES OBTENIDAS

1. Hay expresión de la ADN polimerasa θ en células tumorales, en linfocitos y en testículos.
2. En células tumorales, linfocitos y testículo hay efecto Warburg



Expresión de ADN polimerasa θ



Disfunción mitocondrial
○
"Efecto Warburg"

Al hacer un estudio bibliográfico hemos observado que las células que sobre expresan o que expresan la ADN polimerasa θ , son aquellas en las que se presenta disfunción mitocondrial o efecto Warburg.
Los tejidos donde hay efecto Warburg, hay sobre expresión de Pol θ .

05 PERSPECTIVA DE FUTURO

1. Inhibición de la cadena respiratoria con diferentes drogas/ silenciamiento proteína codificada en ADNn → aumento de ROS → aumento en la expresión de Pol θ
2. Drogas para inhibir fosforilación oxidativa y potenciar efecto Warburg/ inhibir glucólisis
3. Silenciamiento de PGC-1 y HIF-1 para analizar posible disminución de Pol θ
4. Cultivos celulares con medios específicos/ cámaras de hipoxia para estudiar el metabolismo celular y posible disminución de Pol θ .
5. Análisis del efecto en la biogénesis mitocondrial
Medición de posibles aumentos de ADNmt/ componentes de las mitocondrias (cardiolipina)

1. Inhibición cadena: tenemos las células en cultivo y le añadimos la droga. Después, se recogen las células, se extrae el ARN y cuantificamos la cantidad de ARNm que hay. // Podemos añadir antioxidantes de forma que se quitan los ROS que hay.
2. sHRNA silenciamiento de PGC-1 y HIF-1.
3. Cultivos celulares con medios específicos como una deficiencia de aminoácidos. Con esto se consigue que la célula pase por el ciclo de Krebs para producirlos.
4. Estos procedimientos afectan a la biogénesis de la mitocondria, por lo que analizamos su efecto a través de aumentos de ADNmt o a través de la cardiolipina que es un componente único de la membrana interna de la mitocondria. → cuantificamos el número de mitocondrias

Muchas gracias



Universidad
de Alcalá



carolina.guerreroa@edu.uah.es
pedroantonio.mateos@uah.es