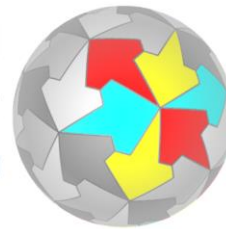


Estudio del papel de la DNA polimerasa Theta en la progresión del cáncer de próstata y su relevancia como diana terapéutica.

SEÑALIZACIÓN
CELULAR
DOCTORADO UAH



Autor/a: Irene de Miguel García
Director/a: Pedro A. Mateos Gómez

Departamento de Biología de Sistemas



At a Glance

Estimated New Cases in 2021	248,530
% of All New Cancer Cases	13.1%

Estimated Deaths in 2021	34,130
% of All Cancer Deaths	5.6%

Common Types of Cancer	Estimated New Cases 2021	Estimated Deaths 2021
1. Breast Cancer (Female)	281,550	43,600
2. Prostate Cancer	248,530	34,130
3. Lung and Bronchus Cancer	235,760	131,880
4. Colorectal Cancer	149,500	52,980
5. Melanoma of the Skin	106,110	7,180
6. Bladder Cancer	83,730	17,200
7. Non-Hodgkin Lymphoma	81,560	20,720
8. Kidney and Renal Pelvis Cancer	76,080	13,780
9. Uterine Cancer	66,570	12,940
10. Leukemia	61,090	23,660

CÁNCER DE PRÓSTATA

INCIDENCIA: AECC

Cáncer más diagnosticado entre varones.

MORTALIDAD: AECC y Globocan.

5ª causa de muerte en la población masculina a nivel mundial, constituyendo el 5,6 % de las muertes por cáncer y 3ª causa de muerte en la población masculina europea y española.

RELEVANCIA:

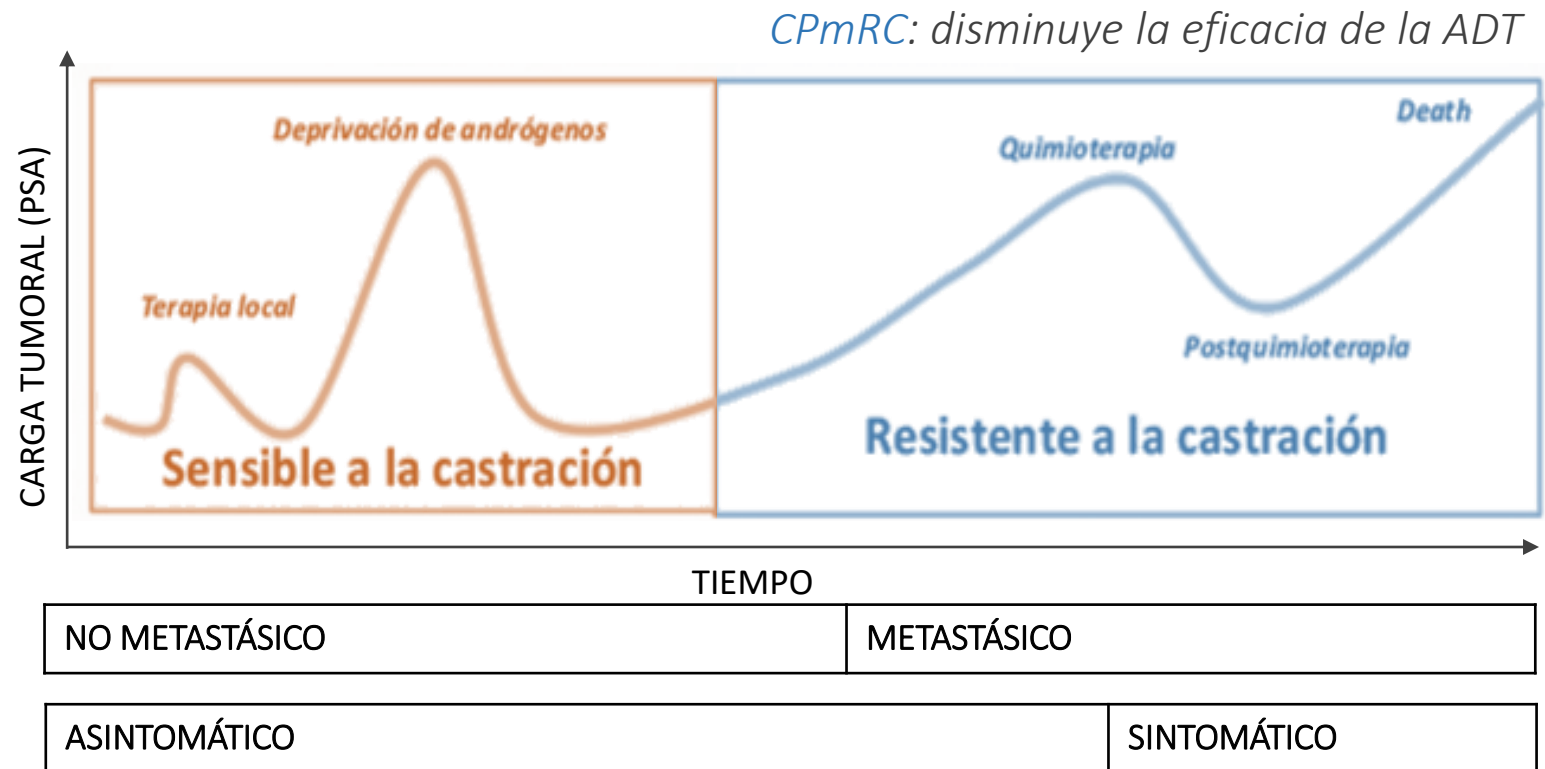
A pesar de que la mayoría de los cánceres de próstata se diagnostican y tratan en estadios iniciales muy localizados, hay pacientes que presentan enfermedad metastásica (CPm, cáncer de próstata metastásico) como forma debutante y otros progresan hacia este estadio durante el tratamiento de elección para la misma o ADT (androgen deprivation therapy).

La forma que progresa a **enfermedad metastásica (CPm)** pese al tratamiento se conoce como **cáncer de próstata resistente a la castración (CPmRC)**, forma letal de la enfermedad.

Cáncer de próstata resistente a la castración (CPmRC)

A pesar de que los mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad no se conocen del todo, la **señalización continua de los receptores de andrógenos (AR)** se considera fundamental para el desarrollo del CP, por lo que la señalización androgénica es la diana de las terapias actuales.

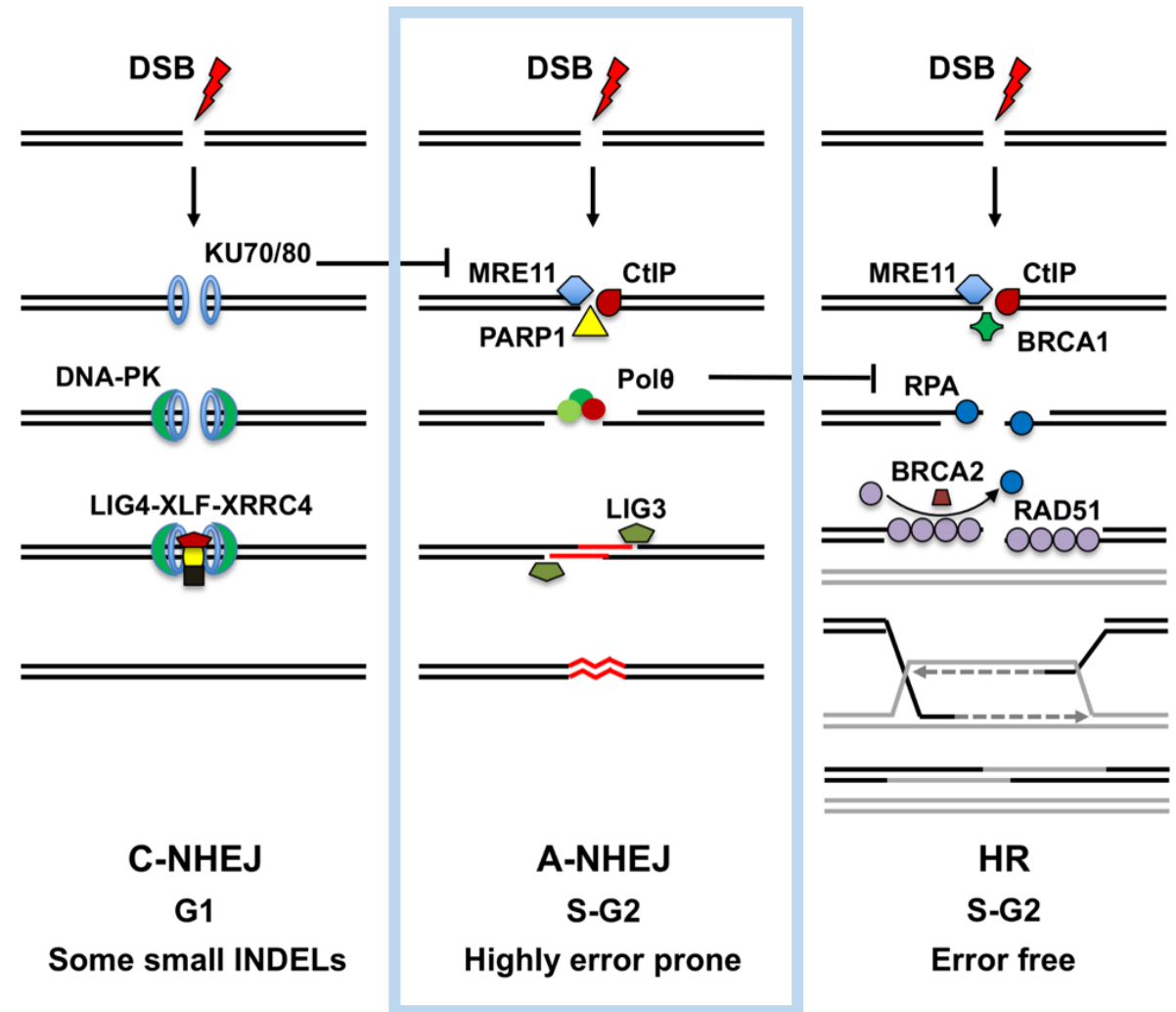
Dicha terapia, deja de ser eficaz una vez alcanzado el estadio de CPmRC, por lo que resulta **necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas** para evitar la progresión hasta esta fase o para mejorar su abordaje una vez alcanzada.



ROTURAS DE DOBLE CADENA (DSB) Y VÍAS DE REPARACIÓN

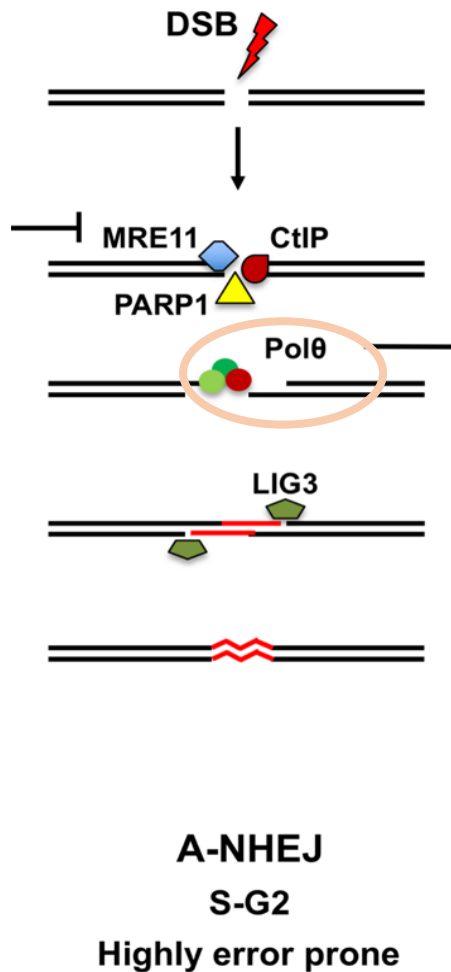
La inestabilidad genómica resulta ser un factor crítico implicado en la aparición y la progresión de tumores y en la heterogeneidad tumoral. En consecuencia, también lo es en la **resistencia al tratamiento**. Existen diversos factores capaces de provocar daños en el DNA, siendo el daño más peligroso las **roturas de la doble hebra (DSB)**. Para evitar la acumulación de mutaciones genéticas y mantener la integridad genómica, las células disponen de mecanismos conocidos como **vías de reparación del DNA**.

Además de las dos vías canónicas de reparación de DSB, recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos clásica (C-NHEJ), recientemente se ha descrito la existencia de una tercera vía, denominada **unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ)**.



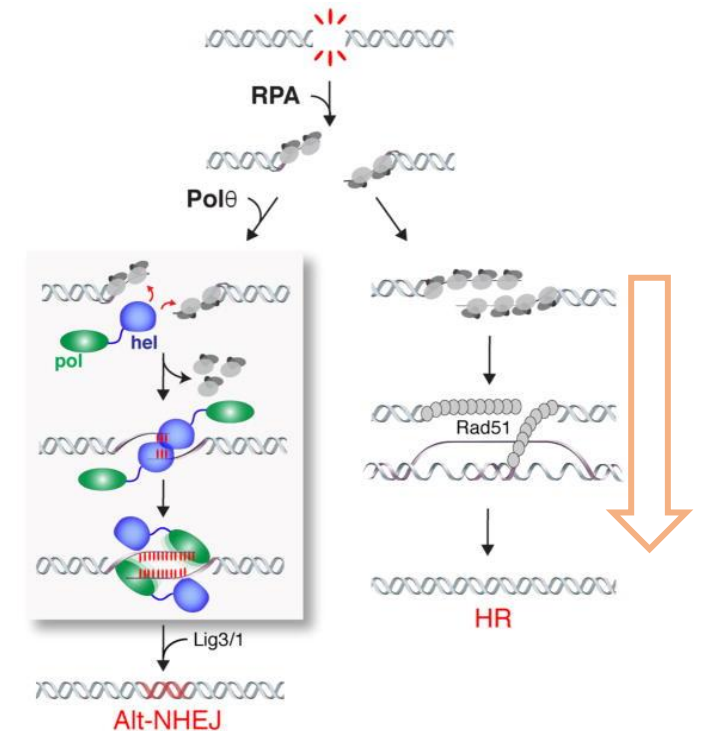
Mateos-Gomez, Pedro A et al. "The helicase domain of Polθ counteracts RPA to promote alt-NHEJ." *Nature structural & molecular biology* vol. 24,12 (2017): 1116-1123. doi:10.1038/nsmb.3494

A-NHEJ



La **unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ)** actúa durante las fases S y G2 del ciclo celular. Se trata de un mecanismo de reparación que aprovecha secuencias cortas de bases homólogas a ambos lados de las roturas de cadena para reunir los extremos de las mismas. Sin embargo, muchos de los eventos de esta reparación favorecen translocaciones, deleciones e inserciones, comprometiendo la integridad genómica.

La introducción de inserciones se atribuye a la **polimerasa Theta (POLQ)**, codificada por el gen POLQ. Es una DNA polimerasa translesión que cataliza la síntesis de DNA incluso en situaciones de daños en la cadena molde, considerándose una polimerasa de baja fidelidad que carece de actividad exonucleasa 3' → 5' y que **contrarresta** otros mecanismos reparadores libres de errores como la recombinación homóloga (HR).



A-NHEJ Y CÁNCER DE PRÓSTATA

La **expresión de POLQ** se encuentra regulada positivamente en ciertos tipos de cánceres, incluidos pulmón, estómago, colon, mama, melanoma y carcinomas de células escamosas orales, mientras que es **muy baja en tejidos normales**. Dicha sobreexpresión se correlaciona con **un peor pronóstico** de los pacientes ya que **reduce la respuesta al tratamiento, favoreciendo la progresión de la enfermedad**.

Además, **el uso de la A-NHEJ como mecanismo reparador puede verse potenciado**, tanto en CP localizados como **metastásicos**, debido a las alteraciones genéticas que dificultan el correcto funcionamiento de la HR, lo que aumenta el **interés por conocer el papel de Pol θ en la progresión de este tipo de cáncer**.

Por ello, **los niveles de expresión de POLQ podrían resultar interesantes** para ser considerados como **potencial marcador tumoral y como futura diana terapéutica oncológica en cáncer de próstata**.

HIPÓTESIS

Las **alteraciones genéticas** en los **tumores de próstata** conducen al empleo de la **reparación de DSB** mediada por **Pol θ** de modo que su **inhibición** podría ser considerada como una **nueva vía** en el tratamiento del CP.

OBJETIVOS

1. Determinar si el **A-NHEJ** está **regulado positivamente** en CP o en ciertos tumores con características genéticas específicas.
2. Estudiar el **papel de Pol θ** en la **progresión de CP** y en la **supervivencia** de las células de CP.
3. Determinar si **Pol θ** **protege** a las células de CP del **estrés replicativo**.

OBJETIVO 1. Determinar si el A-NHEJ está regulado positivamente en CP

Niveles de expresión de POLQ en líneas celulares de CP.

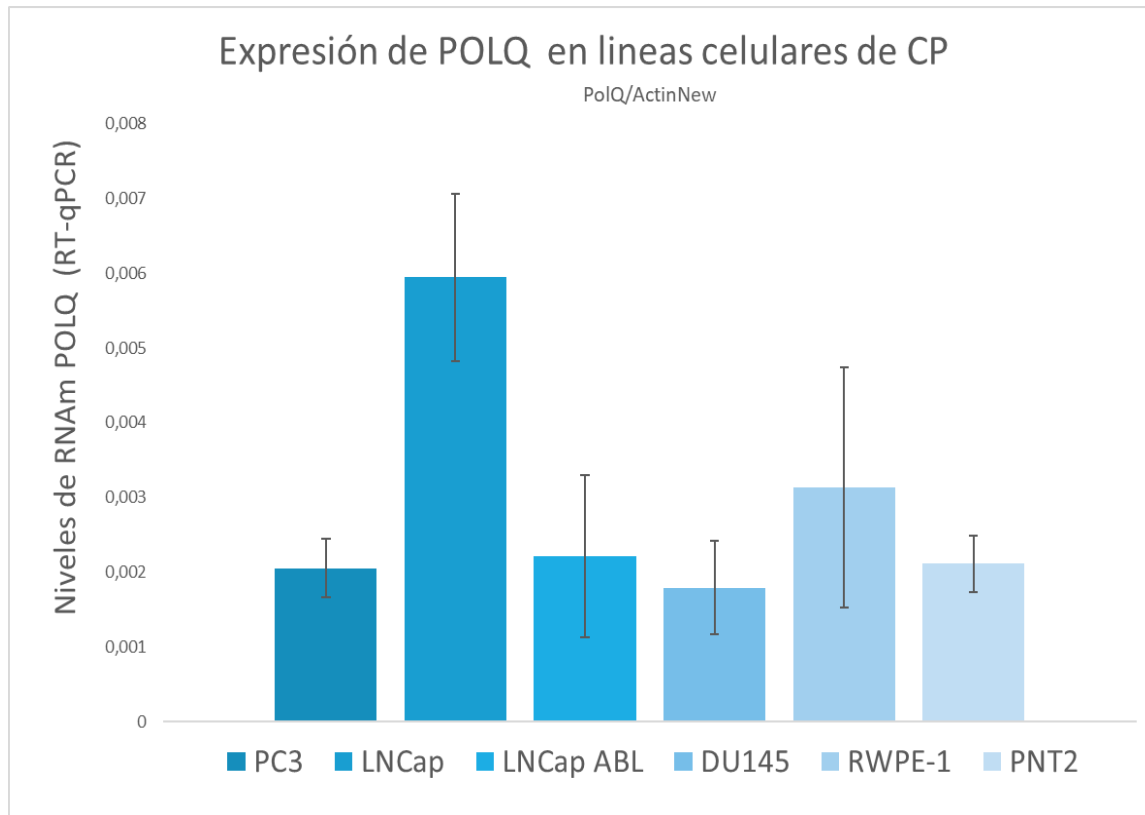


Figura 1. Cuantificación relativa de los niveles de RNAm de *Polθ* mRNA en líneas celulares.

La expresión de *POLQ* se mide mediante qRT-PCR usando como referencia el gen β -actina. Se muestran los niveles de RNAm de *POLQ* en las líneas celulares de CP PC3, LNCaP, LNCaP-abl, DU145, RWPE-1 y PNT2. Las barras del gráfico representan la media de 4 experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos.

Nuestros análisis sugieren que los niveles de expresión de *POLQ* tienden a el alza en la línea celular LNCap de CP.

OBJETIVO 1. Determinar si el A-NHEJ está regulado positivamente en CP

Niveles de expresión de POLQ en muestras de tumores de pacientes.

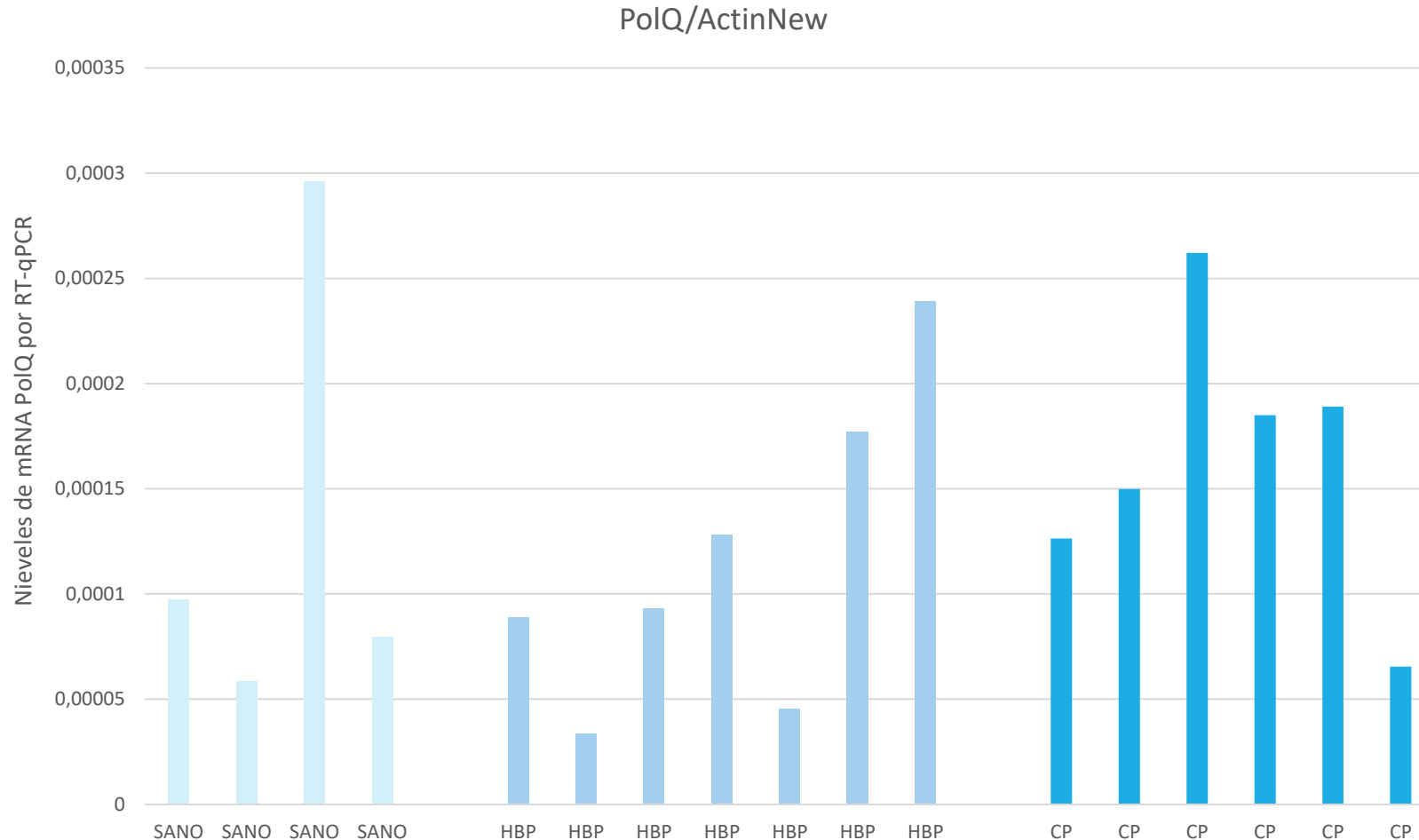


Figura 2. Cuantificación relativa de los niveles de RNAm de Polθ mRNA en muestras de pacientes.

La expresión de *POLQ* se mide mediante qRT-PCR usando *β-actina* como control interno. Se muestran los niveles de RNAm de *POLQ* en muestras de próstata de 4 pacientes sanos, 7 muestras de hiperplasia benigna de próstata (HBP) y 6 muestras de CP.

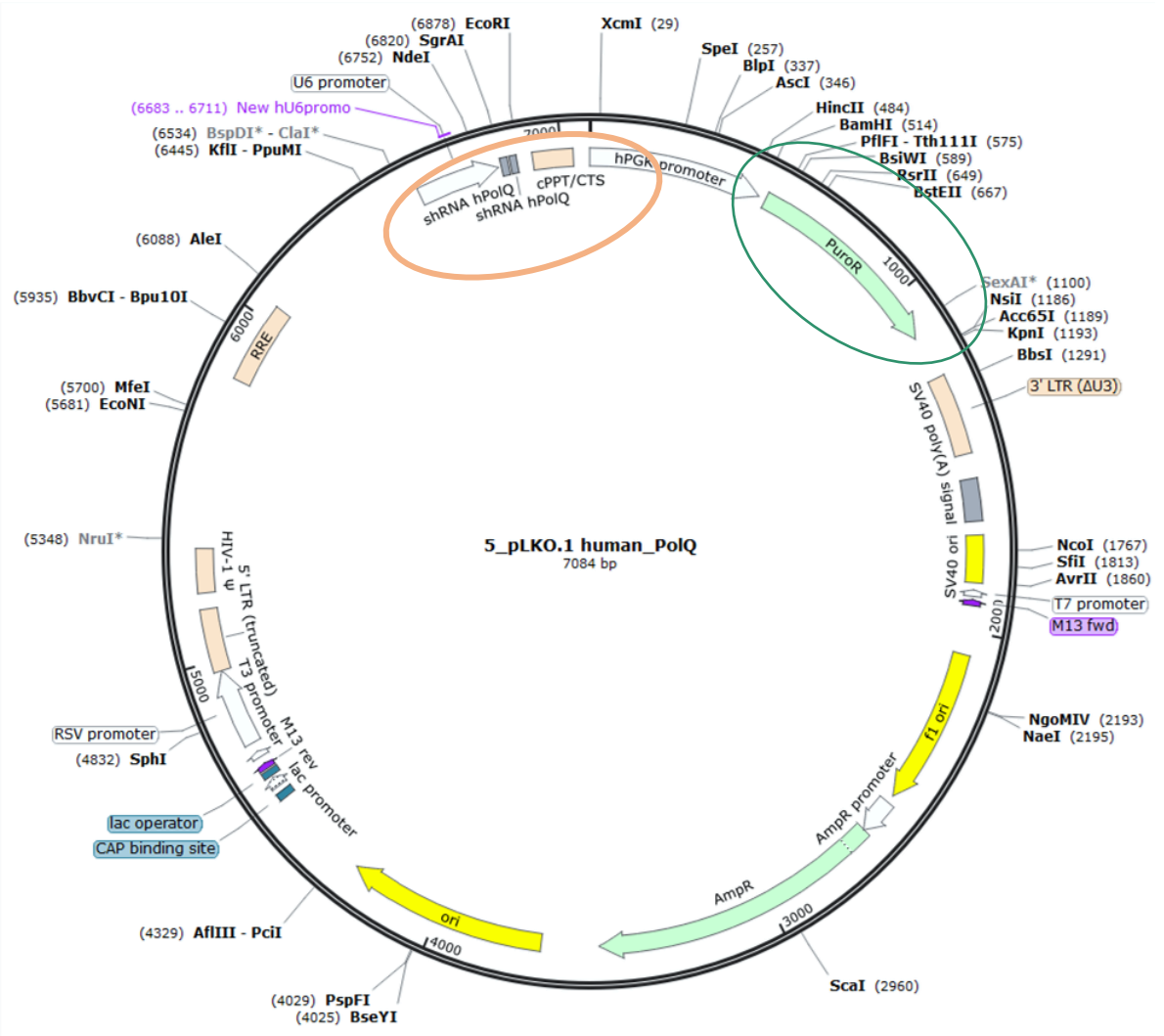
Nuestros resultados sugieren que *POLQ* está sobre-expresada en CP, aumentando el interés por revelar su papel en la biología de las células tumorales prostáticas.

OBJETIVO 2. Estudiar el papel de Polθ en la progresión de CP y en la supervivencia de las células de CP.

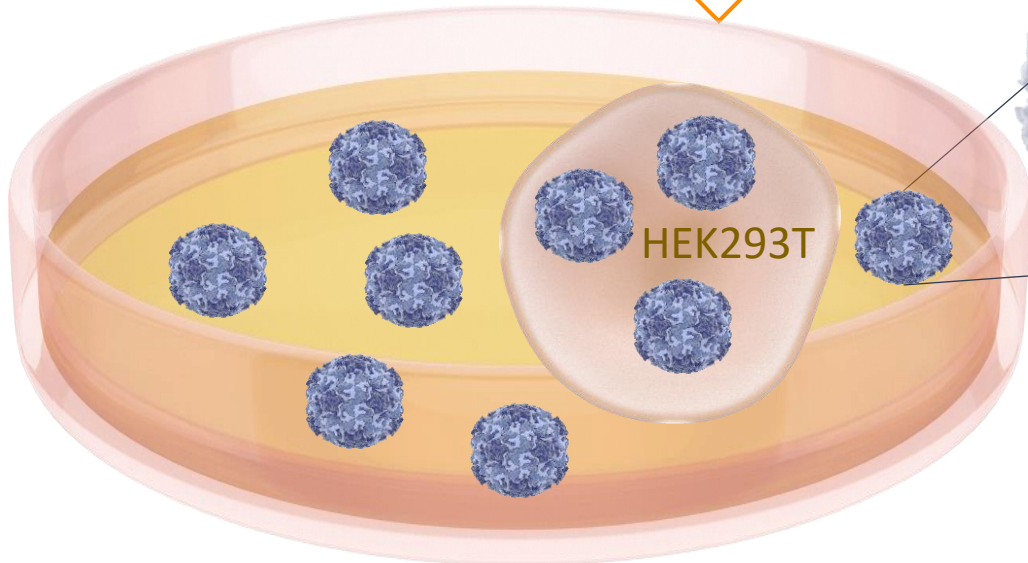
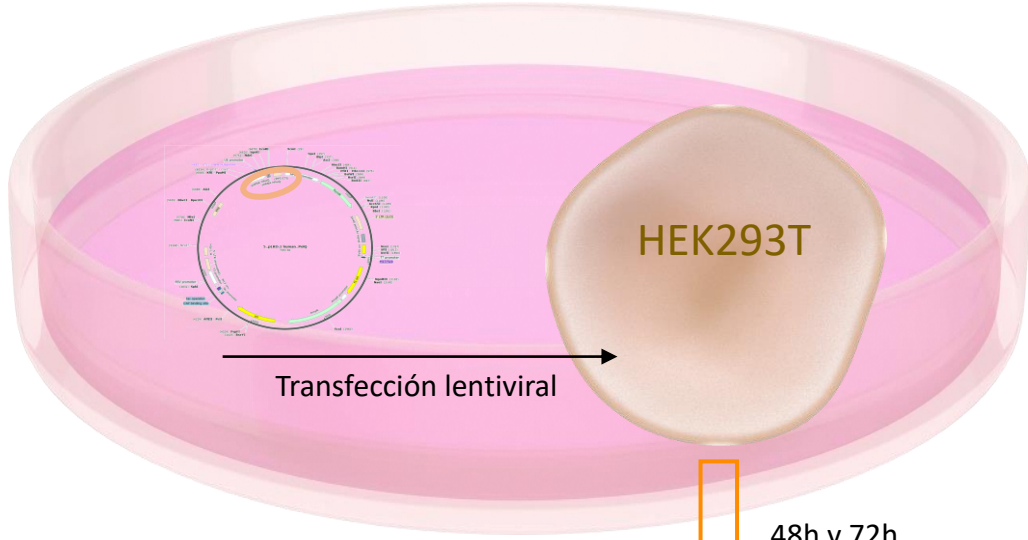
Para estudiar el **papel de Polθ** en la **supervivencia** de las células de CP se realizan ensayos de viabilidad una vez **silenciados los niveles de Polθ** en distintas líneas de CP.

La reducción de los niveles de Polθ se consigue con la introducción de un **shRNA-Polθ** mediante 6 infecciones lentivirales a intervalos de 2 horas usando sobrenadantes de células HEK-293T previamente transfectadas para la producción de dichos lentivirus. La infección paralela con **pLKO.1, shRNA control**, se utiliza como control negativo.

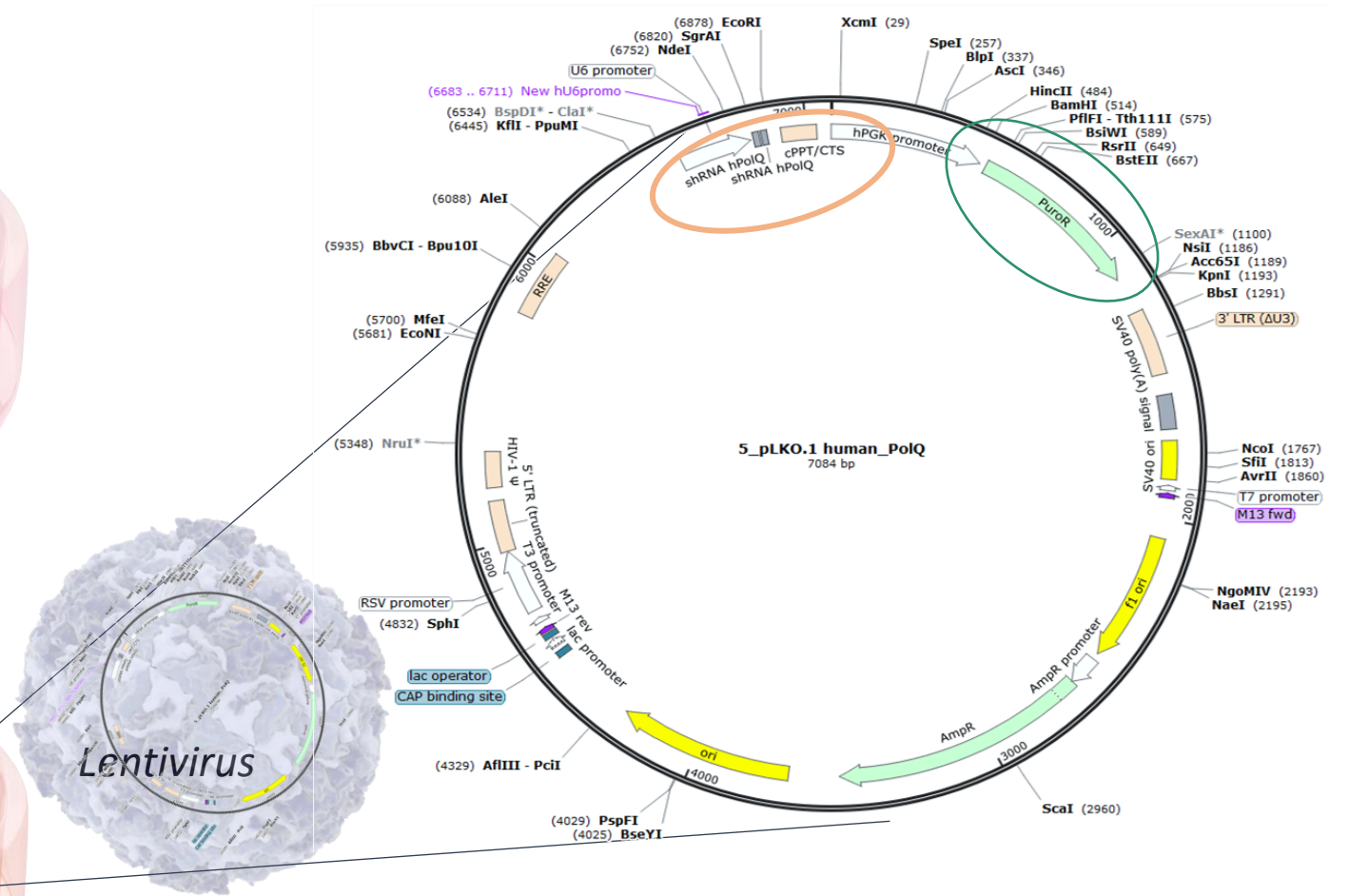
Posteriormente, las células de CP infectadas se seleccionan con puromicina durante 3 días. Por último, 7 días después de ser seleccionadas, se evalúa su viabilidad mediante un ensayo MTT y 14 días post-selección mediante un ensayo de formación de colonias.



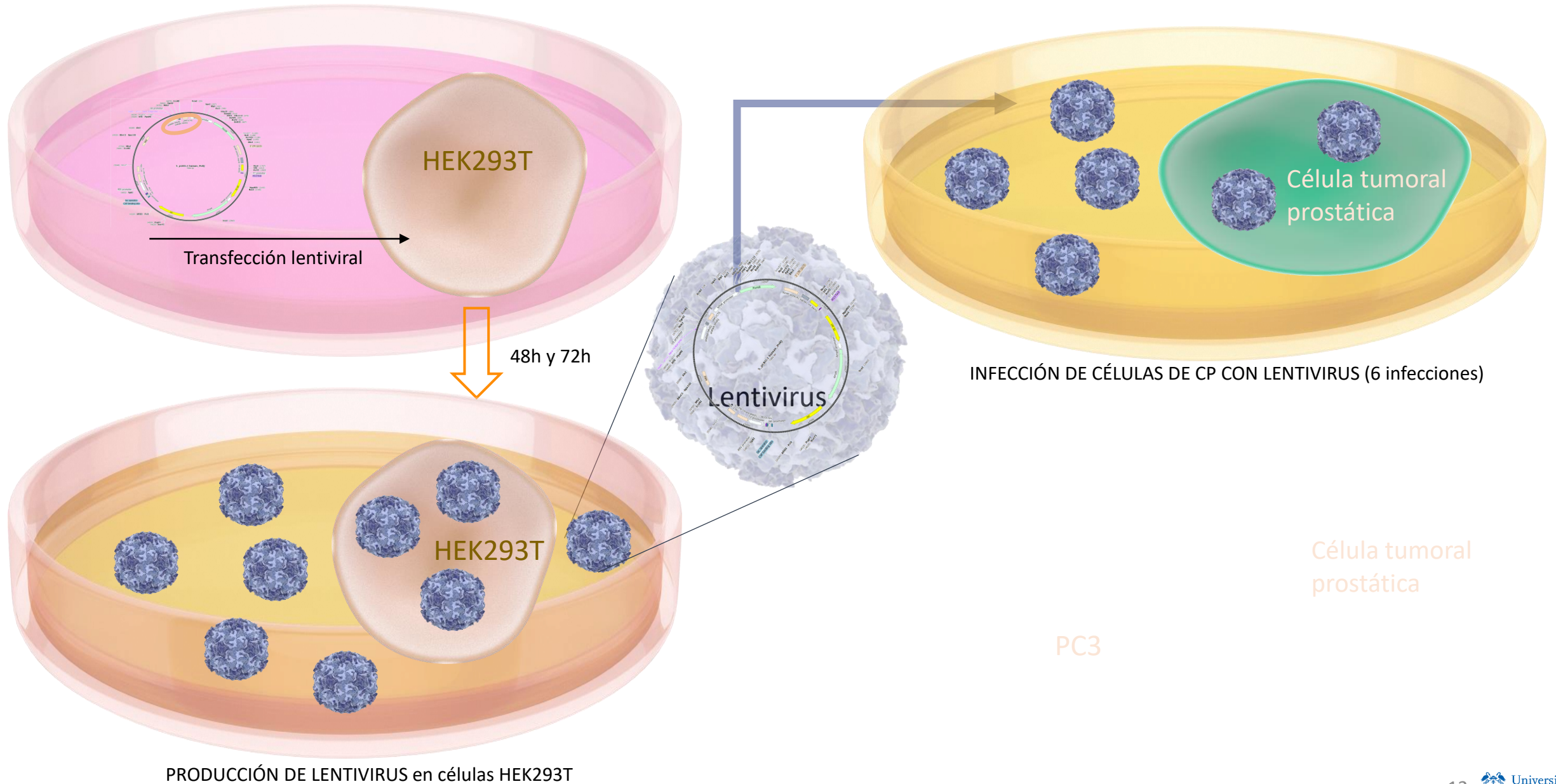
OBJETIVO 2. Estudiar el papel de Polθ en la progresión de CP y en la supervivencia de las células de CP.



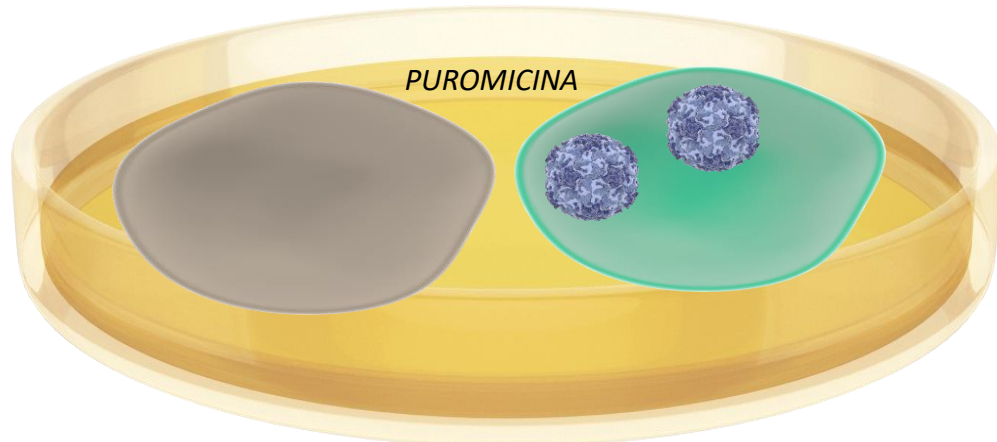
PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS en células HEK293T



OBJETIVO 2. Estudiar el papel de Polθ en la progresión de CP y en la supervivencia de las células de CP.

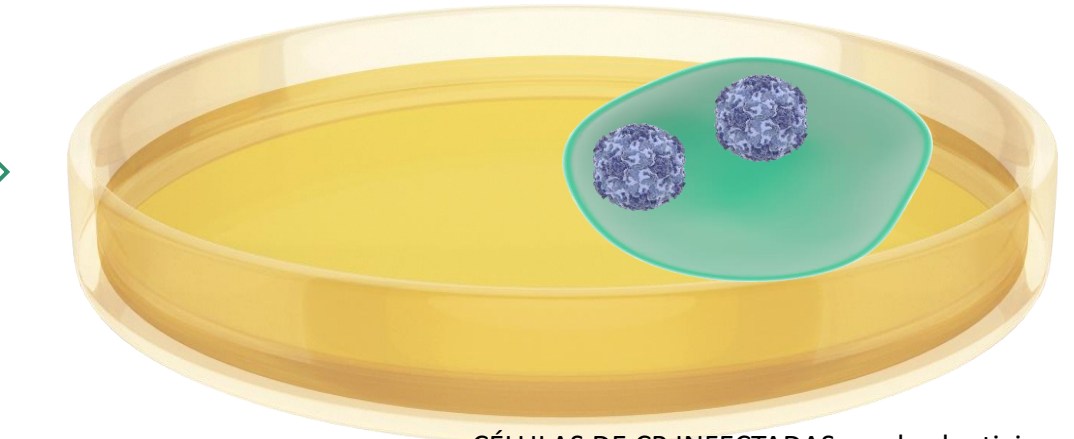


OBJETIVO 2. Estudiar el papel de Polθ en la progresión de CP y en la supervivencia de las células de CP.



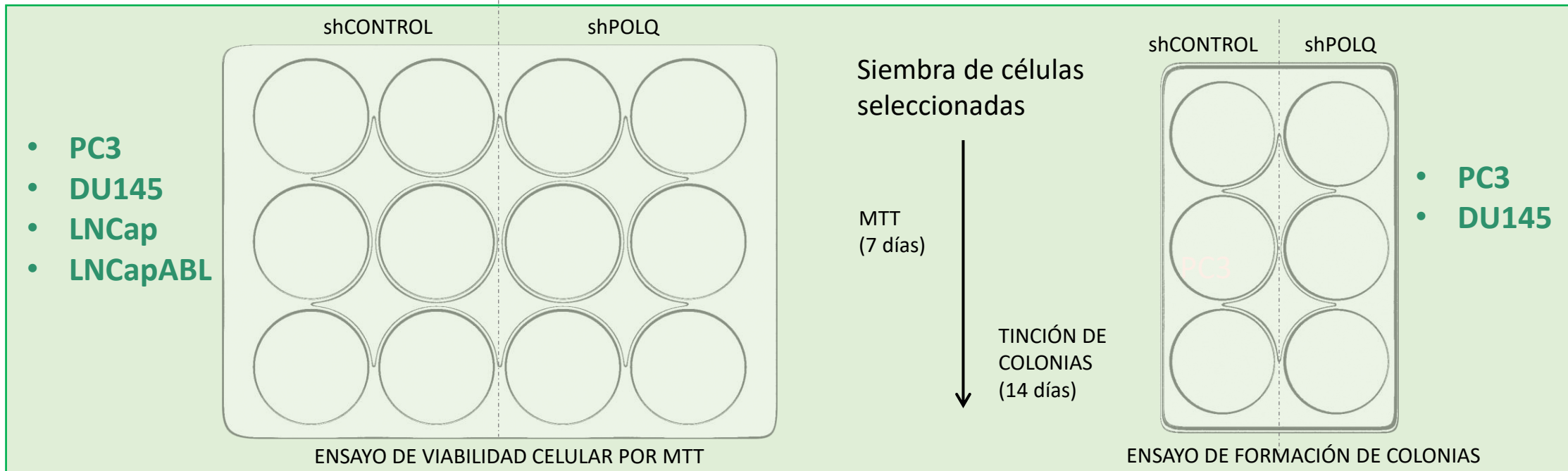
SELECCIÓN DE LAS CÉLULAS DE CP INFECTADAS CON PUROMICINA (3 días)

3 días
→



CÉLULAS DE CP INFECTADAS con los lentivirus

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR



OBJETIVO 2. Estudiar el papel de Pol θ en la progresión de CP y en la supervivencia de las células de CP.

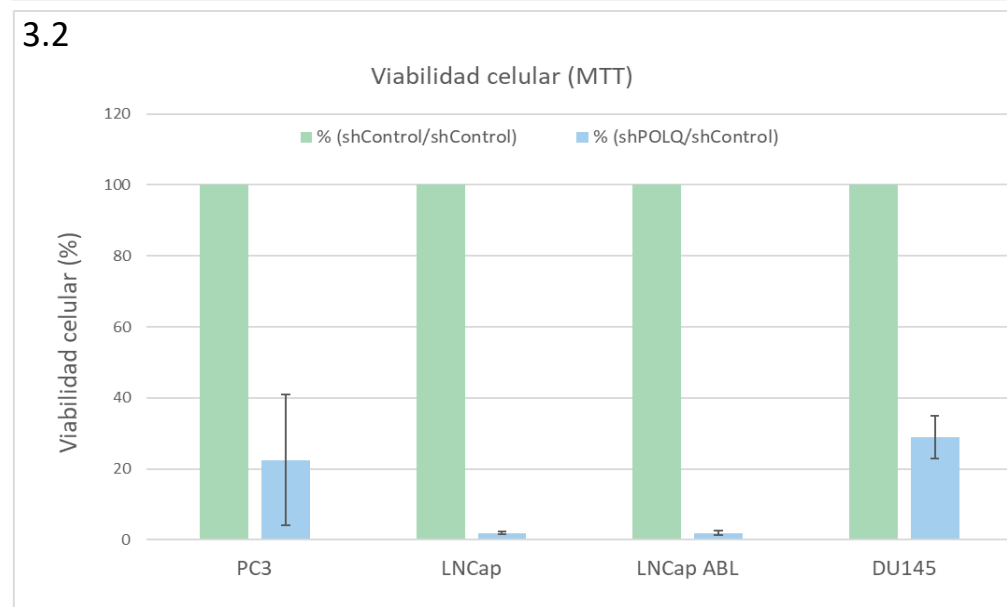
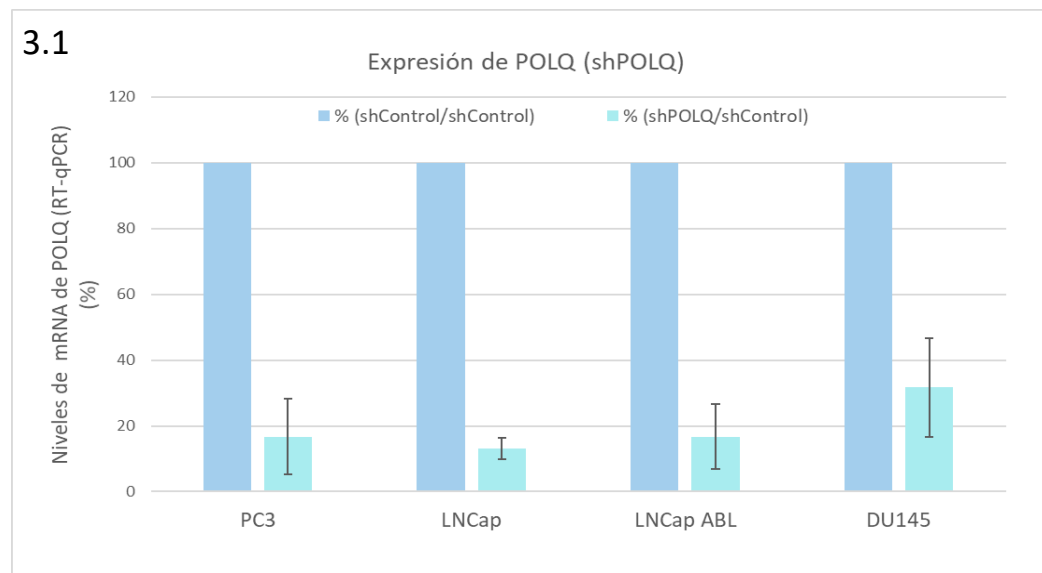
Efecto del silenciamiento de POLQ en la viabilidad celular de líneas celulares de CP.

Figura 3. Determinar el impacto del silenciamiento de Pol θ en la viabilidad de las líneas celulares de CP.

3.1 La expresión de *POLQ* se cuantifica mediante qRT-PCR usando β -actina como control interno. Se muestran los niveles de RNAm de *POLQ* en líneas celulares de CP tras la infección con un shRNA-POLQ y un shRNA control.

3.2 La supervivencia celular se evalúa mediante el ensayo de viabilidad celular (MTT) 7 días después de ser infectadas con los shRNA-POLQ comparado con el shRNA control. Las barras del gráfico representan la media de 3 experimentos y las barras de error la desviación estándar de los mismos.

Los resultados del MTT indican que las diversas líneas celulares de CP, y en especial, las células LNCap y LNCap ABL, requieren Pol θ para su supervivencia, sugiriendo que esta polimerasa podría tener un papel importante en la biología de las células tumorales de próstata.



OBJETIVO 2. Estudiar el papel de Pol θ en la progresión de CP y en la supervivencia de las células de CP.

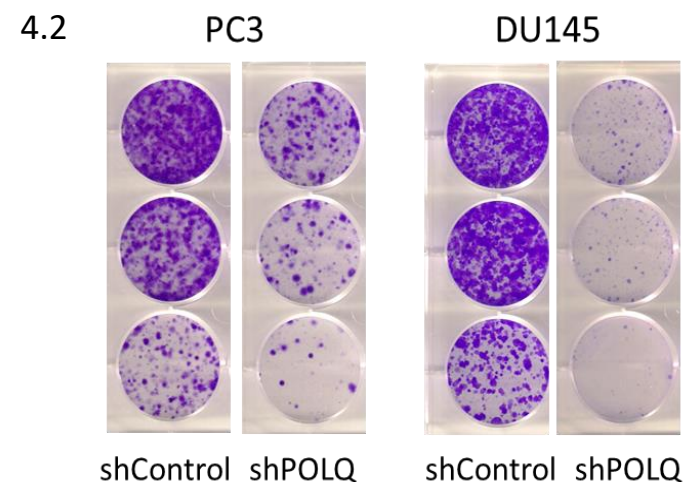
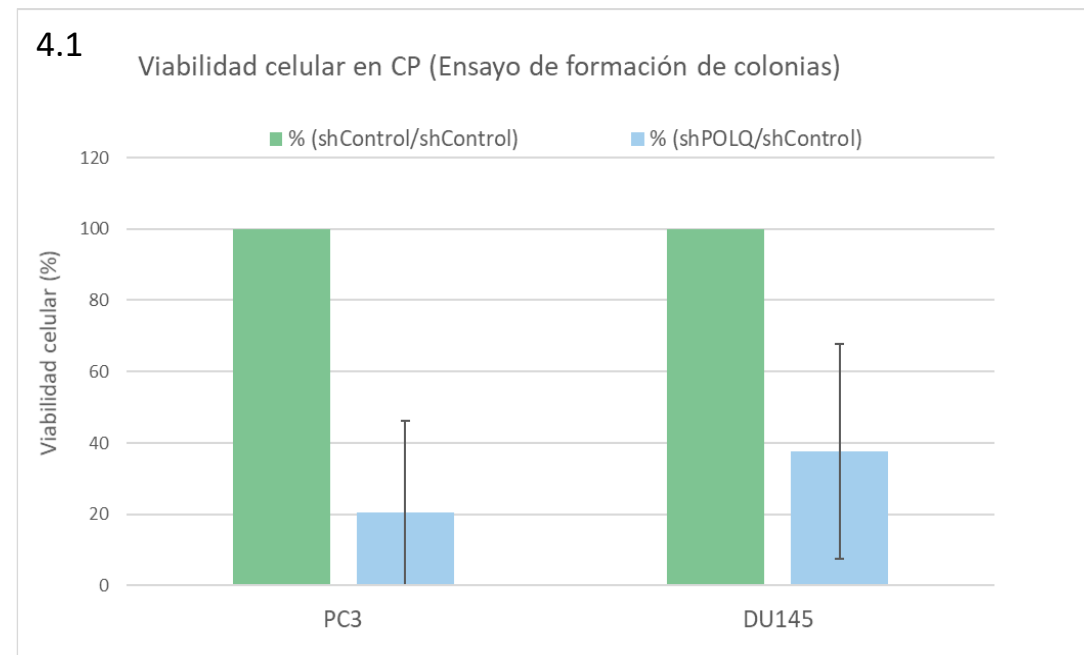
Efecto del silenciamiento de los niveles de POLQ sobre el crecimiento tumoral en líneas celulares de CP.

Figura 4. La depleción de Pol θ reduce la capacidad de formar colonias en las células PC3 y DU145.

4.1 La expresión de POLQ se cuantifica mediante qRT-PCR usando β -actina como control interno. Se muestran los niveles de RNAm de POLQ en líneas celulares de CP tras la infección con un shRNA-POLQ y un shRNA control.

4.2 La supervivencia celular se evalúa mediante un ensayo de formación de colonias 14 días después de ser infectadas con un shRNA-Pol θ y un shRNA control. Las barras del gráfico representan la media de 3 experimentos y las barras de error la desviación estándar de los mismos.

Los resultados del ensayo de formación de colonias indican que las células PC3 y DU145 necesitan POL θ para crecer y formar colonias, respaldando nuestra hipótesis de la necesidad de esta polimerasa en las células de CP.

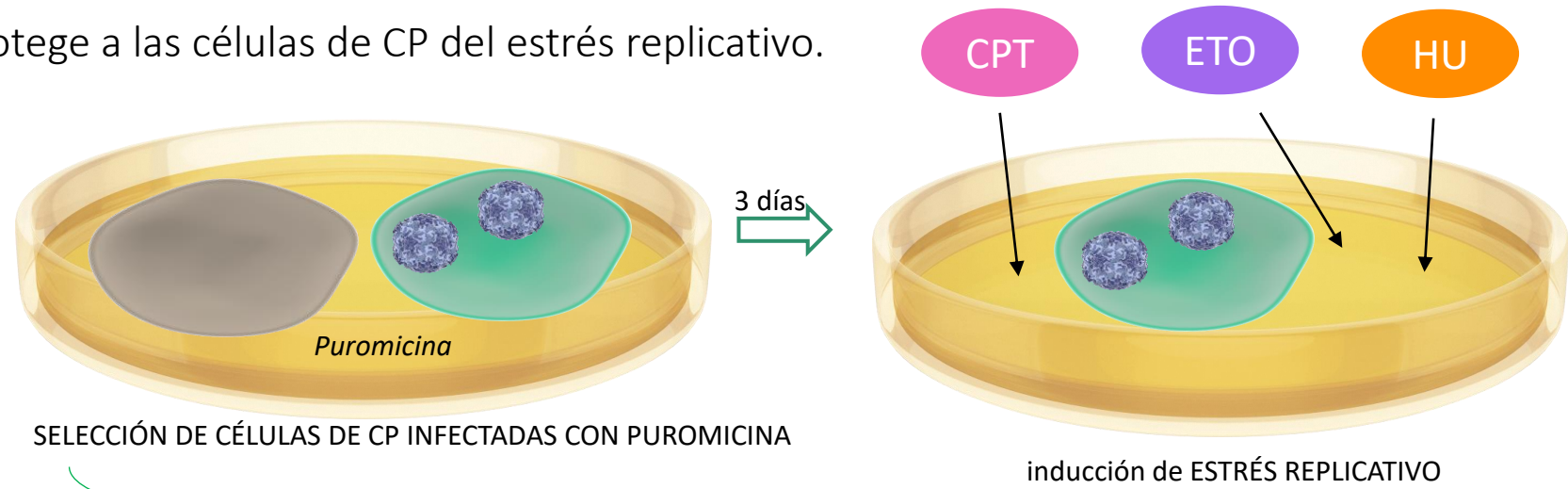


OBJETIVO 3. Determinar si Pol θ protege a las células de CP del estrés replicativo.

La sobreexpresión del **oncogén N-Myc** se ha relacionado con la progresión del mCRPC con fenotipo neuroendocrino, y favorece el **inicio de la replicación y el estrés replicativo**, así como el aumento de la proliferación celular. Recientemente, se ha informado de **que Pol θ media reparaciones atenuando el estrés replicativo** y facilita el reinicio en las horquillas de replicación.

Para **determinar si Pol θ protege a las células de CP del estrés replicativo** proponemos usar las líneas celulares LNCaP y PC3 sometidas a estrés replicativo. Ambas líneas celulares serán infectadas con un **shRNA contra Pol θ** , con el objetivo de agotar los niveles de dicha polimerasa, y se llevará un control en paralelo gracias a infecciones lentivirales con un shRNA control. Posteriormente, **induiremos estrés replicativo** empleando como tratamiento inhibidores de las topoisomeras I y II, **Camptotecina (CPT) y Etopósido (ETO)** respectivamente, así como un inhibidor de la ribonucleótido-reductasa, **Hidroxiurea (HU)** a distintas dosis, puestas a punto en función de la línea celular de CP. Analizaremos la supervivencia con un **ensayo colorimétrico (MTT)** tras la exposición a dichos tratamientos, comparando el efecto del agotamiento de Pol θ .

OBJETIVO 3. Determinar si Polθ protege a las células de CP del estrés replicativo.



SELECCIÓN DE CÉLULAS DE CP INFECTADAS CON PUROMICINA

inducción de ESTRÉS REPLICATIVO

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

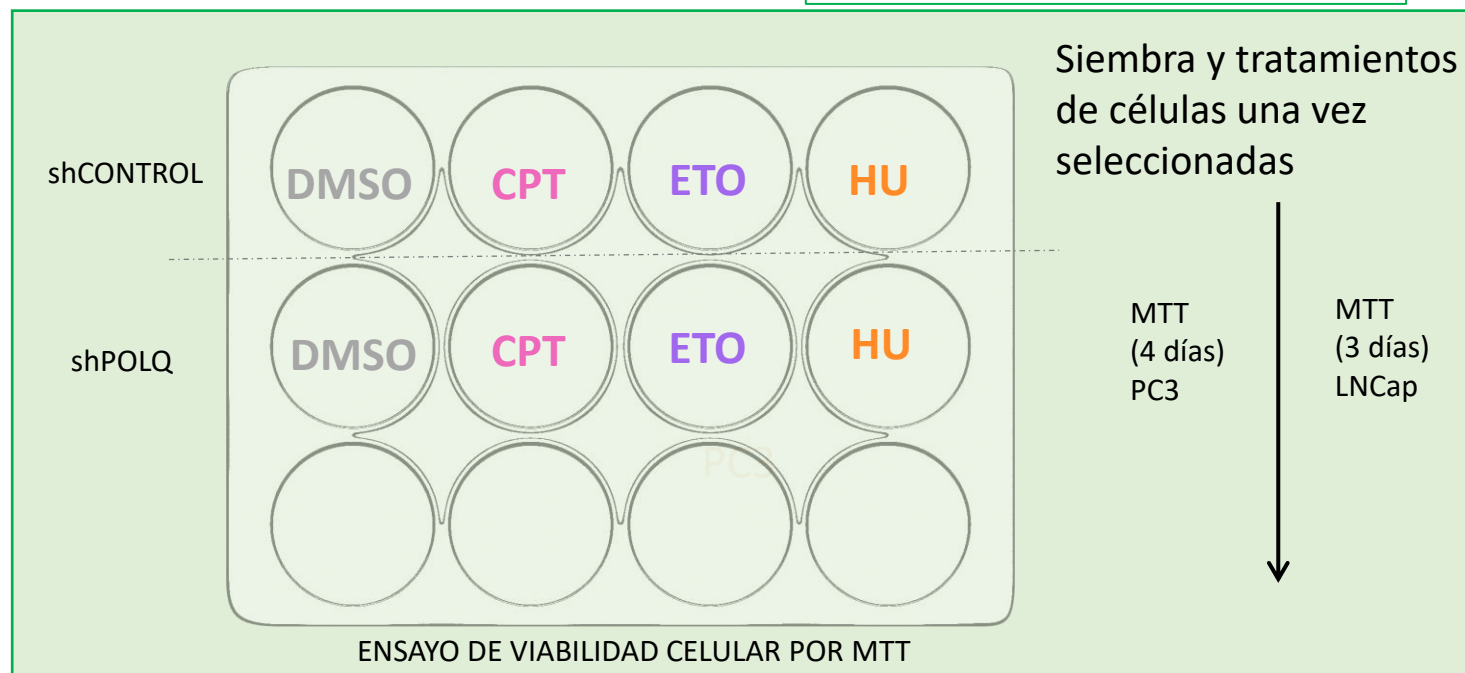
CAMPTOTECINA (CPT): Inhibidor de la top I

ETOPÓSIDO (ETO): Inhibidor de la top II

→ Su mecanismo de acción se basa en estabilizar la unión de Top y el ADN, evitando la religación de las hebras rotas de DNA.

HIDROXIUREA (HU): Inhibidor de la ribonucleótido-reductasa.

→ Entorpece el proceso de replicación ya que hace que se agoten los deoxiribonucleótidos.



OBJETIVO 3. Determinar si Pol θ protege a las células de CP del estrés replicativo.

Efecto del silenciamiento de POLQ en la viabilidad de células PC3 sometidas a estrés replicativo

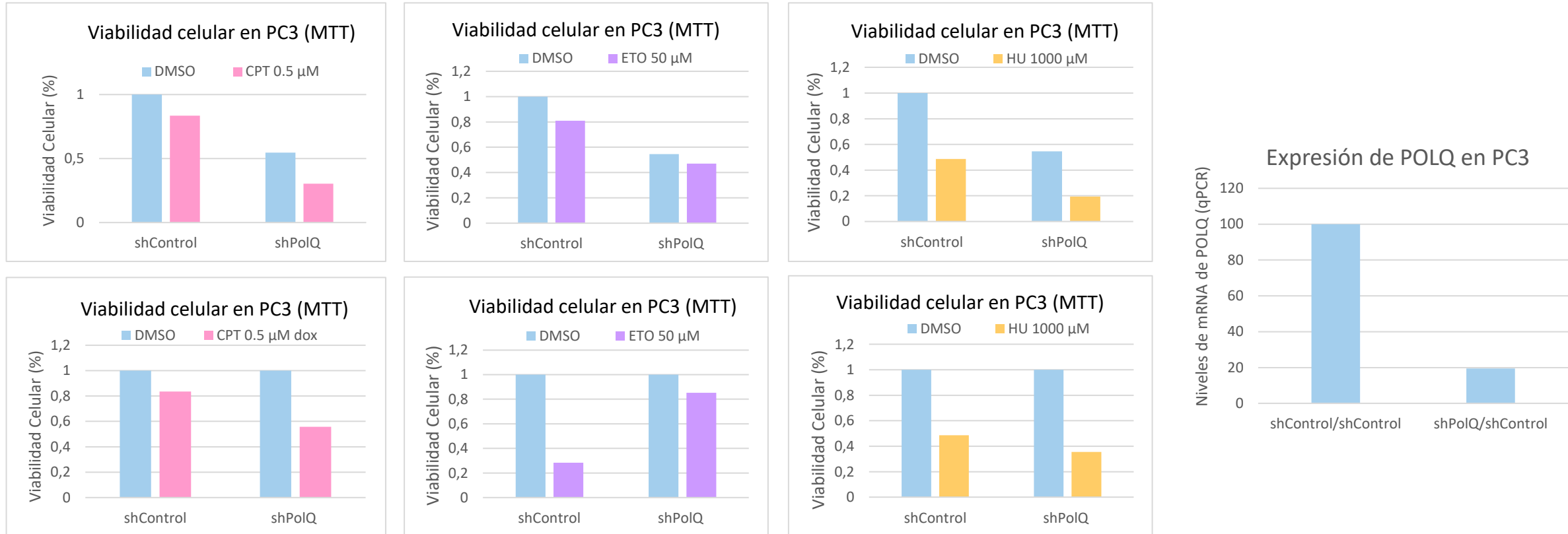


Figura 5. La depleción de Pol θ potencia el efecto tóxico de diferentes tratamientos causantes de estrés replicativo en las células PC3. La supervivencia celular se evalúa mediante un ensayo de MTT a los 4 días de los tratamientos con Camptotecina 0,50 μ M, Etopósido 50 μ M e Hidroxiurea 1000 μ M, usando DMSO como control negativo. El silenciamiento de los niveles de Pol θ se realiza con la introducción de un shRNA-Pol θ y un shControl y se cuantifica mediante qRT-PCR usando como control interno RPLPO.

OBJETIVO 3. Determinar si Pol θ protege a las células de CP del estrés replicativo.

Efecto del silenciamiento de POLQ en la viabilidad de células **LNCap** sometidas a estrés replicativo

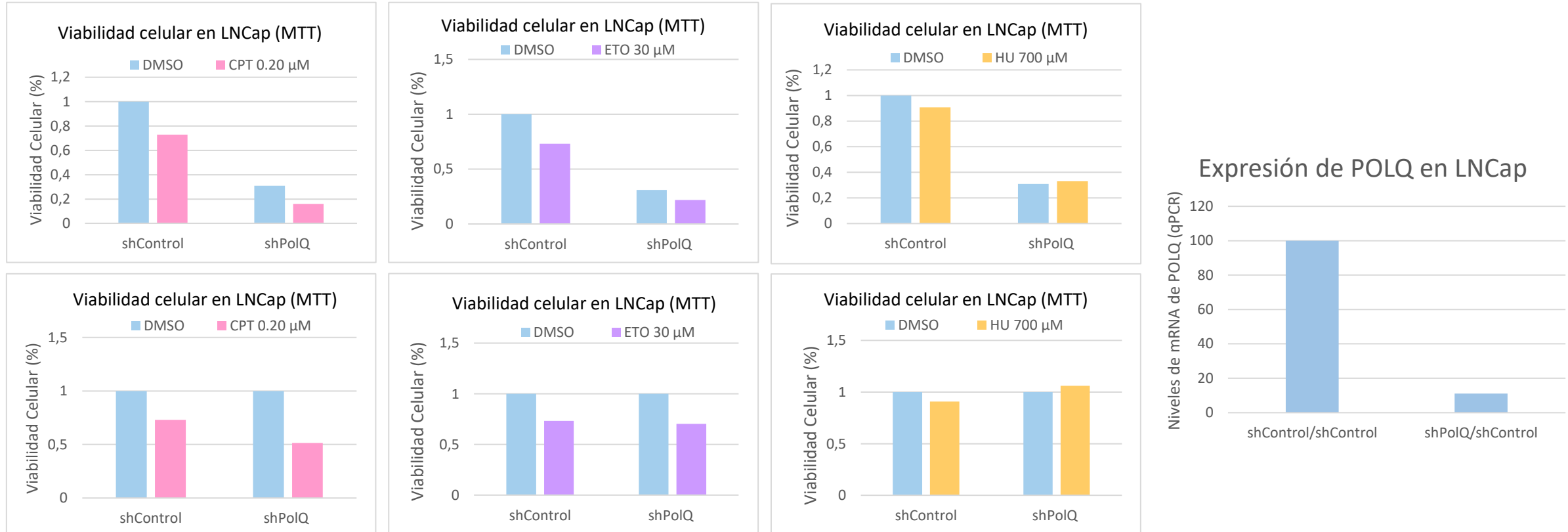


Figura 6. La depleción de Pol θ potencia el efecto tóxico de diferentes tratamientos causantes de estrés replicativo en las células LNCap. La supervivencia celular se evalúa mediante un ensayo de MTT a los 3 días de los tratamientos con Camptotecina 0,20 μ M, Etopósido 30 μ M e Hidroxiurea 700 μ M usando DMSO como control negativo. El silenciamiento de los niveles de Pol θ se realiza con la introducción de un shRNA-Pol θ y un shControl y se cuantifica mediante qRT-PCR usando como control interno RPLPO.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que las **células tumorales de próstata requieren Pol θ para la supervivencia**. Esto advierte un papel de esta DNA polimerasa en la biología de las células de próstata, aunque no es muy relevante para combatir el estrés replicativo, sugiriendo que su rol podría estar relacionado con la reparación de roturas del DNA como induce la inhibición de la topoisomerasa I.

De este modo, la **inhibición de Pol θ podría ser útil en el tratamiento del CP**.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Determinar el **potencial terapéutico de Pol θ *in vivo*** y su impacto en los tratamientos de tumores derivados de muestras de pacientes.

¡Muchas gracias por su atención!

