

# Determinación del papel de la DNA polimerasa Theta en la viabilidad de las células de cáncer de próstata

**Autor:** María Couto Muga

**Tutor:** Pedro A. Mateos Gómez

**Trabajo de Fin de Grado (Biología)**

**Departamento de Biología de Sistemas**

# INDICE

## **1. Introducción.**

- Rotura de doble cadena de DNA (DSBs)
- Mecanismos de reparación de DSBs
- Cáncer de próstata

## **2. Hipótesis del trabajo.**

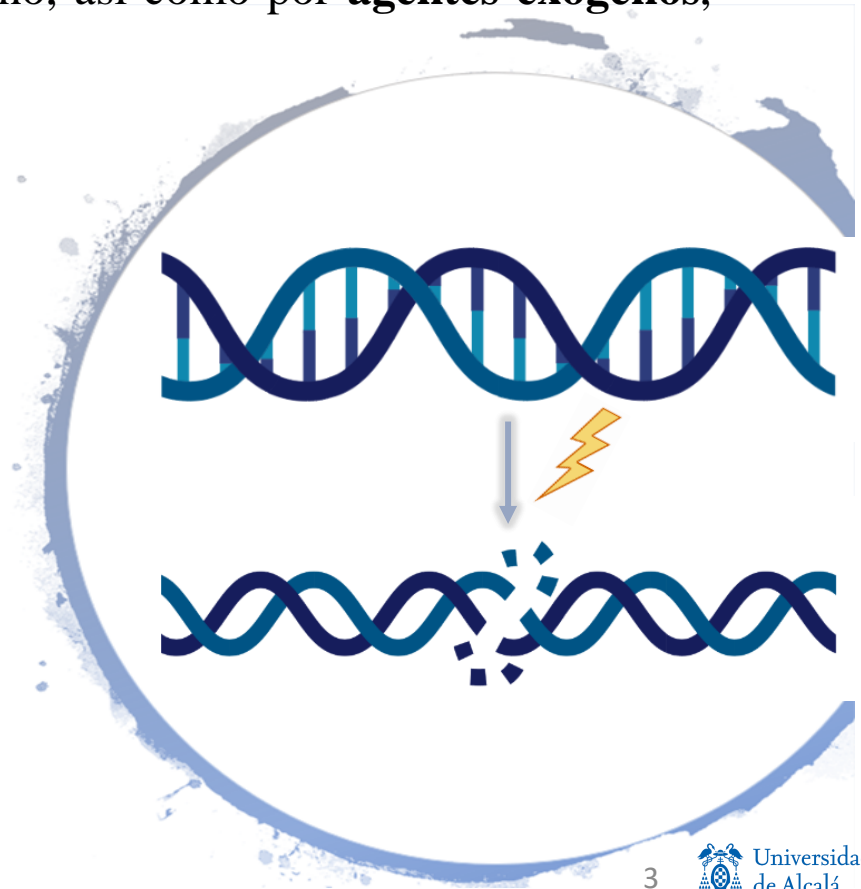
## **3. Objetivos y resultados.**

## **4. Futuro plan de investigación.**

# Roturas de doble cadena del DNA (DSBs)

Las **roturas de doble cadena del DNA (DSB)** pueden producirse tanto por **fuentes endógenas**, como los errores de replicación, procesos enzimáticos o especies reactivas de oxígeno, así como por **agentes exógenos**, tales como agentes quimioterapéuticos o la radiación ionizante.

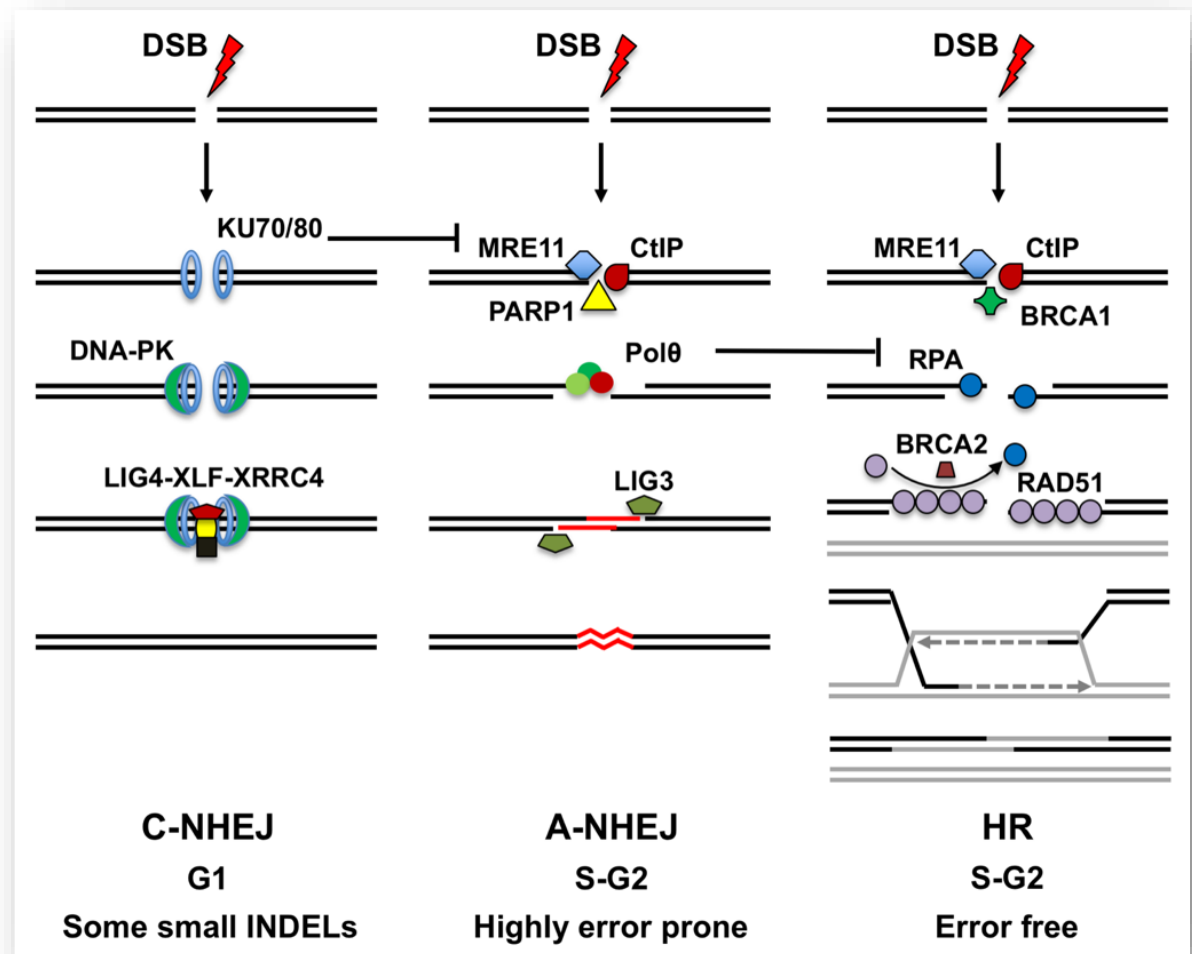
Estas roturas de doble cadena se consideran una de las **lesiones** deletéreas más severas que se producen en el DNA, provocando que la **información genética** y la **supervivencia celular** se vean gravemente comprometidas. Si estos daños no se reparan, se puede dar lugar a la muerte celular pero, si la reparación que se produce no se da correctamente, puede provocar la inducción tanto de reordenamientos cromosómicos como de mutaciones, los cuales se identifican como dos de los acontecimientos más comunes en el desarrollo de la oncogénesis y otras enfermedades genéticas.



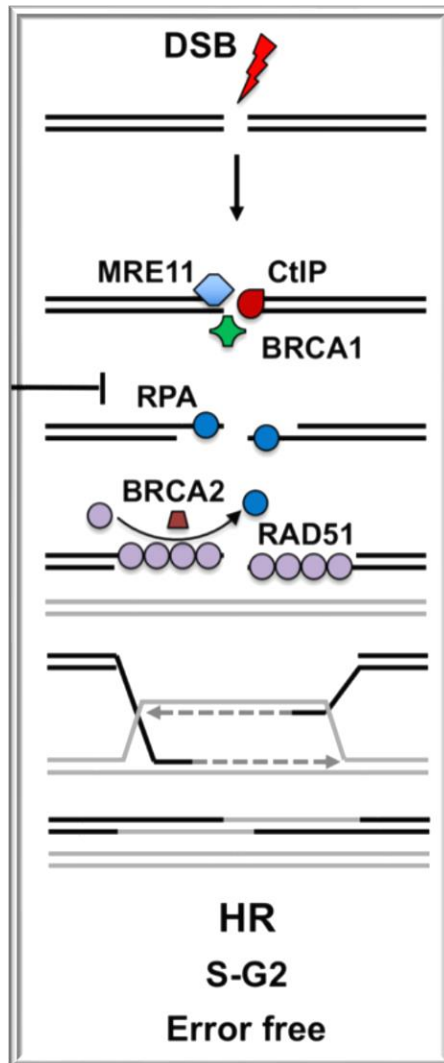
# Mecanismos de reparación de DSBs

Las células disponen de varios mecanismos de reparación para solventar este tipo de daño en el DNA, intentando mantener la integridad del genoma y la información genética.

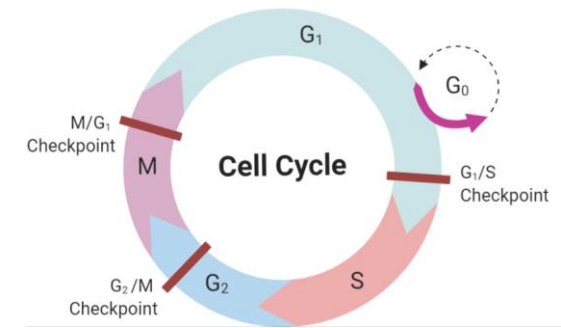
Las dos vías principales que encontramos son la **Recombinación Homóloga (HR)** y la **Unión de extremos no homólogos clásica (C-NHEJ)** y, recientemente, se ha descrito un tercer mecanismo denominado **Unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ)**. En este trabajo nos centraremos en la HR y la A-NHEJ, los cuales son activos en las mismas fases del ciclo celular.



Fuente: Mateos-Gomez, P. A., Kent, T., Deng, S. K., McDevitt, S., Kashkina, E., Hoang, T. M., ... & Sfeir, A. (2017). The helicase domain of Polθ counteracts RPA to promote alt-NHEJ. *Nature structural & molecular biology*, 24(12), 1116.



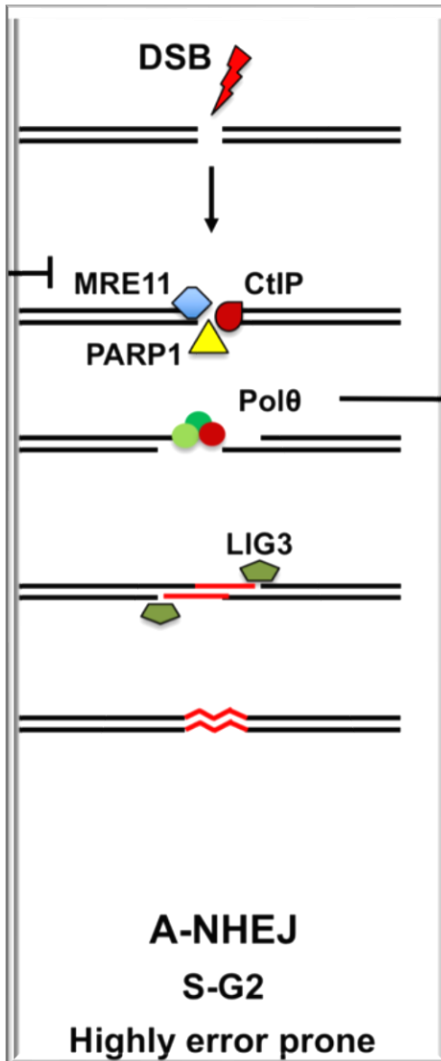
## Recombinación homóloga (HR)



Las células utilizan este mecanismo durante las **fases S y G<sub>2</sub>**, en las que o se replica el DNA o ya está replicado. Es un mecanismo libre de errores de reparación ya que utiliza como molde una secuencia homóloga intacta, generalmente la **cromátida hermana**.

Primeramente se produce una **resección** de los extremos de la rotura en dirección 5' – 3' debido a la intervención de la actividad endonucleolítica del complejo **MRN** (MRE11-RAD50-NBS1) y de la proteína **CtIP**, ayudados además de **BRCA1**, de tal forma que se expone DNA de cadena sencilla, en el cual actuarán posteriormente las proteínas EXO1, DNA2 y BLM. El DNA de cadena sencilla es estabilizado por la proteína **RPA** (Replication Protein A) que, posteriormente, es desplazada por **RAD51** por la acción de **BRCA2**. RAD51 promueve la invasión de la cromátida hermana molde formando una estructura de bucle (D-loop), de donde se copia la secuencia dañada.

## Unión de extremos no homólogos (A-NHEJ)



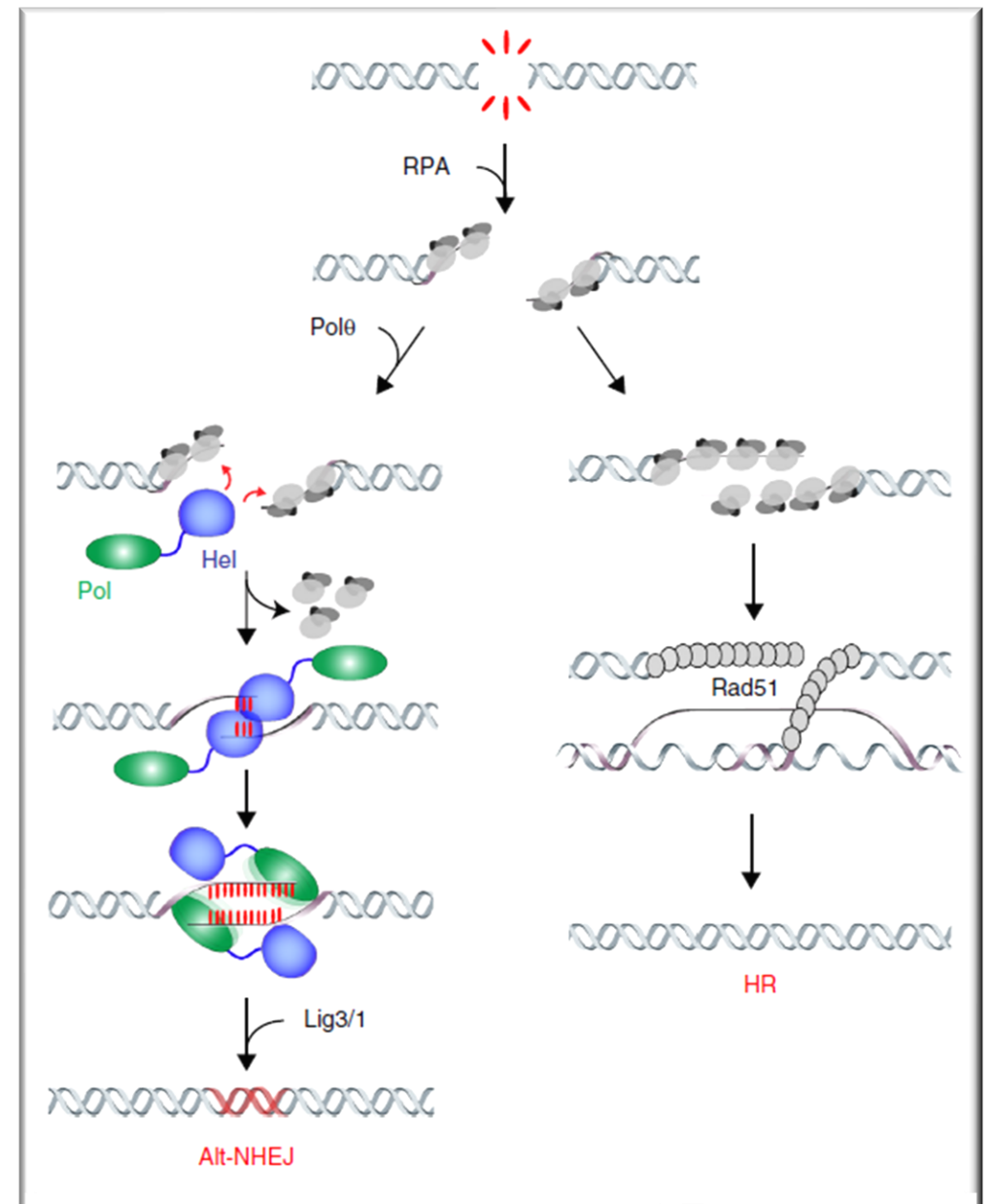
Este mecanismo es utilizado durante la **fase S** y **G2** y en muchos casos implica el anillamiento de **microhomologías**, secuencias repetidas de 1-10 pares de bases que se encuentran a ambos lados de la rotura de doble cadena.

El proceso también comienza con la **resección** por la acción del complejo **MRN** y la proteína **CtIP** pero, adicionalmente, encontramos la participación de la proteína **PARP-1**, la **DNA ligasa 3** y la **polimerasa POL $\theta$** , codificada por el gen *POLQ*. En este caso, el DNA de cadena sencilla no es estabilizado por la proteína RPA, con la que compite la acción de POL $\theta$ .

La polimerasa POL $\theta$  se encuentra regulada positivamente en algunos **cánceres** como el cáncer de pulmón, ovario, próstata, mama o colon, y ha sido descrita en estudios recientes como una diana terapéutica de gran potencial. Esta expresión aumentada ha sido asociada a un peor pronóstico de los pacientes. Sin embargo, POL $\theta$  se considera una polimerasa de **baja fidelidad** y este mecanismo presenta una **alta tasa mutagénica** de modo que favorece la aparición de inserciones, deleciones, etc. comprometiendo la integridad del genoma.

Estudios recientes indican que la vía alternativa actúa incluso cuando el resto de mecanismos son funcionales. Sin embargo, esta vía adquiere suma importancia cuando la HR y la Unión de extremos no homólogos clásica están dañadas, de tal forma que las células adquieren una gran **dependencia** por la A-NHEJ para su supervivencia. Por lo tanto, la expresión de **POLO** es esencial para la supervivencia y proliferación de células deficientes en la HR, como es el caso de aquellas con ausencia o mutaciones en genes como BRCA1 y BRCA2, asociados a distintos tipos de cáncer.

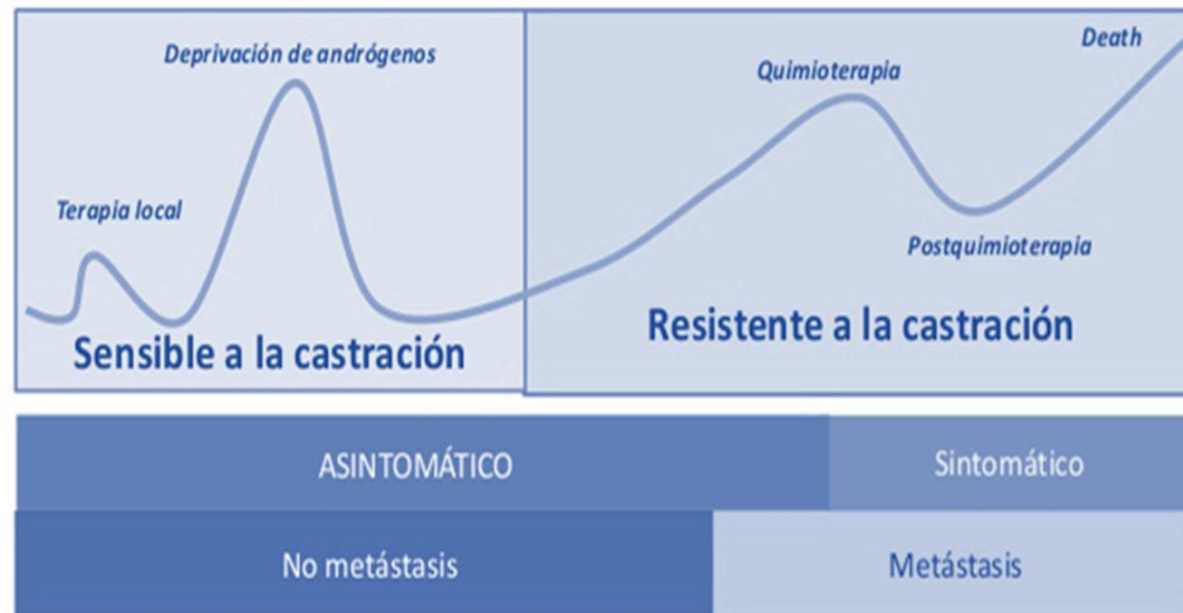
La interacción entre **POLO** y **RPA** determina la elección de la vía de reparación de DSBs debido a su **relación antagonista**. La unión de RPA a los extremos de la región de resección de la rotura bloquea la vía alternativa (alt-NHEJ) y promueve la recombinación homóloga (HR). Por otra parte, la actividad helicasa de **POLO** bloquea la unión de RPA al DNA de cadena sencilla y estimula el anillamiento de los extremos de la rotura.



Fuente: Mateos-Gomez, P. A., Kent, T., Deng, S. K., McDevitt, S., Kashkina, E., Hoang, T. M., ... & Sfeir, A. (2017). The helicase domain of Polθ counteracts RPA to promote alt-NHEJ. *Nature structural & molecular biology*, 24(12), 1116.

# Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (**CP**) se encuentra entre los cinco cánceres con mayor **incidencia** y **mortalidad**, siendo el cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres. Además de su alta incidencia, se caracteriza por tener una gran **heterogeneidad clínica** y ser de lento crecimiento. En su desarrollo destaca la función del **receptor de andrógenos (AR)**, cuya transmisión de señales determina el crecimiento, progresión e infiltración del tumor.



En el **CP localizado**, los tratamientos iniciales son la prostatectomía radical o la radiación mientras que en el localmente avanzado o **metastásico** se da la **castración quirúrgica** o **química** inhibiendo la señalización del AR. Este tratamiento es inicialmente eficiente pero posteriormente se da **recurrencia** de la enfermedad y aparece el estadio de **cáncer de próstata resistente a la castración (mCRPC)**.



## HIPÓTESIS

Los estudios preliminares del laboratorio indican que las líneas celulares de cáncer de próstata dependen de **POL $\theta$**  para su supervivencia, siendo una de las posibles razones que estas células tengan comprometida la recombinación homóloga y que por tanto requieran del mecanismo de reparación A-NHEJ para suplir a la recombinación homóloga.

## OBJETIVOS

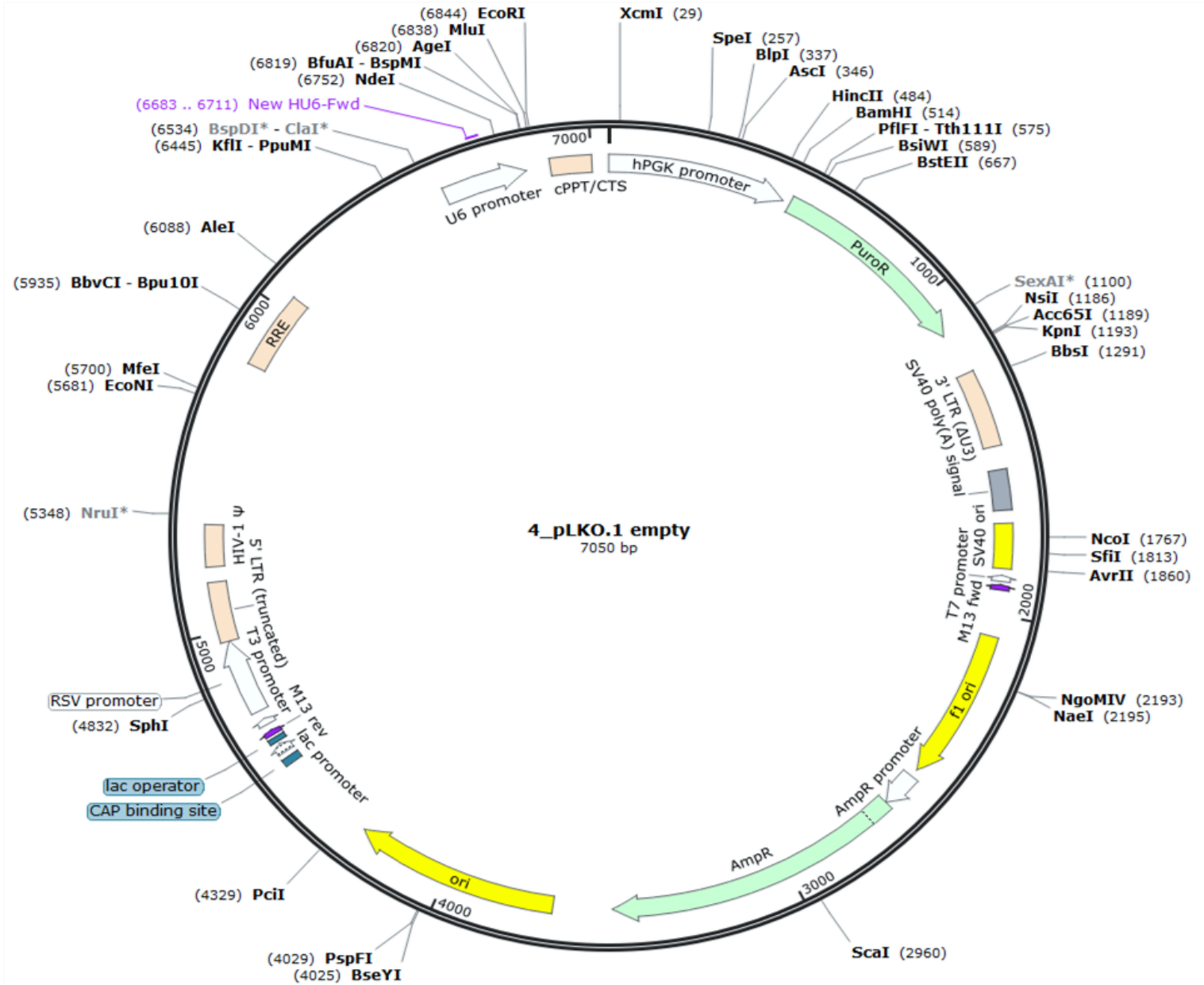
1. Silenciar BRCA1 o BRCA2 en células tumorales de próstata y determinar si su viabilidad celular se ve afectada negativamente, de modo que si fuera así indicaría que nuestra hipótesis es correcta.
2. Comprobar la posible regulación positiva de POL $\theta$  tras la inhibición de la recombinación homóloga.

## OBJETIVO 1

**MÉTODO:** Análisis de viabilidad celular en células tumorales de próstata (PC3 y LNCap) mediante contaje celular tras silenciar los genes de BRCA1 o BRCA2.

El silenciamiento se realizará mediante infecciones lentivirales a intervalos utilizando el sobrenadante de células HEK293T que previamente han sido transfectadas para producir los virus.

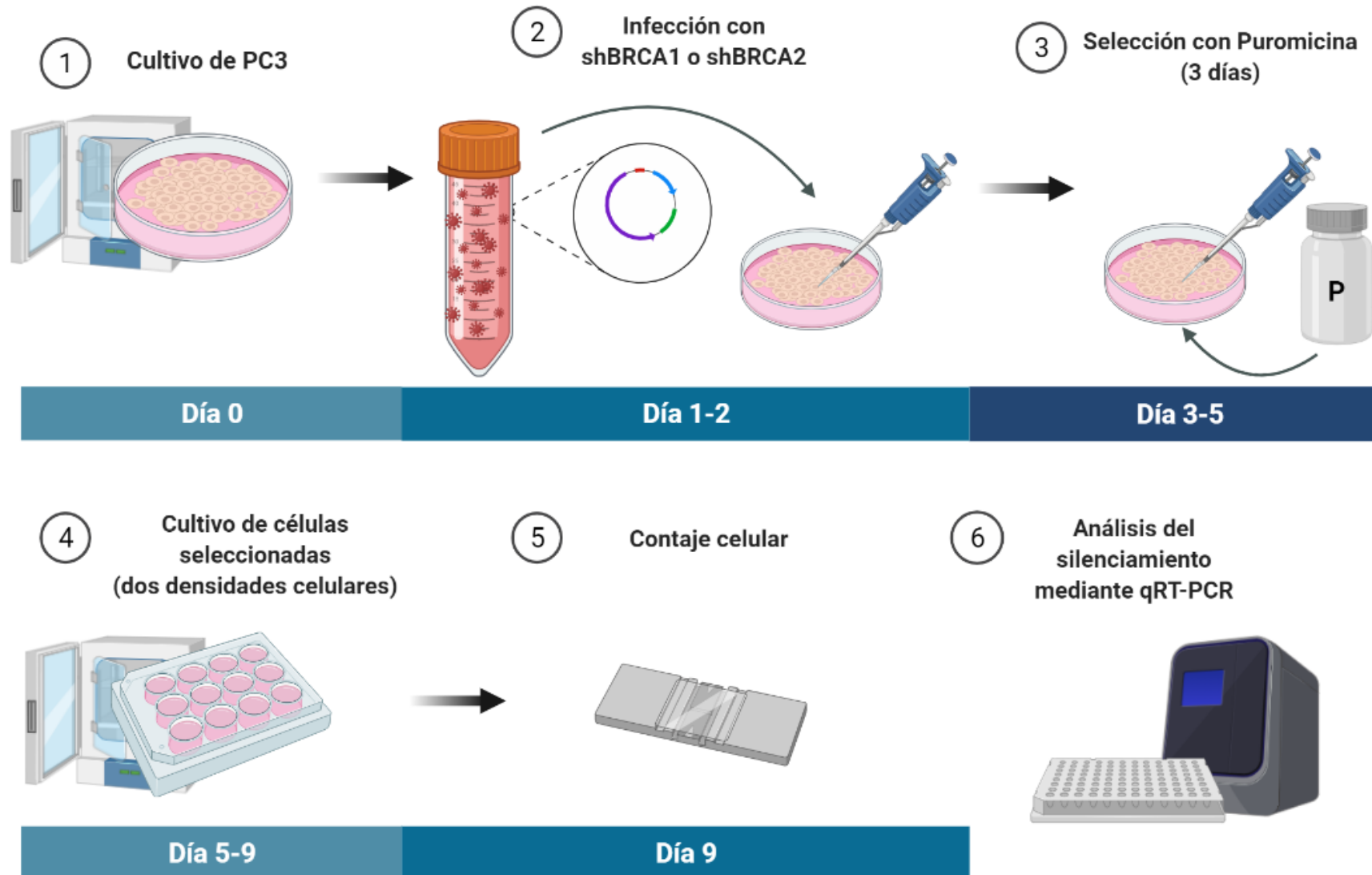
Como control negativo se utilizará pLKO.1 empty (shRNA control).



PC3

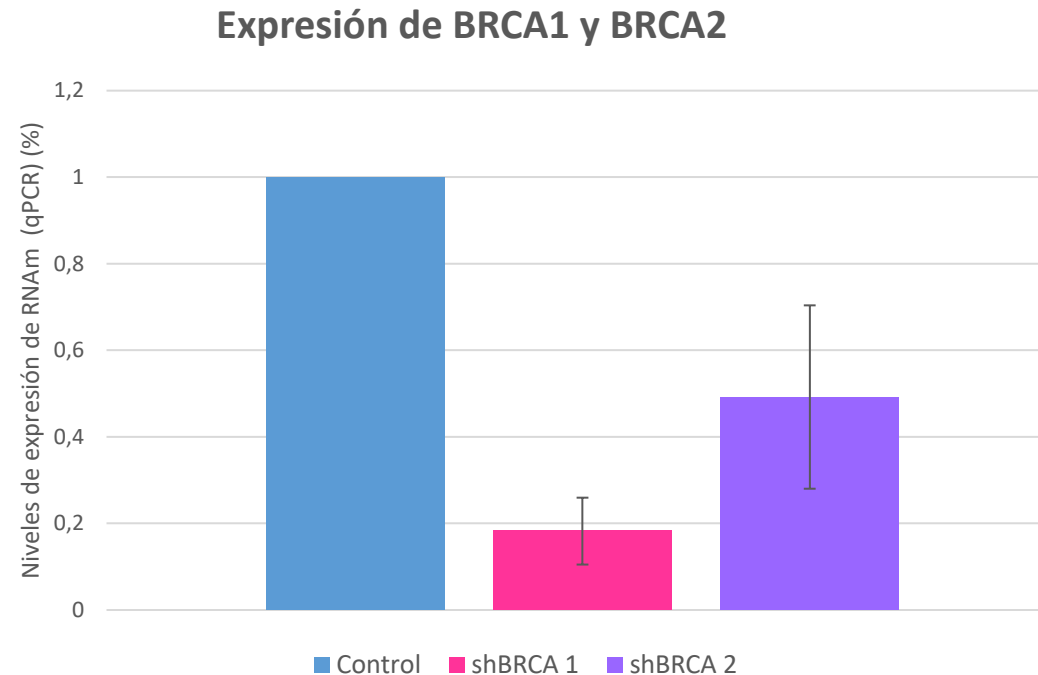
OBJETIVO 1

**MÉTODO:** Análisis de viabilidad celular en células tumorales de próstata (**PC3**) mediante conteo celular tras silenciar los genes de BRCA1 o BRCA2.



PC3

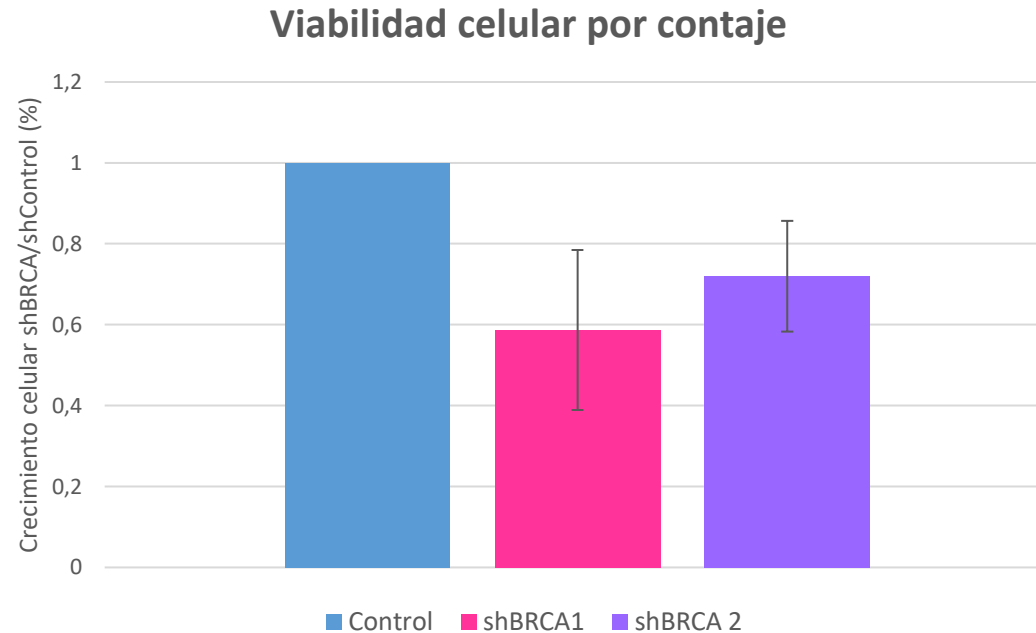
OBJETIVO 1



**Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de BRCA1 y BRCA2 en PC3.** La expresión de los genes se midió mediante RT-qPCR usando como referencia el gen de *RPLPO*. Las barras del gráfico representan la media de seis experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos con respecto al control con valor de 1. Como muestra la gráfica, se ha obtenido una media de silenciamiento del 82% en las células donde se utilizó shBRCA1 y una media de 51% de silenciamiento en las células donde se utilizó shBRCA2.

PC3

OBJETIVO 1

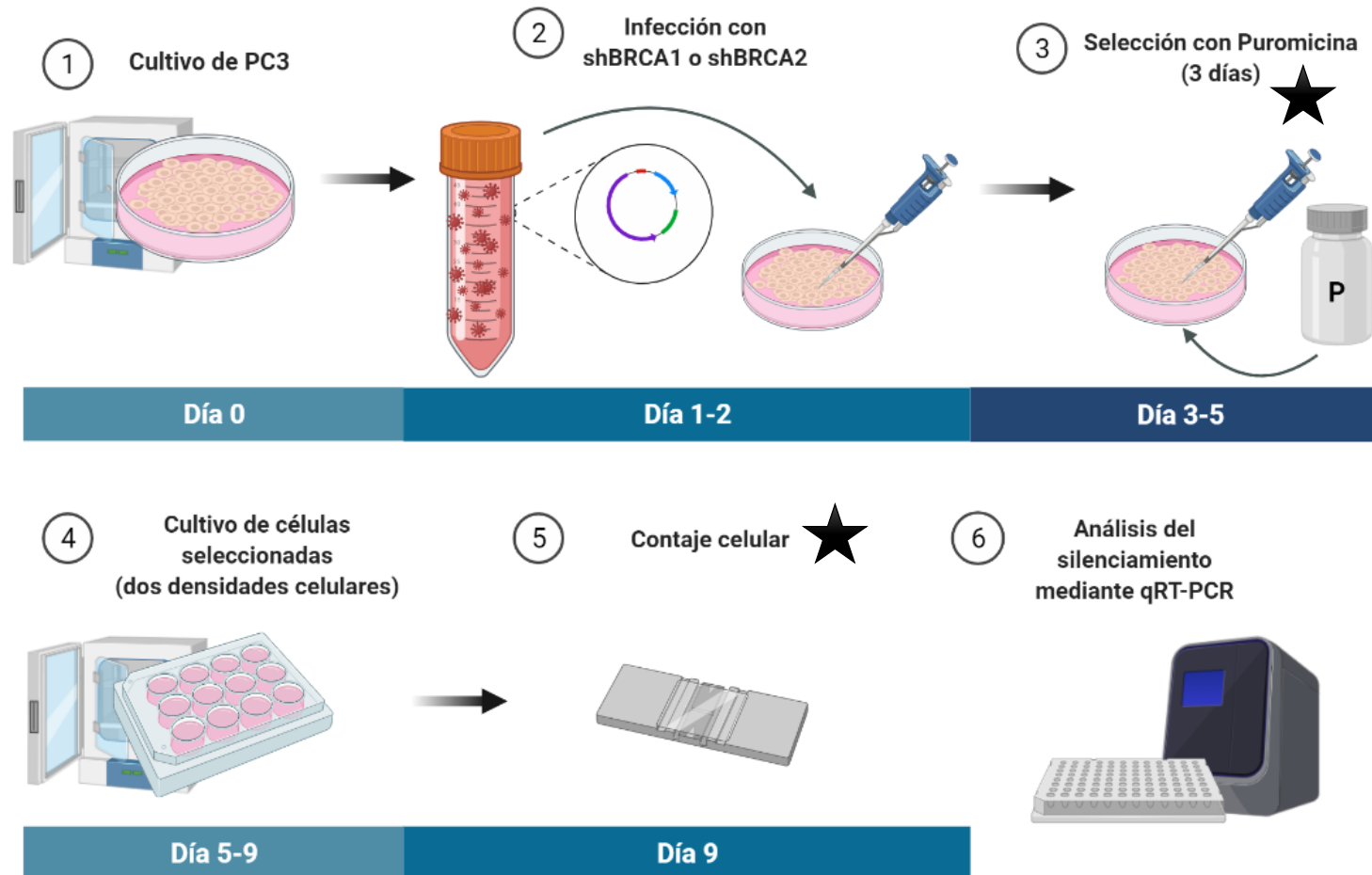


**Cuantificación relativa de la viabilidad celular de las células silenciadas mediante contaje celular.** La viabilidad de las células se mide mediante contaje con la cámara de Neubauer y se compara con el crecimiento del shControl con valor de 1. Las barras del gráfico representan la media de seis experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos. Como muestra la gráfica, la viabilidad disminuye un 40% en las células con shBRCA1 y un 28% en las células con shBRCA.

PC3

OBJETIVO 2

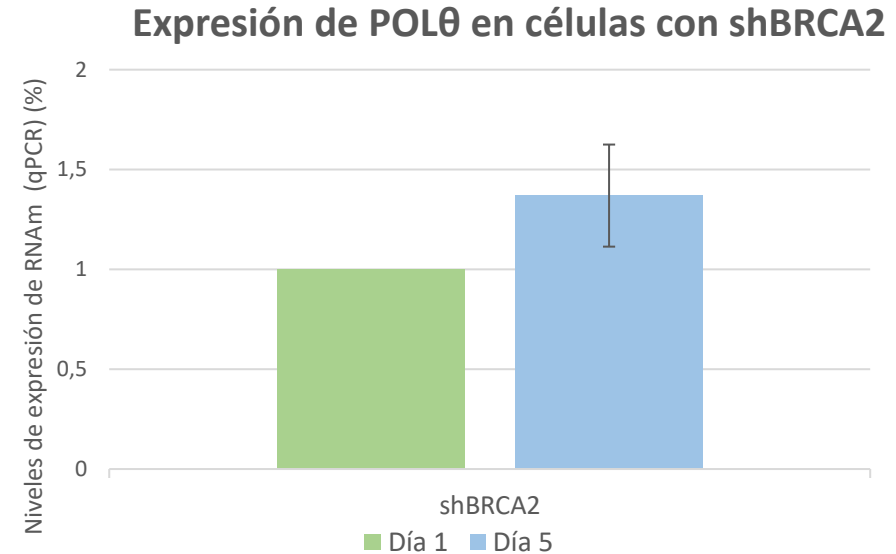
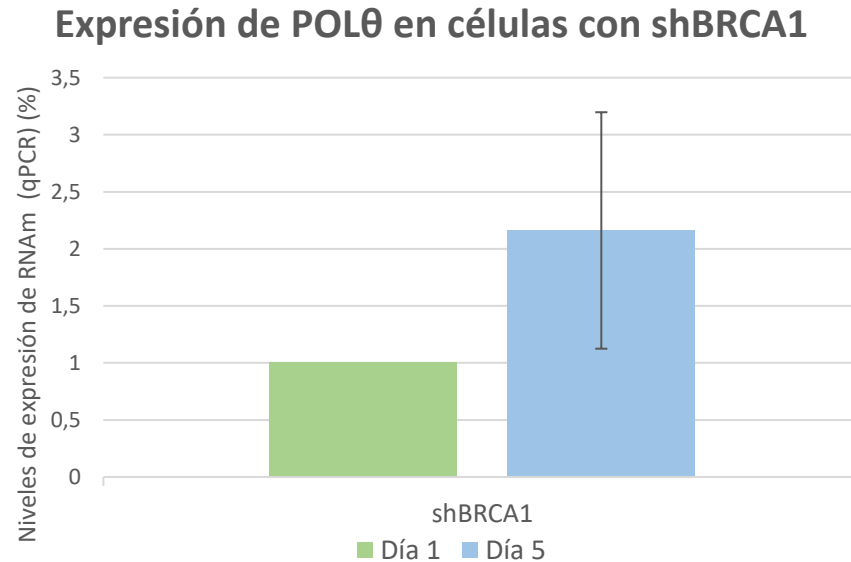
**MÉTODO:** Análisis y comparación de los niveles de expresión de POLθ en **PC3** al finalizar la selección de las células silenciadas con los niveles de expresión tras el cultivo durante cuatro días para el contaje celular.



★ Recogida de muestra para extraer RNA y realizar análisis de niveles de expresión de POLθ mediante qRT-PCR.

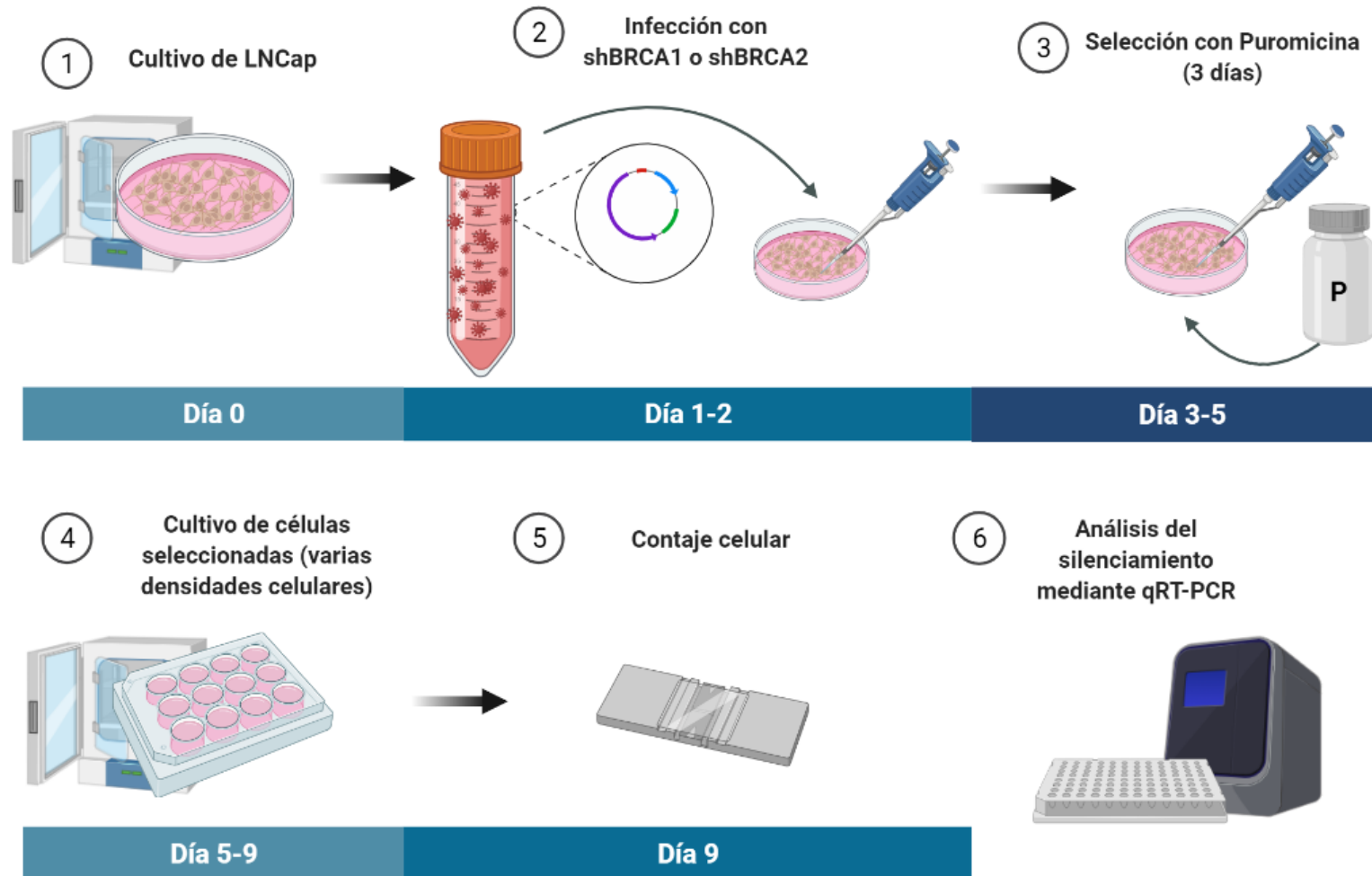
**MÉTODO:** Análisis y comparación de los niveles de expresión de POL $\theta$  en **PC3** al finalizar la selección de las células silenciadas con los niveles de expresión tras el cultivo durante cinco días para el conteo celular.

### Resultados preliminares



**Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de POL $\theta$  al finalizar la selección y tras cinco días de cultivo.** La expresión de los genes se mide mediante RT-qPCR usando como referencia el gen de *RPLPO*. Las barras del gráfico representan la media de dos experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos. Se toma como valor de 1 la expresión de *POLQ* en las células con shBRCA comparado con las células con shControl el primer día que se hace la cuantificación. Como muestran las gráficas de estos resultados preliminares, la expresión de *POLQ* se ve regulada positivamente en ambos silenciamientos de BRCA, siendo más destacado el incremento en el caso de shBRCA1.

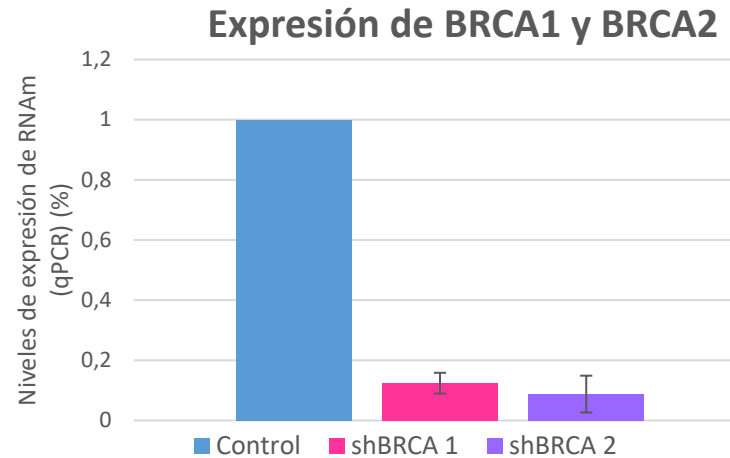
**MÉTODO:** Análisis de viabilidad celular en células tumorales de próstata (**LNCap**) mediante conteo celular tras silenciar los genes de BRCA1 o BRCA2.





**MÉTODO:** Análisis de viabilidad celular en células tumorales de próstata (**LNCap**) mediante conteo celular tras silenciar los genes de BRCA1 o BRCA2.

### Resultados preliminares



**Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de BRCA1 y BRCA2 en LNCap.** La expresión de los genes se mide mediante RT-qPCR usando como referencia el gen de *RPLPO*. Las barras del gráfico representan la media de dos experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos con respecto al control con valor de 1. Como muestra la gráfica, se ha obtenido una media de silenciamiento del 88% en las células donde se utilizó el shBRCA1 y una media de 91% de silenciamiento en las células donde se utilizó el shBRCA2.

## CONCLUSIONES

1. La inhibición de la recombinación homóloga afecta negativamente a la viabilidad de las células tumorales de próstata, lo que sugiere que el requerimiento de POL $\theta$  en estas células no se debe a que sean deficientes en la recombinación homóloga.
2. La expresión de POL $\theta$  se ve regulada positivamente en células tumorales de próstata deficientes en la recombinación homóloga, mostrando de nuevo su importancia para la viabilidad de estas.

## FUTURO PLAN DE INVESTIGACIÓN

Estudio del papel de la **polimerasa POL $\theta$**  en las células tumorales de próstata, tratando de elucidar su papel y la relevancia de la **vía alternativa** (alt-NHEJ) en la reparación de roturas de los cromosomas asociadas a la transcripción.

### MÉTODOS

1. Generación de shRNAs mediante clonaje plasmídico.
2. Silenciar genes implicados en el procesamiento de R-loops (híbridos RNA:DNA) en células tumorales de próstata como la helicasa Aquarius (AQR) o la enzima RNAsa H y silenciar POL $\theta$ .
3. Determinar grupos de comparación como, por ejemplo, shRNA-control, shRNA-Pol $\theta$ , shRNA-AQR y combinación de ambos shRNA.

# MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN



maria.couto@edu.uah.es



pedroantonio.mateos@uah.es



Universidad  
de Alcalá