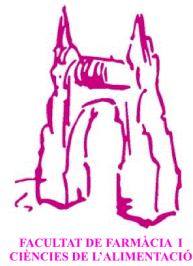




UNIVERSITAT DE
BARCELONA



TREBALL DE FINAL DE GRAU

INHIBICIÓ DE GENS INVOLUCRATS EN L'ESTRÈS REPLICATIU EN EL CÀNCER MITJANÇANT PINCES DE POLIPURINES

Eva Aubets Gil

Àmbit principal: Bioquímica i Biologia Molecular

Àmbits secundaris: Farmacologia i Terapèutica, Biologia Cel·lular

Barcelona, Juny 2017

Aquesta obra està subjecta a una llicència [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



ÍNDEX

	Pàgina
1. Resum	1
2. Integració dels àmbits	2
3. Introducció	3
3.1. Sistema de control del cicle cel·lular.....	3
3.1.1. Sistema de control G2/M.....	4
3.1.2. Via <i>CHK1</i>	5
3.2. Resum del tractament del càncer	6
3.2. Teràpia gènica	7
3.3. Modulació de l'expressió gènica amb àcids nucleics	8
3.2. Modulació de l'expressió gènica amb PPRHs	9
4. Objectius	11
5. Materials i mètodes	11
5.2. Cultius cel·lulars.....	11
5.2. Disseny de PPRHs	11
5.3. Transfecció dels PPRHs	13
5.4. Assaig MTT	14
5.5. Determinació de l'apoptosis.....	14
5.5.1. Assaig Caspases 3/7.....	14
5.5.1. Mètode de Rodamina	15
5.6. Disseny de primers	15
6. Resultats	16
6.1. Efecte dels PPRHs contra <i>WEE1</i> i <i>CHK1</i> en la viabilitat cel·lular	16
6.2. Avaluació de l'efecte dels PPRHs <i>WEE1</i> i <i>CHK1</i> segons concentració i temps	20
6.3. Avaluació de l'efecte dels PPRHs en l'apoptosi	22
6.3.1. Test Caspasa 3/7	22
6.3.2. Mètode de Rodamina.....	23
6.4. Avaluació dels primers dirigits contra el gen <i>WEE1</i>	25
7. Discussió	26
8. Conclusions	29
9. Bibliografia.....	30
10. Agraïments	32
11. Annex	33

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: Via ATR-CHK1 implicada en la reparació de dany al DNA.....	5
Figura 2: Mecanisme d'inhibició dels PPRHs.....	10
Figura 3: : Unió dels PPRHs al seu gen.....	13
Figura 4: Viabilitat cel·lular.....	16
Figura 5: Controls negatius.....	18
Figura 6: Efecte del control negatiu Watson i Crick.....	19
Figura 7: Assaig de viabilitat cel·lular en diferents línies cel·lulars.....	20
Figura 8: Assaig dosi-resposta.....	21
Figura 9: Dependència del temps.....	22
Figura 10: Test Caspases 3/7.....	23
Figura 11: Avaluació de l'apoptosi pel mètode de la rodamina.....	24
Figura 12: Electroforesis de poliacrilamida del fragment amplificat per PCR del gen WEE1 amb els primers dissenyats.....	25
Figura 13: Vies implicades en la reparació del DNA.....	26
Figura Annex I: Resultats MTT dependència del temps.....	33
Figura Annex II.I: <i>Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11 després de 6 h.....</i>	34
Figura Annex II.II: <i>Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11 després de 15 h.....</i>	35
Figura Annex II.III: <i>Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11 després de 24 h.....</i>	36
Figura Annex III: <i>Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC, HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T després de 15 h.....</i>	37

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Classificació de les ciclines i les Cdk segons la fase del cicle cel·lular en què estan implicades principalment.....	4
Taula 2: Nom, gens diana i seqüències dels PPRHs utilitzats en l'estudi.....	11
Taula 3: Primers seleccionats per a l'amplificació del gen WEE1.....	15
Taula 4: Disseny de primers dirigits contra el gen ATR.....	28

ABREVIACIONS

AMD: degeneració macular associada a l'edat.

aODN: Antisense Oligonucleotide.

ATR: ataxia telangiectasia and Rad3 related.

CAK: CDK-activating kinase.

CDC25: phosphatase cell division cycle 25.

CDK: cyclin-dependent kinases.

CHK1/CHEK1: checkpoint kinase 1.

DNA: àcid desoxiribonucleic.

dNTP: desoxiribonucleic trifosfat.

DOTAP: N-[1-(2,3dioleoiloxi) propil]-N, N, N-trimetillamoni metilsulfat.

FDA: Food and Drug Administration.

G1: Growth or gap 1.

G2: Growth or gap 2.

HeLa: línia cel·lular de carcinoma de cervical de Henrietta Lacks.

M: Mitosis.

MCF7: línia cel·lular d'adenocarcinoma de pit de Sister Catherine Frances.

miRNA: microRNA.

MYT: Myelin Transcription factor.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

OMS: Organització mundial de la salut.

PBS: Phosphate-buffered saline

PC3: línia cel·lular de Càncer de pròstata.

PCR: reacció en cadena de la polimerasa.

PPRH: Polypurine Reverse Hoogsteen Hairpin.

RISC: RNA-induced silencing complex.

RNA: àcid ribonucleic.

S: Síntesis.

S.E: Standard Error.

siRNA: Small interfering RNA.

SKBR3: línia cel·lular d'adenocarcinoma de pit de Memorial Sloan Kettering Cancer Center.

TFOs: Triplex Forming Oligonucleotides.

WEE1: WEE1 G2 checkpoint kinase.

1. ABSTRACT

The *ATR-CHK1* pathway is involved in cell cycle arrest to provide enough time to repair the DNA damage before the cell division. The alteration of this checkpoint can lead to develop illness such as cancer. In this study, we investigated the inhibition of components involved in the *ATR-CHK1* pathway using polypurine reverse Hoogsteen hairpins (PPRHs) as a cancer gene therapy. The efficacy of various PPRHs directed against different regions of *WEE1* and *CHK1* genes (components of *ATR-CHK1* pathway) has been evaluated. Five PPRHs (HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11 and HpCHK1I1-C, HpCHK1I1-T) were effective *in vitro* in different cell lines (HeLa, SKBR3, MCF7, PC3). The inhibition of both *WEE1* and *CHK1* reduced the cell viability more than 80% at 100 nM of PPRH. The most effective target-PPRH strategy was the inhibition of *CHK1* by HpCHK1I1-C, which produced a reduction of more than 80% of cell viability at 30 nM. In addition, inhibition of the two genes triggered an increase in the percentage of apoptotic cells after 15 h of being transfected. The inhibition of components of the *ATR-CHK1* pathway by PPRHs demonstrated to be highly effective, and therefore may constitute a possible new approach in anti-cancer gene therapy.

1. RESUM

La via *ATR-CHK1* participa en l'aturada del cicle cel·lular, per tal de disposar de temps suficient per a reparar els danys produïts al DNA abans de la divisió cel·lular. La disfunció d'aquest punt de control pot desencadenar el desenvolupament de malalties com el càncer. En aquest estudi s'ha investigat la inhibició de components de la via *ATR-CHK1*, mitjançant pinces de polipurines (PPRHs) com a possible teràpia gènica anticancerosa. S'ha avaluat l'eficàcia de diversos PPRHs dirigits contra diferents zones dels gens *WEE1* i *CHK1* (components de la via *ATR-CHK1*). Cinc PPRHs (HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11 i HpCHK1I1-C, HpCHK1I1-T), han demostrat ser eficaços *in vitro* en diferents línies cel·lulars (HeLa, SKBR3, MCF7, PC3). Tant la inhibició del gen *WEE1* com la de *CHK1* ha aconseguit reduir la viabilitat de cèl·lules HeLa més d'un 80% a una concentració de 100 nM de PPRH. La estratègia diana-PPRH més efectiva ha resultat ser la inhibició de *CHK1* amb HpCHK1I1-C. Aquesta ha produït una reducció de més del 80% de la viabilitat cel·lular a 30 nM. A més, la inhibició dels dos gens ha desencadenat un augment en el percentatge de cèl·lules apoptòtiques a les 15 hores de ser transfectades. La inhibició de components de la via *ATR-CHK1* mitjançant pinces de polipurines ha demostrat ser de gran eficàcia, i per tant, una possible nova aproximació en teràpia gènica anticancerosa.

2. INTEGRACIÓ DELS ÀMBITS

Tres àmbits estan involucrats en aquest projecte: Bioquímica i Biologia Molecular, Farmacologia i Biologia Cel·lular.

- **Bioquímica i Biologia Molecular:** per entendre els mecanismes involucrats en el càncer. En concret, l'activació del sistema de control del cicle cel·lular i la inestabilitat genòmica.
- **Farmacologia i Terapèutica:** ja que aquest projecte es basa en la recerca de dianes terapèutiques de l'estrès replicatiu implicades en el càncer. En concret, volem avaluar l'efecte dels PPRHs com a eina de teràpia gènica. A més, es fa una breu descripció de diversos tractaments.
- **Biologia Cel·lular:** és essencial conèixer el cicle cel·lular per entendre la seva implicació en el desenvolupament del càncer.

3. INTRODUCCIÓ

Segons l'Organització Mundial de la Salut el càncer és la segona causa major de mort després de les malalties cardiovasculars. En l'any 2015 8,8 milions de persones van morir a causa del càncer, això significa que cada 6 persones que moren al món, una és a causa del càncer (1).

El càncer és el resultat d'un creixement continu incontrolat de les cèl·lules. Aquest procés pot afectar a qualsevol línia cel·lular del cos, consegüentment, es coneixen més de cent tipus de tumors. Existeixen dos tipus de tumors, benignes i malignes, però només els darrers són considerats càncer per la seva capacitat invasora i metastàtica. La metastasi és el procés en el qual les cèl·lules cancerígenes són capaces d'expandir-se des del lloc inicial a una altra regió del cos, sigui via limfàtica o pel sistema circulatori (2).

El càncer és un procés que consta diverses etapes. Primer, la mutació en gens involucrats en el control del cicle cel·lular produeixen una alteració en la proliferació en un procés irreversible anomenat iniciació. En la segona etapa anomenada promoció, la propagació del càncer es veu afavorida per agents promotors de manera reversible. L'etapa final és la progressió, en la qual el tumor maligne obté la capacitat d'envair, sobreviure i fer metastasi com a resultat d'altres mutacions (3).

Durant el cicle cel·lular, les cèl·lules humanes necessiten mecanismes per tal de preservar la integritat del genoma. L'alteració o pèrdua d'aquests mecanismes de control pot conduir a alterar el procés de replicació del DNA, i a conseqüència, al desenvolupament de malalties com el càncer (4). De fet, la inestabilitat genòmica deguda a alteracions en el funcionament del sistema de control del cicle cel·lular és una de les principals característiques del càncer (5).

3.1. SISTEMA DE CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR

El sistema de control del cicle cel·lular està constituït per un conjunt d'interruptors bioquímics connectats. Aquests integren senyals intracel·lulars i extracel·lulars per assegurar que els processos del cicle cel·lular es produeixen en el moment i en l'ordre adequats (6). Per tant, són necessaris sistemes de control del cicle cel·lular i de reparació del DNA per a una correcta proliferació i supervivència (7).

Hi ha tres punts principals de control: inici (G1), entre el pas de la fase G2 a mitosis (G2/ M) i en la transició de la metafase a l'anafase. El punt de control de l'inici,

comprova que l'entorn és favorable perquè la cèl·lula pugui entrar en el cicle cel·lular i progressar a la fase de síntesi del DNA (fase S). El punt de control G2/M, un cop tot el DNA ha estat correctament replicat, permet l'entrada a mitosi si l'entorn és favorable. Finalment, el control de la transició de la metafase a l'anafase, comprova que tots els cromosomes estan units al fus mitòtic per iniciar l'anafase i finalitzar la mitosi i la citocinesi (6).

Els principals components del sistema de control són les proteïnes quinases dependents de ciclina (Cdk: *cyclin-dependent kinases*). Aquestes proteïnes provoquen canvis en la fosforilació de proteïnes implicades en el cicle cel·lular segons la fase del cicle. Per a tenir activitat de proteïna quinasa, les Cdk han d'estar unides a unes proteïnes anomenades ciclins (nom a causa del fet que són sintetitzades i degradades segons l'etapa del cicle cel·lular de manera cíclica). Hi ha 4 tipus de ciclins, classificades segons l'estadi del cicle en què s'uneixen a Cdk (Taula 1) (6).

Fase del cicle cel·lular	Ciclina	CDK associada
G1	cycD	<i>CDK4, CDK6</i>
G1/S	cycE	<i>CDK2</i>
S	cycA	<i>CDK2, CDK1</i>
M	cycB (o cdc2)	<i>CDK1</i>

Taula 1: classificació de les ciclins i les Cdk segons la fase del cicle cel·lular en què estan implicades principalment (6).

La unió de ciclins a Cdk permet que el centre actiu quedi al descobert, el que produeix una activació parcial de Cdk. Per a l'activació total de Cdk és necessari la fosforilació per part de la quinasa activadora de Cdk (CAK: *Cdk-activating kinase*). Aquesta última fosforilació permet un canvi de conformació que augmenta l'activitat de Cdk (6).

3.1.1. SISTEMA DE CONTROL G2/M

En les cèl·lules canceroses, el sistema de control de la fase G1 sol ser deficient, de manera que depèn del de la G2. La principal quinasa de G2 és *CDK1*, que s'uneix a la ciclina B per tal provocar l'entrada a la mitosi. L'estat de fosforilació de *CDK1* és controlat per:

- Dos quinases: *WEE1* (*WEE1 G2 checkpoint kinase*) i *MYT* (*Myelin Transcription Factor*).

- Una fosfatasa: *CDC25* (*Cell Division Cycle 25 homolog*).

Tot aquest conjunt està sota control de la via *ATR-CHK1* (8).

3.1.2. VIA *ATR-CHK1*

Quan es produeix dany en el DNA, s'activa la via *ATR-CHK1*, aquesta reconeix un ampli espectre d'anormalitats del DNA (danys causats per llum ultraviolada, infecció de virus, danys a la cadena doble...). El dany al DNA és detectat per la quinasa *ATR* (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*) que a través d'una fosforilació activa a la quinasa *CHK1* (*Checkpoint Kinase 1*). *CHK1* està involucrada en l'aturada del cicle cel·lular mitjançant dos mecanismes, d'una banda estimulació de la quinasa *WEE1*, i de l'altre inactivació la fosfatasa *CDC25* (9).

Quan s'activa la via *ATR-CHK1*, la *CDK1* és inhibida mitjançant una fosforilació a la tirosina 15 per *WEE1*. Seguidament, *MYT1* fosforila a *CDK1* en la treonina 14 i tirosina 15. Aquestes fosforilacions impedeixen que la ciclina B s'associï a *CDK1*, de manera que s'activa el sistema de control G2, el cicle cel·lular s'atura i evita l'inici de la fase M. El complex *CDK1-Ciclina B* és activat quan *CDC25* produeix una desfosforilació del residu 15, i en conseqüència, permet la progressió del cicle cel·lular. Tal com s'ha mencionat anteriorment, aquesta fosfatasa és inactivada per *CHK1* (Figura 1) (4,5,10).

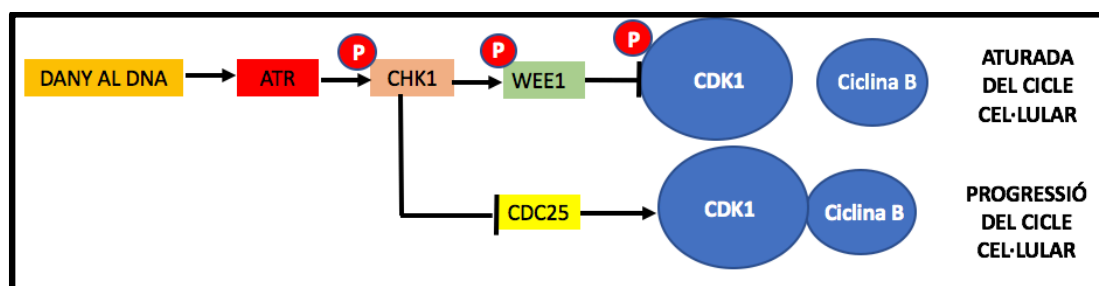


Figura 1: Via *ATR-CHK1* implicada en la reparació de dany al DNA. Font: representació esquemàtica adaptada de Matheson CJ et al (8).

Per tant, quan es produeix dany en el DNA, el gen *WEE1* participa en l'aturada del cicle cel·lular, per tal de proporcionar suficient temps abans de la divisió cel·lular, per a la reparació del dany. La inhibició dels punts de control del cicle cel·lular pot conduir a la producció de lesions genètiques irreparables i acabar produint la mort cel·lular.

El gen *WEE1* està sobre expressat en diversos càncers com el glioblastoma, osteosarcoma, melanoma, càncer de pit o de còlon (5,8). El gen *CHK1* també és expressat en alts nivells en càncers com de còlon pit, fetge o nasofaringe (9).

El fet que aquests dos gens es trobin sobre expressats en diversos tipus de càncer i el seu paper en la reparació del DNA els fa que siguin possibles dianes en el tractament contra el càncer.

3.2. RESUM DEL TRACTAMENT DEL CÀNCER

Com s'ha mencionat anteriorment, existeixen molts tipus de càncer. Per aquest motiu, hi ha diferents tractaments segons el tipus i l'estadi de la malaltia:

- **Cirurgia:** consisteix a treure el tumor de l'organisme. A més de la cirurgia convencional, s'han desenvolupat altres tècniques com la criocirurgia (basada en l'ús de nitrogen líquid), làser, hipertèrmia (on el teixit és exposat a altes temperatures per matar les cèl·lules cancerígenes o augmentar la seva sensibilitat a la quimioteràpia o la radioteràpia) i fotodinàmica (on medicaments són activats en presència d'una longitud d'ona específica)(11,12).
- **Radiació:** aquesta tècnica utilitza altes dosis de radiació ionitzant directament al tumor. Aquest mètode afecta no només al tumor, sinó a altres cèl·lules que es troben al voltant (12,13).
- **Quimioteràpia:** inclou tots els tractaments químics que afecten cèl·lules amb altes taxes de divisió. Existeixen diverses quimioteràpies amb diferents mecanismes d'acció: alcaloides, agents alquilants, antraciclins, inhibidors de la topoisomerasa, metabòlits de purines i pirimidines (12).
- **Immunoteràpia:** teràpia biològica que estimula els senyals del nostre organisme per tal d'augmentar (13).
- **Teràpia hormonal:** practicada en aquells càncers que la seva proliferació depèn d'hormones. Hi ha diversos mecanismes en aquest camp: moduladors selectius del receptor d'estrogen, inhibidors de l'aromatasa, reguladors selectius a la baixa d'estrogen i agonistes de l'alliberació de l'hormona luteïnitzant com buserelina i goserelina (14).
- **Teràpies dirigides:** estratègies desenvolupades per augmentar l'especificitat i reduir els efectes adversos de les teràpies convencionals. En aquesta categoria s'inclou:
 - **Small molecules inhibitors:** aquesta teràpia se centra en la inhibició de quinases que participen en vies involucrades en el procés tumoral.

- **Anticossos monoclonals:** basada en anticossos que eviten la unió entre receptors i lligands (12).

Tradicionalment, el tractament del càncer es basava en radioteràpia i quimioteràpia. Ambdós mètodes tenen molts efectes adversos, deguts a la baixa especificitat i l'efecte a cèl·lules no cancerígenes. Tanmateix, les cèl·lules canceroses poden adquirir resistències (12).

Aquests mètodes es poden combinar i classificar segons la seqüència de la teràpia:

- **Concomitant:** utilitza radioteràpia i quimioteràpia al mateix temps sense cirurgia.
- **Neoadjuvant:** consisteix a realitzar quimioteràpia, teràpia hormonal o radioteràpia abans de la cirurgia per tal de reduir la mida del tumor.
- **Adjuvant:** quan la quimioteràpia, teràpia hormonal, immunoteràpia, teràpia dirigida o radioteràpia es fa després de la cirurgia per destruir les cèl·lules romanents (11,12).

3.3. TERÀPIA GÈNICA

En els últims anys hi ha hagut un gran progrés en la biologia molecular i el genoma humà. En concret, la publicació l'any 2001 de la seqüència del genoma humà va promoure la recerca en la funció dels gens i la seva implicació en el desenvolupament de malalties com el càncer (15,16).

La teràpia gènica és una estratègia que es basa en la introducció de material genètic (gens, segments de gens o oligonucleòtids) per eliminar, modificar o reemplaçar gens alterats per tal de curar o alentir la progressió de la malaltia (17).

Hi ha dos tipus de metodologia: *in vivo* i *ex vivo*. En la primera tècnica, el material genètic és introduït directament a cèl·lules. En canvi, en el segon, les cèl·lules són aïllades i sembrades. Finalment, les cèl·lules són genèticament modificades i introduïdes a l'hoste (18).

Una de les principals limitacions de la teràpia gènica és l'alliberament del material genètic dintre de la cèl·lula. El vehicle que permet la introducció del gen o oligonucleòtid a l'interior de la cèl·lula s'anomena vector. Diferents vectors s'han desenvolupat:

- **Virals:** el virus aprofiten el seu cicle replicació per inserir el material a la cèl·lula diana (17).
- **Bacterià:** els bacteris poden transferir els plasmidis, així com transportar i amplificar gens (19).
- **No virals:** inclou tècniques físiques (electroporació i material genètic cobert de nanopartícules de minerals com l'or) i químiques (liposomes catiónics, pèptids catiónics i polímers catiónics) (17,19).

3.4. MODULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA AMB ÀCIDS NUCLEICS.

Actualment, la modulació de l'expressió gènica amb àcids nucleics és de gran interès per a inhibir la síntesi de proteïnes involucrades en processos patològics (28). S'han desenvolupat diferents estructures d'oligonucleòtids, alguns exemples són:

- **Triplex Forming Oligonucleotides (TFOs):** molècules de DNA monocatenàries que s'uneixen al solc major del dúplex amb enllaços de Hoogsteen o reverse-Hoogsteen (20).
- **Antisense Oligonucleotide (aODN):** oligonucleòtids que produeixen la inactivació de gens a través de la unió al mRNA (21).
- **Small interfering RNA (siRNA):** molècules de 20-24 nucleòtids de RNA bicatenari que redueixen l'expressió de gens a través de la formació del *RNA-induced silencing complex* (RISC) (22).
- **miRNA (microRNA) mimics and miRNA inhibitors:** molècules de RNA monocatenàries de 15-22 nucleòtids no codificants que controlen l'expressió gènica a nivell post-transcripcional. El càncer està associat a nivells alterats de miRNA. Per aquest motiu s'han dissenyat molècules que mimetitzen o antagonitzen miRNA (21).
- **Ribozims:** molècules de RNA amb activitat enzimàtica. Els ribozims capaços de tallar molècules de RNA poden ser útils com a eina de silenciament gènic (21).
- **Aptàmers:** Oligonucleòtids (RNA o DNA) capaços d'unir-se a estructures tridimensionals com les proteïnes (22).

L'any 2004, un aptàmer (pegaptanib) va ser aprovat pel tractament de la degeneració macular (AMD) per la *Food and Drug Administration* (FDA) (Khorkova, 2017). En el 2005, un siRNA (bevasiranib) va ser també provat pel tractament de la AMD (Lundin, 2015). A més, actualment, més de 200 assajos clínics estan registrats en

ClinicalTrials.gov i 10.000 pacients són tractats amb oligonucleòtids, fet que demostra l'increment de recerca en aquest àmbit (22).

3.5. MODULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA AMB PRRHS.

Recentment, s'han dissenyat unes noves molècules silenciadores anomenades pinces de polipurines (*Polypurine reverse Hoogsteen hairpins*, PPRHs). S'ha estudiat l'habilitat d'aquestes molècules per silenciar diversos gens relacionats amb el càncer, com el de la survivina, dihidrofolat reducatasa i telomerasa (24), i han demostrat eficàcia tan *in vitro* com *in vivo* (25).

Com s'ha mencionat anteriorment, existeixen altres molècules de silenciament gènic com el siRNA. En estudis comparatius amb siRNA s'ha demostrat que els PPRHs presenten diversos avantatges importants com millora de l'estabilitat, baixa immunogenicitat i més econòmics que els siRNA (26).

Els PPRHs són molècules formades per dues cadenes de polipurines antiparal·leles. Aquestes dues cadenes estan unides per un pont de 5 timidines i mitjançant enllaços intramoleculars de Hoogsteen entre adenines i guanines, el que els confereix la forma de *hairpin*. Una de les cadenes és capaç d'unir-se mitjançant enllaços de Watson-Crick a una seqüència de polipirimidines específica del DNA. Aquesta unió provoca el desplaçament de la quarta cadena i la formació d'un triplex (25).

Els PPRHs es poden unir tant a la cadena codificant com a la motlle. Els PPRHs dissenyat contra la cadena motlle impedeixen la unió de factors de transcripció, i per tant, interfereixen en el procés de transcripció i redueixen els nivells de mRNA. D'altra banda, els PPRHs dissenyats contra la cadena codificant poden unir-se al DNA i al mRNA tot impedit la unió de factors d'empalmament (Figura 2)(25,27).

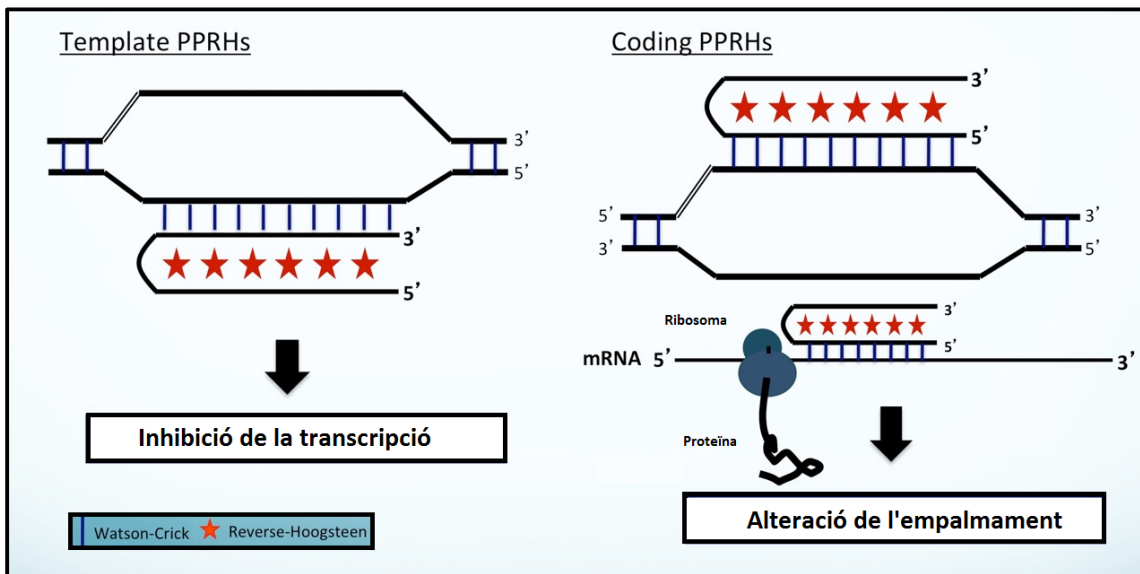


Figura 2: mecanisme d'inhibició dels gens pels PPRHs. A l'esquerra en el cas de PPRHs dirigits contra la cadena motlle (Template PPRH) i a la dreta contra la cadena codificant (Coding PPRH).

4. OBJECTIUS

Els principals objectius d'aquest estudi són:

- 1) Avaluar el potencial de gens relacionats en l'estrès replicatiu com a possibles dianes en teràpia gènica anticancerosa (*WEE1* i *CHK1*).
- 2) Comprovar l'eficàcia de les pinces de polipurines com a eina d'inhibició del gen *WEE1* i *CHK1* i realitzar una anàlisi comparativa dels PPRHs dissenyats contra diferents regions.
- 3) Analitzar l'efecte de la inhibició dels gens *WEE1* i *CHK1* pels PPRHs sobre la viabilitat cel·lular i investigar si l'apoptosi forma part del mecanisme d'acció aquestes pinces de polipurines.

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1. **Cultius cel·lulars.**

En aquest estudi es van utilitzar les següents línies cel·lulars: HeLa (càncer de cèrvix-uterí humà), MCF7 (càncer de mama humà), SKBR3 (càncer de mama humà), PC3 (càncer de pròstata humà). Aquestes van ser cultivades en medi Ham F12 amb un 7% de sèrum fetal boví a una temperatura de 37°C en una atmosfera humida controlada al 5% de CO₂.

5.2. **Disseny de PPRHs.**

Pel disseny de PPRHs és essencial trobar una seqüència de polipurines. Aquestes es troben principalment en regions no codificants com és el cas de promotors i introns (23). Es va utilitzar el software Triplex-forming Oligonucleotide Target Sequence Search (<http://utw10685.utweb.utexas.edu/tfo/>), eina que permet la cerca seqüències de polipurines en el gen seleccionat i que formaran les cadenes antiparal·leles del PPRH

De les seqüències trobades, es van seleccionar aquelles que tinguessin una longitud aproximada de 20-25 nucleòtids, amb un màxim 3 interrupcions de pirimidines i evitant més de 4 guanines consecutives. Per a corroborar l'especificat pel gen, es va realitzar una anàlisi BLAST.

En la taula 2, es mostren les seqüències dels PPRHs dissenyats contra el gen *WEE1* (HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11) i de tres controls negatius utilitzats (Hpmyc11-SC, HpDI3-SC, HpWEE1Pr-WC). En la figura 3 s'indica les regions d'unió dels tres PPRHs en el gen *WEE1*. Aquests van ser sintetitzats per Sigma-Aldrich com oligodeoxinucleòtids no modificats. Els oligonucleòtids liofilitzats es van resuspendre a

la concentració de 1mM en tampó estèril Tris-EDTA (1mM d'EDTA i 10mM de Tris, a pH 8,0) i es van emmagatzemar a -20°C.

Nom	Gen	Estructura
HpWEE1Pr-T	<i>WEE1</i>	5'- GGGAC CG AGGGGG CA AAGAAG CGG T T T 3'- GGGAC CG AGGGGG CA AAGAAG CGG T
HpWEE1I5-C	<i>WEE1</i>	5'- GGGAGAGGAGGGAGAGAC CGA CAAG T T T 3'- GGGAGAGGAGGGAGAGAC CGA CAAG T
HpWEE1E11-C	<i>WEE1</i>	5'- GGGAGG T GGGAAAGGAG T AG T T T 3'- GGGAGG T GGGAAAGGAG T AG T
HpCHK1I10-T	<i>CHK1</i>	5'- AAGGAAGAAAGAGAGGAGGGAGG T T T 3'- AAGGAAGAAAGAGAGGAGGGAGG T
HpCHK1I13-C	<i>CHK1</i>	5'- AGG T GAGGAGG A TAGG C AGA T T T 3'- AGG T GAGGAGG A TAGG C AGA T
HpCHK1I1-T	<i>CHK1</i>	5'- GTGGAT G AGAT A GAAGGGGAAGG T T T 3'- GTGGAT G AGAT A GAAGGGGAAGG T
HpCHK1I1-C	<i>CHK1</i>	5'- GGGAAGGAGGAGGGAGAGG T GGG T T T 3'- GGGAAGGAGGAGGGAGAGG T GGG T
HpmycI1-SC	<i>MYC</i>	5'- AGAGAAGAGGAAGAGAGGAAAGAGAGGAAGAGGA T T T 3'- AGAGAAGAGGAAGAGAGGAAAGAGAGGAAGAGGA T T T
HpDI3-SC	<i>DHFR</i>	5'- GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA T T T 3'- GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA T
HpWEE1Pr-WC	<i>WEE1</i>	5'- GGGAC CG AGGGGG CA AAGAAG CGG T T T 3'- GGGAC CG AGGGGG CA AAGAAG CGG T

Taula 2: Nom, gens diana i seqüències dels PPRHs utilitzats en l'estudi. Interrupcions marcades en vermell

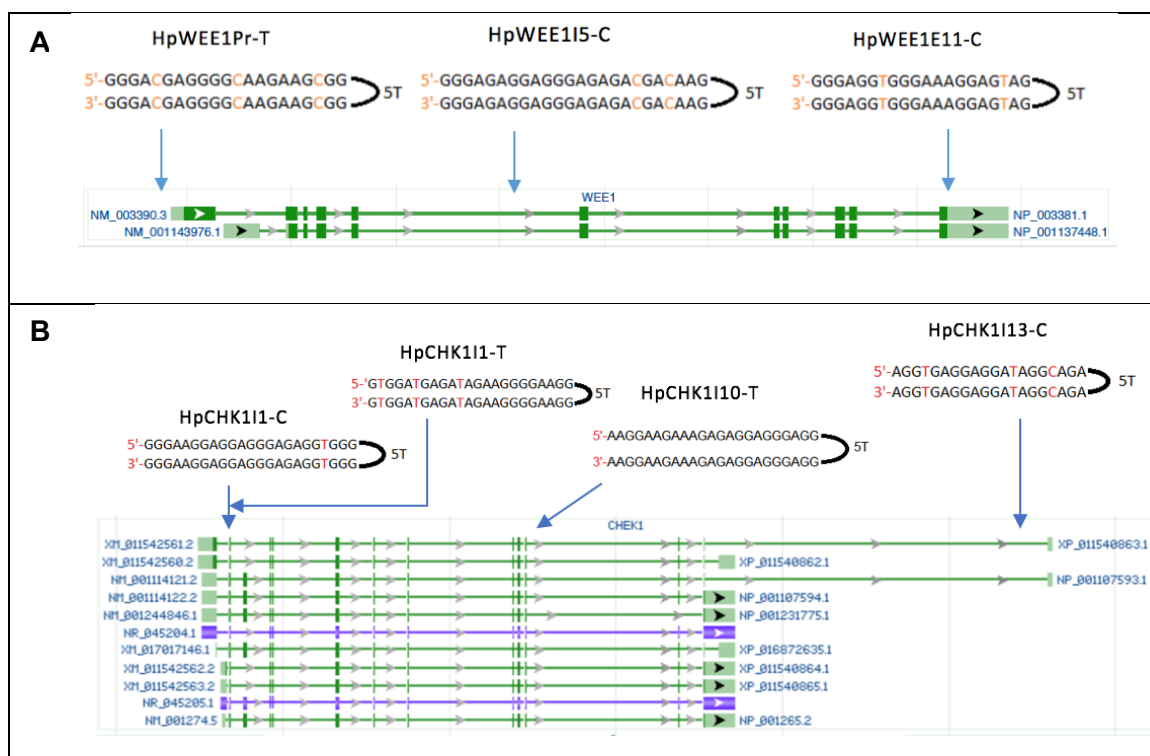


Figura 3: Unió dels PPRHs al seu gen. (A) Representació esquemàtica del gen WEE1 i les seves isoformes. (B) Representació esquemàtica del gen CHK1 i les seves isoformes. Les fletxes blaves indiquen on s'uneixen els PPRHs dissenyats. Les línies més gruixudes representen els exons i les més primes els introns. Font: imatge adaptada de la base de dades GENE del National Center For Biotechnology Information (NCBI) (2016).

5.3. Transfecció dels PPRHs.

El sistema escollit per a transferir el *hairpin* dintre de les cèl·lules va ser el DOTAP (N-[1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamoni metillsulfat, Biontex). Aquest és un liposoma catiònic que amb contacte amb el DNA forma complexes espontàniament que poden ser afegits directament al cultiu cel·lular. Aquests complexos entren a la cèl·lula per endocitosi i alliberen el DNA al citoplasma.

Segons estudis previs la relació òptima de DOTAP i PPRHs per a la transfecció és 1:100 (27). En el cas dels estudis dosi-resposta, la concentració més baixa utilitzada de DOTAP va ser de 5 µM, ja que s'ha observat que a concentracions més petites no té efecte.

El procés de transfecció va variar segons les plaques utilitzades. En el cas de plaques adherents de 35 mm de diàmetre, es van sembrar les cèl·lules 24 h abans de la

transfecció en un volum final de 800 µl de medi. El nombre de cèl·lules va variar segons el tipus d'assaig realitzat.

Passades 24 h de la sembra, es va mesclar medi, DOTAP i el PPRH corresponents en un volum final de 200 µl. Les diferents mescles es van incubar 20 minuts a temperatura ambient. Un cop transcorregut aquests temps, cada mescla es va afegir al pou corresponent amb un volum final de 1mL. En el cas del control, es van afegir 200 µl únicament de medi.

En el cas de plaques de 96 pous, es van sembrar les cèl·lules en un volum final de 50 µl. Després de 24 h, el medi va ser absorbit i es van afegir 50 µl de la mescla de transfecció a cada pou.

5.4. Assaig MTT.

Es tracta d'un assaig colorimètric que permet mesurar la viabilitat a partir de l'activitat mitocondrial. Es van sembrar 10.000 cèl·lules en plaques adherents de 6 pous i a les 24 h van ser transfectades. Cinc dies després de la transfecció es va afegir 0,63 mM de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli (Sigma-Aldrich) i 100 µM de succinat de sòdic (Sigma-Aldrich). Després de 2 hores i mitja d'incubació a 37°C, es va retirar el medi i es va afegir la solució de lisis (0,57% d'àcid acètic i 10% de dodecilsulfat sòdic en dimetil sulfòxid).

Finalment, es va mesurar l'absorbància a una longitud d'ona de 570 nm mitjançant un espectrofotòmetre Modulus Microplate (Turner BioSystems) per tal de determinar la viabilitat cel·lular. La solució de lisis es va utilitzar com a blanc i els resultats es van expressar com a percentatge de cèl·lules viables respecte al control (cèl·lules no tractades). Baixos percentatges representaven una disminució en la viabilitat cel·lular, en canvi, alts percentatges representaven un augment en la proliferació cel·lular.

5.5. Determinació de l'apoptosis.

Per a la determinació de l'apoptosi es van utilitzar dues metodologies: assaig de caspasa 3/7 i mètode de la Rodamina.

5.5.1. Assaig Caspases 3/7.

Es va utilitzar el Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) per tal de mesurar l'activitat de la caspasa-3 i la caspasa-7, enzims que implicats en l'apoptosi. Es va sembrar en plaques de 96 pous 5.000 cèl·lules en un volum final de 50 µl de medi. L'endemà, les

cèl·lules van ser transfectades amb una concentració final de PPRH de 100nM. La transfecció es va fer 2 h, 4 h, 6 h i 8 h abans d'afegir 50 µl del reactiu Caspase-Glo 3/7 (relació 1:1 medi i reactiu). Seguidament, es va deixar incubar 1h i es va mesurar la luminescència utilitzant el luminòmetre ModulusTM Microplate (Promega). Es van utilitzar cèl·lules no tractades com a control i un pou amb només medi F12 i el reactiu caspase-Glo 3/7 com a blanc.

5.5.2. Mètode de Rodamina.

En el cas de rodamina, es van sembrar 60.000 cèl·lules i es van transfectar després de 24h. Es va afegir rodamina 123 (Sigma-Aldrich) a les 6 h, 15 h i 24 h de la transfecció a una concentració final de 5 ng/µl i es va deixar incubant 30 minuts a 37°C.

Passats els 30 minuts d'incubació amb rodamina, es van recol·lectar les cèl·lules i centrifugar a 800 x g a 4°C durant i 5 minuts. El pellet es va netejar amb PBS (*Phosphate buffered saline*) 1x. A continuació, el pellet es va resuspendre en 500 µl de PBS 1x fred i es va afegir iodur de propidi (Sigma-Aldrich) a una concentració final de 5 µg/ ml. Finalment, es va realitzar l'anàlisi amb el citòmetre CyAnTM ADP (Beckman Coulter, Inc.).

5.6. Disseny de Primers.

Es va utilitzar el programa Primer-Blast del NCBI per a buscar primers que produïssin un producte d'una mida d'entre 150-200 nucleòtids del gen WEE1. Un cop escollits el parell de primers, representats a la taula 3, es va procedir a comprovar que amplificaven el gen desitjat.

Forward	CCTTTTGCAAGTTGGCCGAG
Reverse	TCGCCCTCTTCAACTTGTGG

Taula 3: Primers seleccionats per a l'amplificació del gen WEE1.

Es va extraure el RNA de cèl·lules HeLa no tractades mitjançant trizol. La quantitat de RNA extreta es va determinar mitjançant un Nanodrop. Seguidament, es va afegir 4,75 µl d'un mix de transcriptasa reversa a 15,25µl de mostra de RNA, per tal de convertir el RNA a cDNA amb. El mix contenia 2 µl de buffer 10x, 1 µl de dNTPs, 0,25µl d'hexamers, 0,5µl d'inhibidor de RNAsa i 1 µl de Moloney-murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase. Un cop mesclat es va incubar a 42°C 1 h.

A continuació es va realitzar una PCR (reacció en cadena de la polimerasa). Es van mesclar 5 µl de DNA amb 45 µl d'un mix que contenia: 10 µl buffer 5x, 0,75 µl dNTPs, 0,5µl del primer forward, 0,5 µl del primer reverse, 33 µl d'aigua MQ i 0,25 µl de one taq polimerasa. Les condicions dels cicles de PCR vans ser 30 segons a 94°C en el cicle inicial, seguit de 30 cicles amb 1 minut d'hibridació a 59 °C i 72°C 1 minut en els períodes de síntesi.

Un cop amplificat el gen, es va procedir a fer una electroforesi de la mostra en un gel d'acrilamida per observar si els primers amplificaven el gen de manera selectiva.

6. RESULTATS

6.1. Efecte dels PPRHs contra *WEE1* i *CHK1* en la viabilitat cel·lular.

Per avaluar l'efecte dels PPRHs es van incubar 10.000 cèl·lules HeLa en plaques de 6 pous a una concentració de 100nM de PPRHs i 10µM de DOTAP (Concentracions efectives en estudis d'altres PPRHs). Per a excloure que la toxicitat fos deguda al DOTAP es va cultivar cèl·lules en un pou amb 10µM de DOTAP. A més, es va fer un control negatiu amb un PPRH *scrambled*. Aquests consisteix en una doble cadena de polipurines unides per enllaços de Hoogsteen que també formen una forqueta o hairpin. En aquest cas la seqüència és aleatòria i no la del gen, per tant, l'*scrambled* no hauria d'unir-se, i a conseqüència, no hauria de produir citotoxicitat.

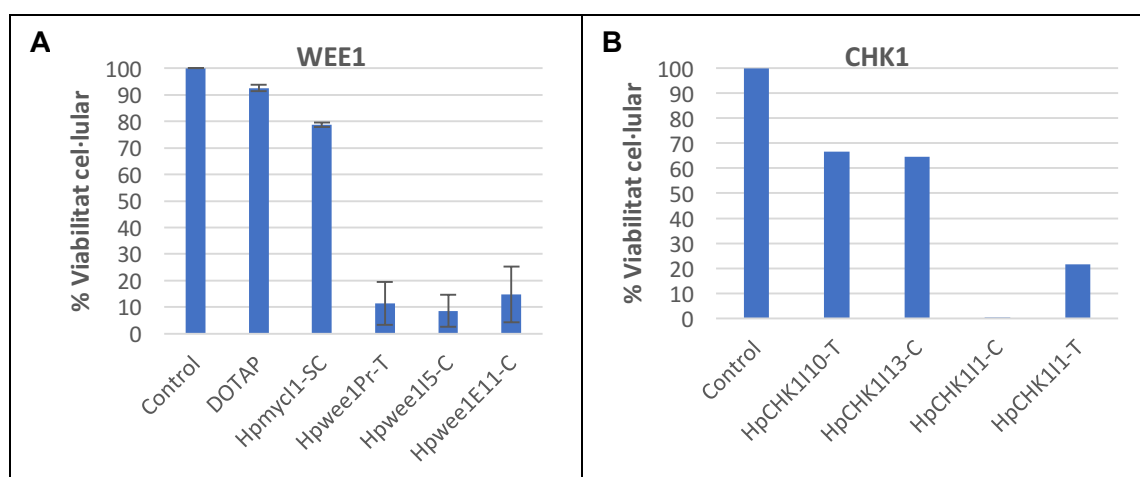


Figura 4: Viabilitat cel·lular. (A) Efecte dels PPRHs dissenyats contra *WEE1* representat en forma de percentatge respecte al control. Cèl·lules HeLa incubades amb DOTAP, *scrambled*, HpWEE1Pr, HpWEE115, HpWEE1E11. (B) Efecte dels PPRHs dissenyats contra *CHK1* representat en forma de percentatge respecte al control. Cèl·lules HeLa incubades amb

HpCHK1110, HpCHK1113-C, HpCHK111-C i HpCHK111. Els resultats corresponen a la mitjana \pm SE (Standard Error).

Després de cinc dies d'incubació, es va realitzar un MTT per tal de quantificar les cèl·lules viables. Els tres PRRHs van mostrar ser eficaços, reduint la viabilitat cel·lular més d'un 85%. Respecte a *CHK1*, HpCHK111-C va mostrar una alta activitat i va reduir la viabilitat cel·lular quasi un 100%. En canvi, els PRRHs dirigits contra els introns 10 i 13 només van reduir entre un 30-40% la viabilitat, motiu pel qual van ser descartats de l'estudi.

A més a més, es va poder comprovar que la disminució en la viabilitat quan les cèl·lules eren incubades únicament amb DOTAP era mínima, i per tant, la citotoxicitat no era deguda al DOTAP. A més, l'*scrambled* no reduïa més d'un 21% la viabilitat, el que demostra la importància de què el PRRH contingui una seqüència específica per tal d'unir-se i silenciar el gen (figura 4).

Per comprovar la importància dels enllaços de Hoogsteen en la inhibició de l'expressió gènica es va dissenyar HpWEE1Pr-WC. Aquest consisteix en un *hairpin* que conté la seqüència d'unió al gen però amb enllaços intramoleculars de Watson i Crick. Com que no forma enllaços de Hoogsteen, és incapaç de formar el tríplex amb la diana, i per tant, no hauria de produir citotoxicitat. Per aconseguir aquesta estructura es va utilitzar la mateixa seqüència inicial de HpWEE1Pr-T, però després del bucle de 5 timidines es va afegir la cadena complementària en comptes de la reversa (Figura 5A). En resum, en aquest estudi s'han utilitzat dos tipus de controls negatius, HpWEE1Pr-WC i els *scrambled*, que no s'haurien d'unir, i per tant, no hauria de disminuir la viabilitat cel·lular (figura 5B).

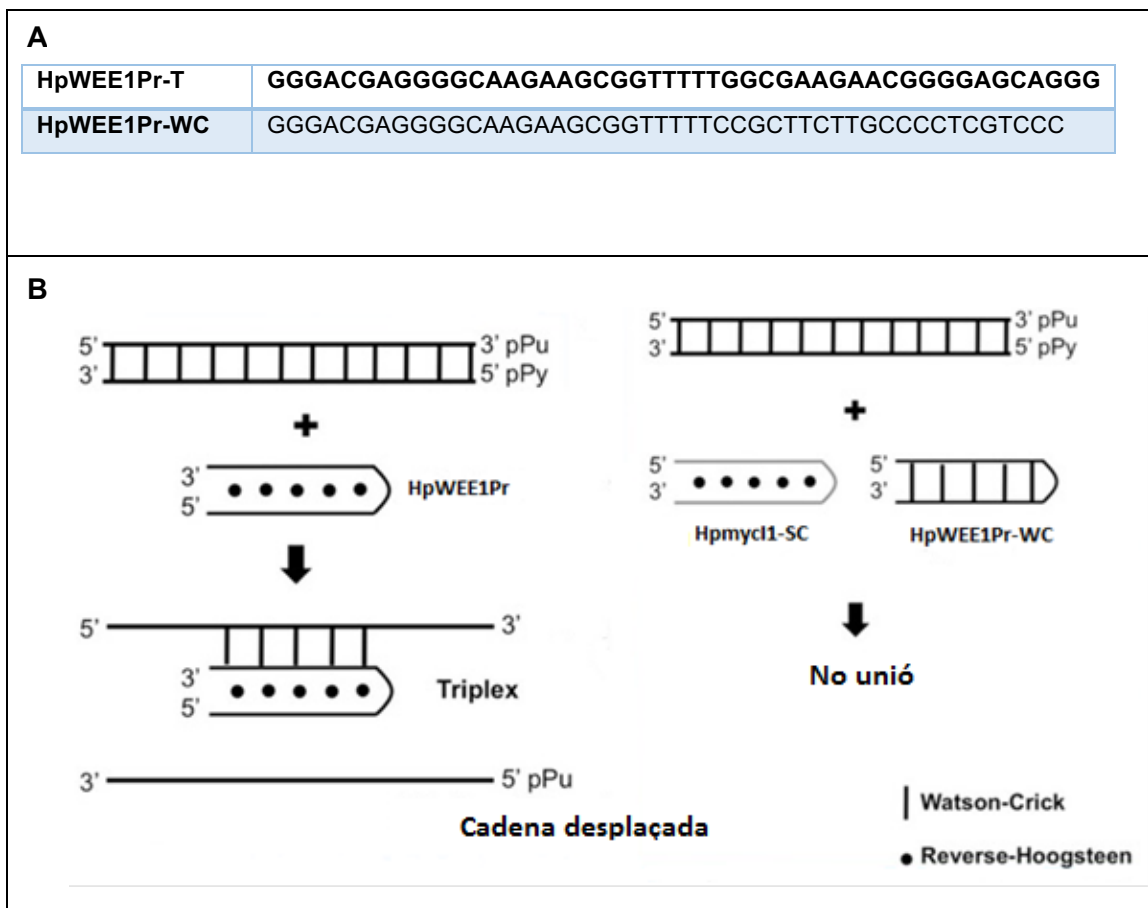


Figura 5: Controls negatius. (A) Comparació de l'estructura del PPRH dirigit contra el promotor amb enllaços de Hoogsteen (HpWEE1Pr-T) i amb enllaços de Watson i Crick (HpWEE1Pr-WC). (B) Representació esquemàtica de la unió de HpWEE1Pr-T, HpWEE1Pr-WC i Hpmyc1-SC.

Tal com es pot veure en la figura 6, l'efecte del HpWEE1Pr-WC és inferior al de HpWEE1Pr, el que demostra que els enllaços de Hoogsteen estan implicats en el mecanisme d'acció de supressió del gen *WEE1*.

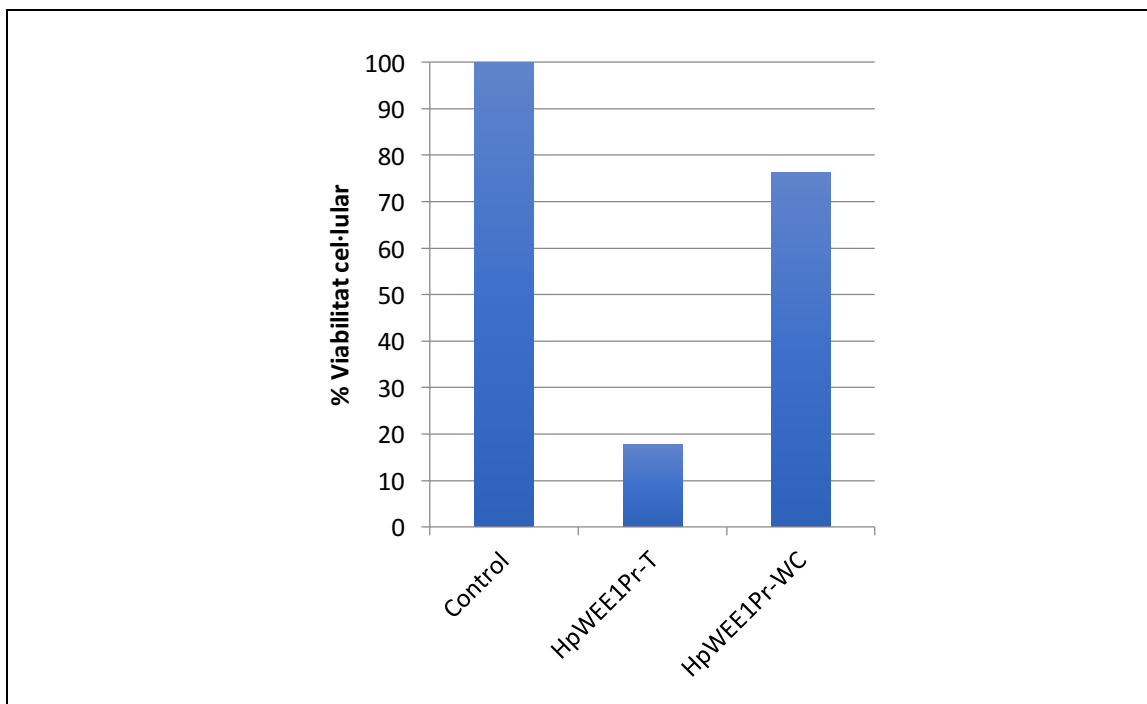


Figura 6: Efecte del control negatiu Watson i Crick. Comparació de l'efecte produït per HpWEE1Pr i HpWEE1Pr-WC en la viabilitat cel·lular expressat en forma de percentatge respecte al control

A continuació, es va fer un cribratge dels 5 PPRHs seleccionats (HpCHK111-C, HpCHK111-T, HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11 per tal de comprovar la seva efectivitat en altres línies cel·lulars (PC3, SKBR3 i MCF7). Com en els casos anteriors, es van sembrar 10.000 cèl·lules i es van transfectar els PPRHs a una concentració de 100 nM. Cinc dies després de la transfecció es va realitzar l'assaig MTT.

En general, els PPRHs dirigits contra *CHK1* van ser més efectius, amb una reducció de més del 65% de la viabilitat cel·lular en totes les línies cel·lulars. En quant *WEE1*, els PPRHs van demostrar ser més eficaços en cèl·lules HeLa que en la resta de línies, seguit de PC3 (Figura 7).

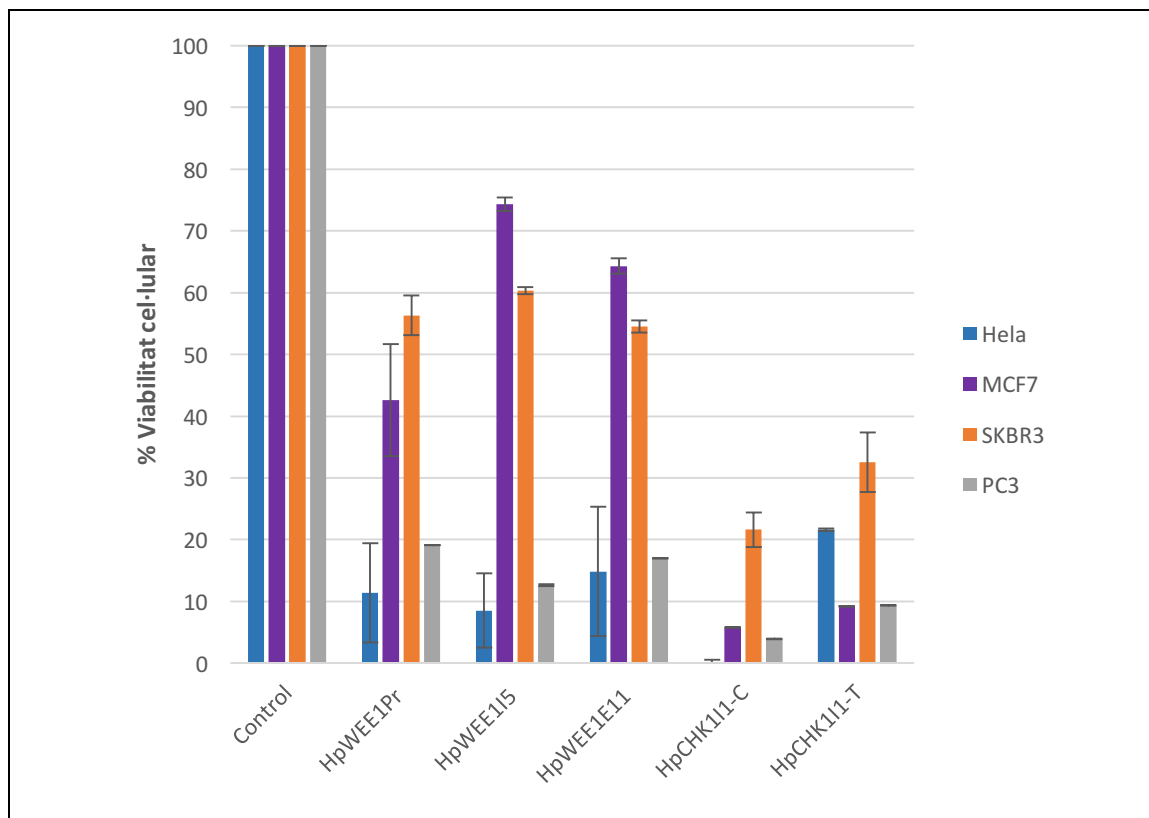


Figura 7: Assaig de viabilitat cel·lular en diferents línies cel·lulars. Incubació de cèl·lules HeLa, MCF7, SKBR3, PC3 amb HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E1, HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T. Les dades corresponen a la mitjana \pm SE.

6.2. Avaluació de l'efecte dels PPRHs contra WEE1 i CHK1 segons concentració i temps.

Un cop confirmat que els PPRHs produïen una disminució en la viabilitat cel·lular i que l'efecte era degut a l'estructura, es va procedir a fer un estudi de dosis-resposta. Amb aquest assaig es pretenia determinar quina estratègia, diana-PPRH, era més efectiva.

Donat l'alta activitat que havia demostrat la inhibició de *CHK1*, vam afegir una concentració més en l'estudi (30 nM). És a dir, l'assaig inhibint *CHK1* es va fer a quatre concentracions diferents, mentre que l'estudi amb *WEE1* es va fer només amb tres concentracions.

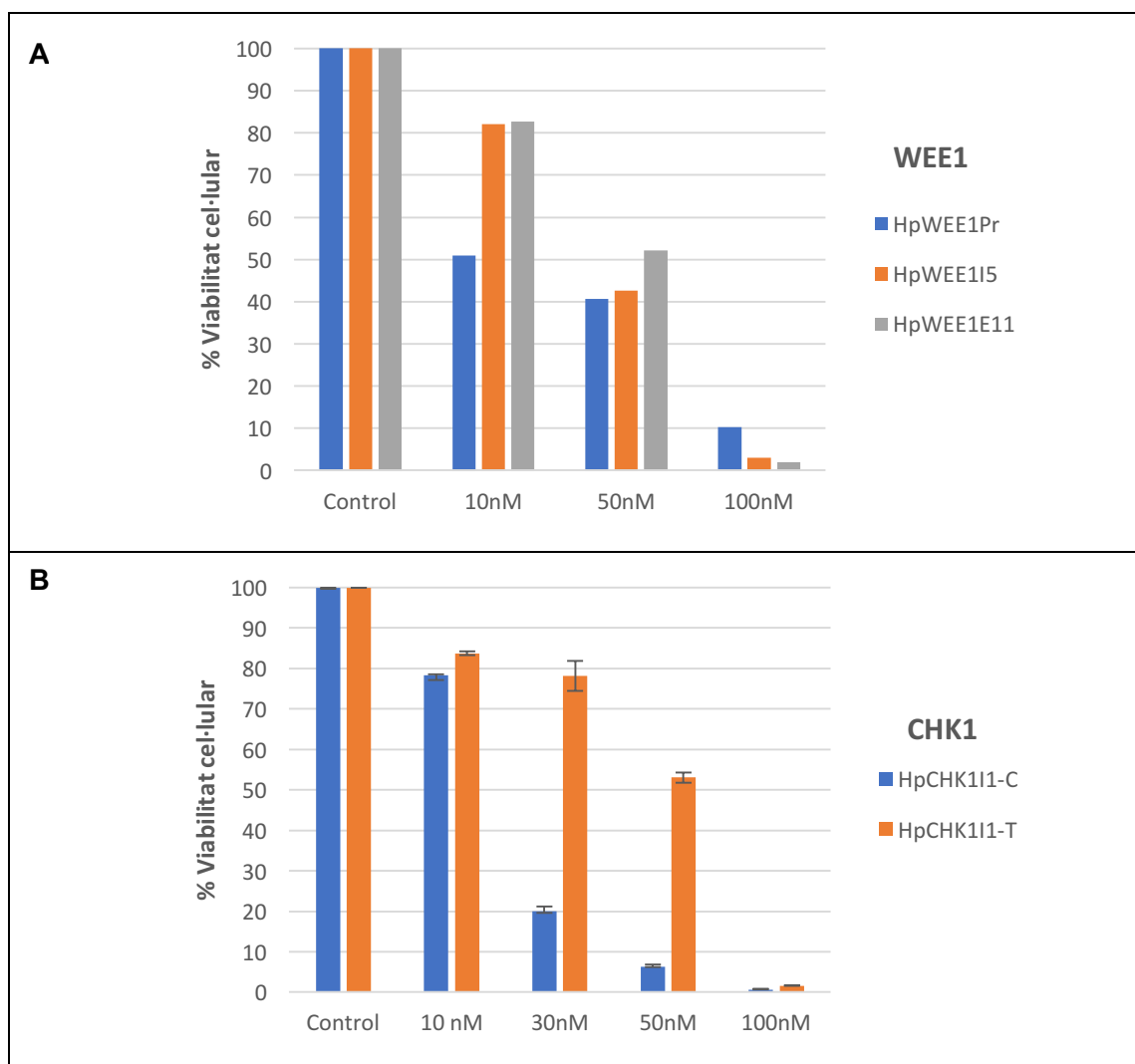


Figura 8: Assaig dosi-resposta. (A) Viabilitat de cèl·lules HeLa després d'inhibir el gen *WEE1* amb *HpWEE1Pr*, *HpWEE1I5* i *HpWEE1E11* a 10 nM, 50 nM i 100 nM. (B) Viabilitat de cèl·lules HeLa després d'inhibir el gen *CHK1* amb *HpCHK1I1-C* i *HpCHK1I1-T* a 10 nM, 30 nM, 50 nM i 100 nM. Les dades corresponen a la mitjana \pm SE.

Les figures 8A i 8B mostren com a mesura que s'augmenta la concentració, hi ha una disminució de la viabilitat cel·lular amb la inhibició d'ambdós gens, fet que demostra un efecte depenent de la concentració. L'estratègia diana-PPRH més efectiva va ser *CHK1*-*HpCHK1I1-C* (reducció del 95% de la viabilitat cel·lular a 50 nM PPRH i del 80% a 30 nM PPRH), seguit de *WEE1*-*HpWEE1Pr* (amb un 60% de reducció a 50 nM). A concentracions més baixes, cap PPRH va reduir més d'un 50% la viabilitat cel·lular, fet pel qual no es van considerar eficaços per sota d'aquestes concentracions.

Un cop fet l'assaig dosi-resposta, es va procedir a realitzar un estudi de temps-resposta, per tal de determinar el temps de contacte del PPRH necessari per produir

efecte. Aquest estudi es va realitzar a una concentració de 100nM PPRHs. Els medis de cultiu es van canviar a les 24 h, 48 h i 72 h de la transfecció. L'assaig MTT es va realitzar 6 dies després de la transfecció. HpWEE1Pr va mostrar una alta citotoxicitat a les 24 h. A més, tan HpCHK111-C com HpCHK111-T van produir una reducció de la viabilitat cel·lular de quasi el 100% a les 24 h (Figura 9). Imatges dels resultats de l'assaig de dependència amb els PPRHs dirigits contra CHK1 s'adjunta a l'annex I.

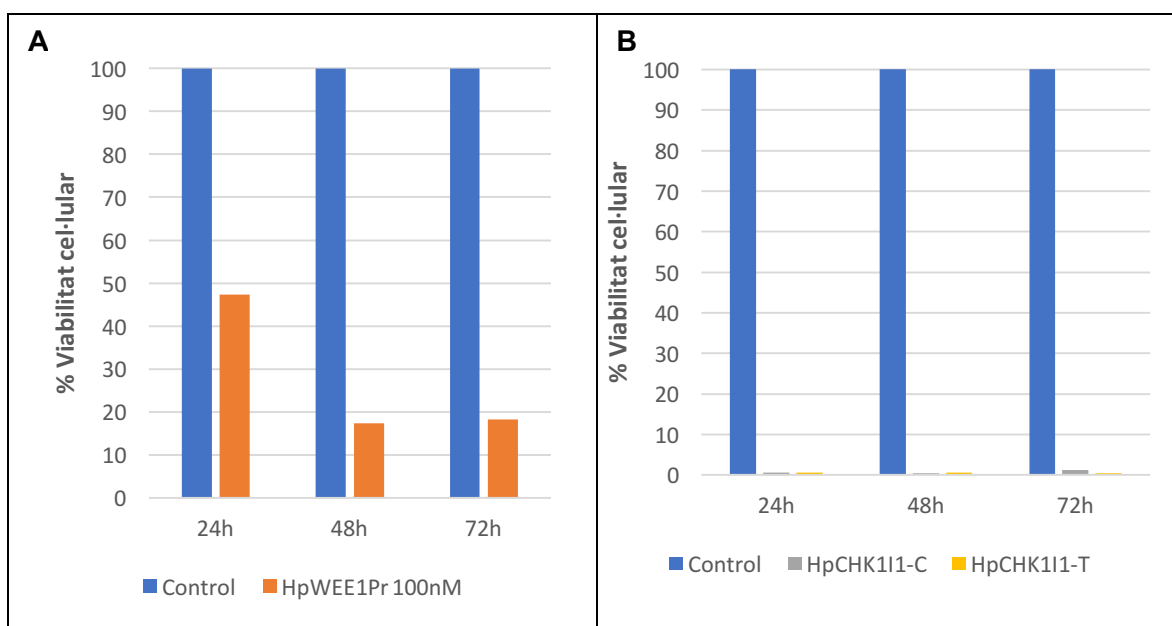


Figura 9: Dependència del temps. (A) Avaluació de la viabilitat cel·lular a les 24 h, 48 h i 72 h de transfectar cèl·lules HeLa amb HpWEE1Pr. (B) Avaluació de la viabilitat cel·lular a les 24 h, 48 h i 72 h de transfectar cèl·lules HeLa amb HpCHK111-C i HpCHK111-T.

6.3. Avaluació de l'efecte dels PPRHs en l'apoptosi.

6.3.1. Test Caspases 3/7.

L'assaig de caspasa 3/7 es va realitzar per analitzar si el mecanisme de mort cel·lular era degut a l'apoptosi. Aquest estudi es va realitzar de manera representativa per inhibició del gen *WEE1* amb HpWEE1Pr. Es va avaluar l'activitat de les caspases 7 i 8, enzims implicats en l'apoptosi, en cèl·lules HeLa 2 h, 4 h, 6 h i 8 h després de la transfecció. La selecció de les hores es va fer tenint en compte que a les 24 h ja es produïa una reducció de la viabilitat cel·lular important, i que en estudis amb rodamina no hi havia hagut augment en cèl·lules apoptòtiques a les 24 h (Annex I).

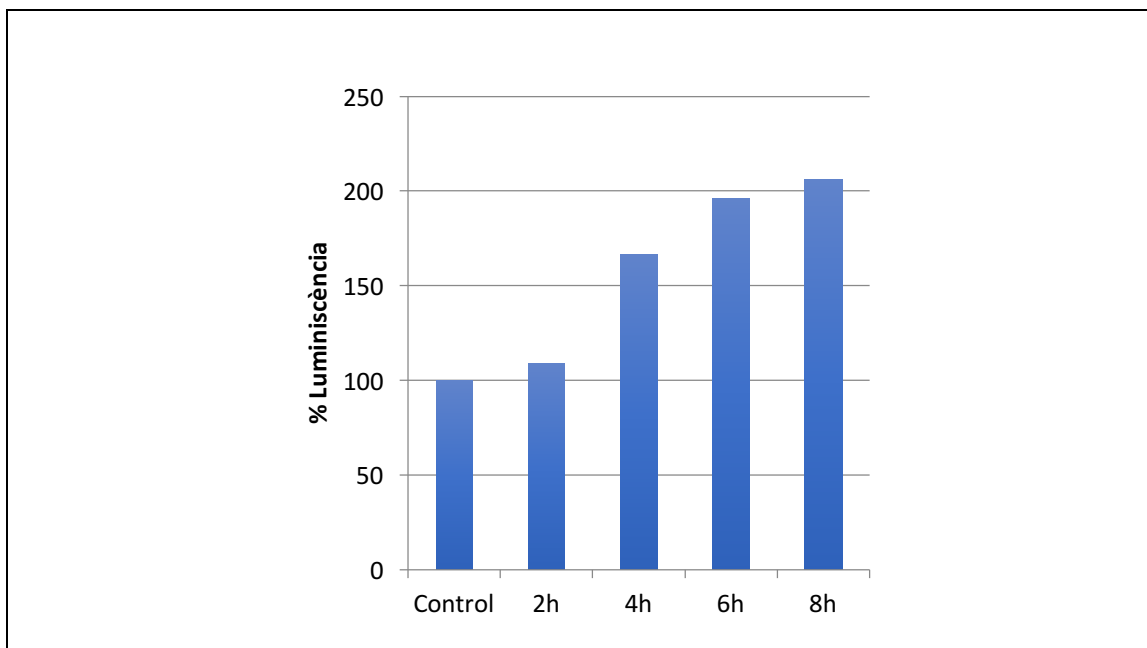


Figura 10: Percentatge de luminescència respecte al control en l'assaig Caspasa 3/7 a les 2 h, 4 h, 6 h i 8 h.

Les cèl·lules tractades amb HpWEE1Pr van mostrar un augment continuat de l'activitat de les caspases fins a les 8 h. En l'últim temps l'activitat es va duplicar respecte al control (Figura 10).

6.3.2. Mètode de rodamina.

Per tal d'avaluar el percentatge de població de cèl·lules vives, aptòtiques i necròtiques es va fer un estudi de l'apoptosi amb el mètode de rodamina. En el cas del gen *WEE1*, l'estudi es va fer a les 6 h, 15 h i 24 h amb cèl·lules HeLa (Annex II). El màxim percentatge de cèl·lules apoptòtiques es va trobar a les 15 h de ser transfectades amb els 3 PPRHs (Figure 11A).

Pel que fa a *CHK1*, es va estudiar l'apoptosi a les 15 h de la transfecció, ja que era el temps on l'apoptosi era major quan s'inhibia *WEE1* (Annex III). Els dos PPRHs dirigits contra *CHK1* van mostrar major percentatge de cèl·lules apoptòtiques que els dirigits contra *WEE1*. La pinça dirigida contra la cadena codificant (HpCHK1I1-C) va assolir el percentatge més alt (Figura 11C).

La relació d'apoptosi respecte al control va augmentar 4-5 vegades quan *WEE1* va ser inhibit amb HpWEE1Pr, HpWEE1I5 o HpWEE1E11 (Figura 11B), mentre que la relació

va augmentar 23,1 i 13,6 quan es va silenciar CHK1 amb HpCHK111-C i HpCHK111-T respectivament. (Figura 11D).

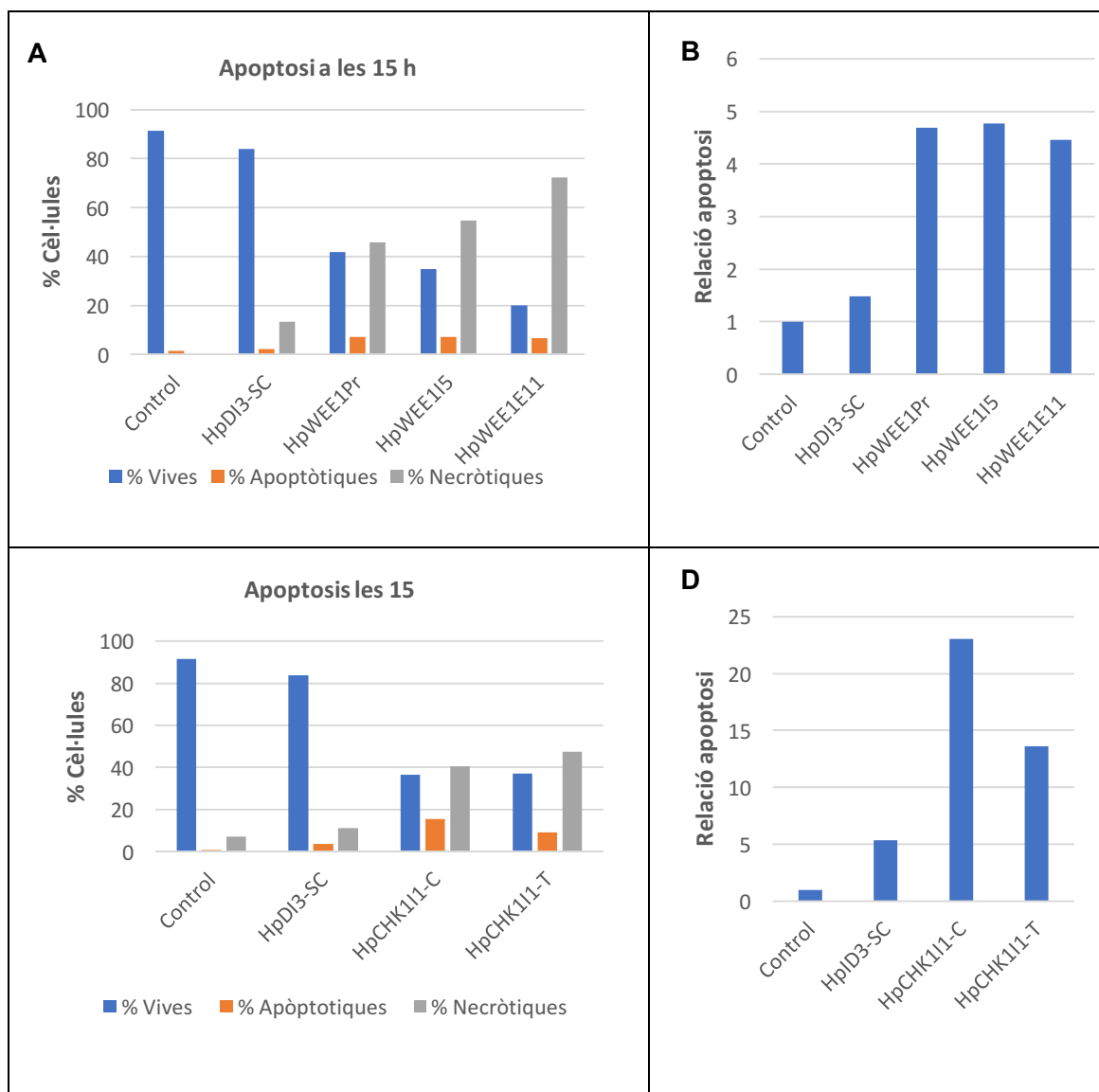


Figura 11: Avaluació de l'apoptosi pel mètode de la rodamina. (A) Percentatges de cèl·lules necròtiques, apoptòtiques i vives a les 15 h respecte al control amb els PPRHs dirigits contra el gen WEE1. (B) Relació de cèl·lules apoptòtiques respecte al control després d'inhibir el gen WEE1. (C) Percentatges de cèl·lules necròtiques, apoptòtiques i vives a les 15 h respecte al control amb els PPRHs dirigits contra el gen CHK1. (D) Relació de cèl·lules apoptòtiques respecte al control després d'inhibir el gen CHK1.

6.4. Avaluació dels primers dirigits contra el gen WEE1.

L'electroforesi de poliacrilamida mostra una banda que correspon a 150-200 bp (figura 12). La mida esperada del fragment amplificat era de 219 bp. Aquest resultat mostra que el parell de primers són específics de WEE1, i per tant, útils per a la realització d'una Real-Time PCR per a quantificar els nivells de mRNA de *WEE1*.

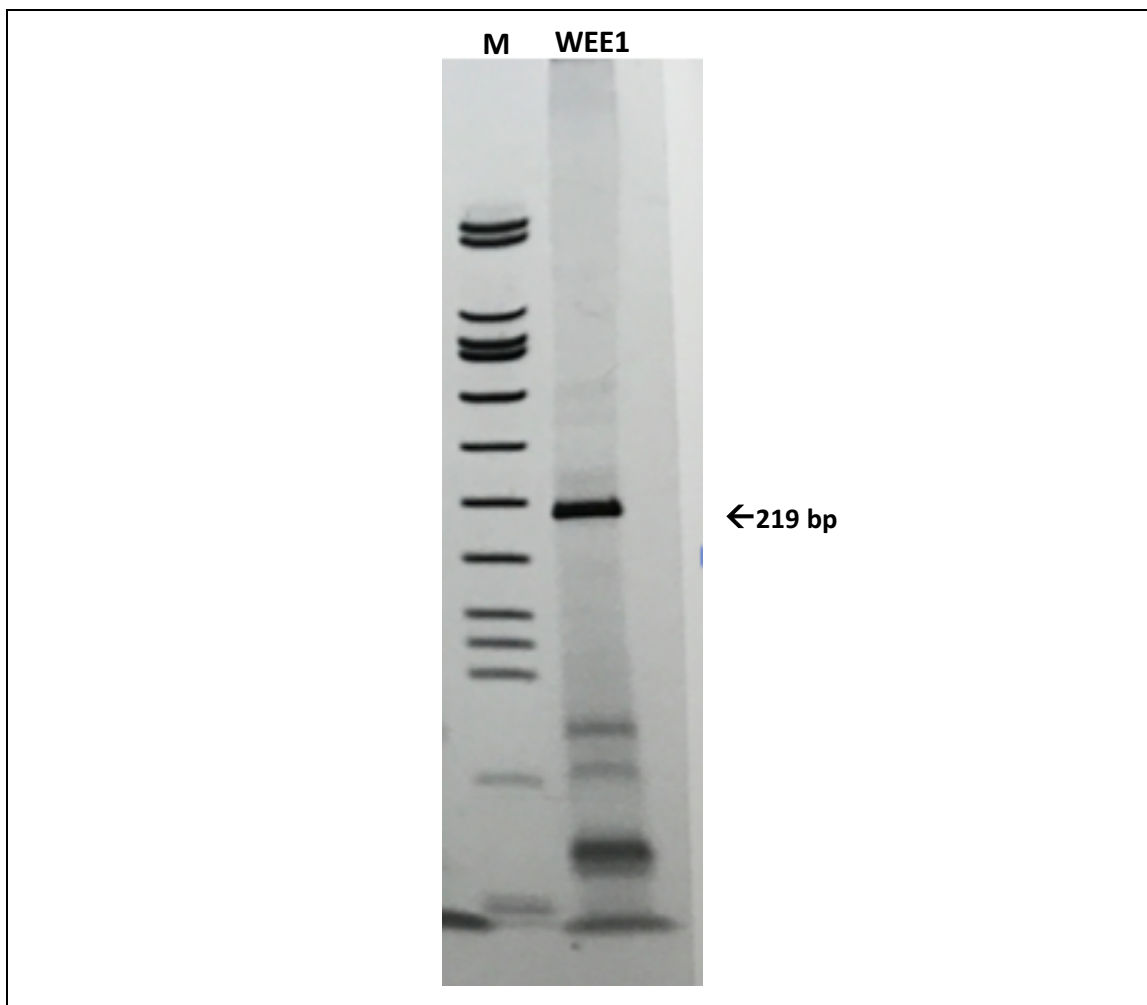


Figura 12: Electroforesi de poliacrilamida del fragment amplificat per PCR del gen *WEE1* amb els primers dissenyats. *M* correspon al carril carregat amb els marcadors (Roche #VIII) i *WEE1* al carregat amb el gen amplificat pels primers.

7. DISCUSSIÓ

Per mantenir la integritat del genoma, la cèl·lula necessita una resposta adequada a l'estrès genotòxic. La producció de dany en el DNA produeix l'activació del sistema de control del cycle cel·lular per tal de permetre'n la reparació. *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) i *ATR* (*ATM and Rad3-related*) són les quinases encarregades d'iniciar la resposta. Un cop activades, fosforilen i activen les quinases *CHK2* i *CHK1*. *CHK1* regula la fosfatasa *CDC25* i la quinasa *WEE1*, aquesta última produeix una fosforilació inhibidora de *CDK* i causa l'aturada del cycle cel·lular. El dany al DNA estabiliza la proteïna p53 i a conseqüència es transcriuen gens implicats en la reparació del DNA, l'aturada del cycle cel·lular i l'apoptosi (29,30).

El gen *WEE1* és necessari per fosforilar *CDK1* i parar el cycle cel·lular. Tanmateix, el gen *CHK1* està involucrat en l'aturada del cycle cel·lular mitjançant dos mecanismes. D'una banda, fosforila i activa el gen *WEE1*, per l'altra, fosforila i inactiva la fosfatasa *CDC25*. Per tant, aquests components de la via *ATR-CHK1* són essencials pel sistema de control cel·lular i la seva alteració està directament involucrada en el desenvolupament de càncer (Figura 13).

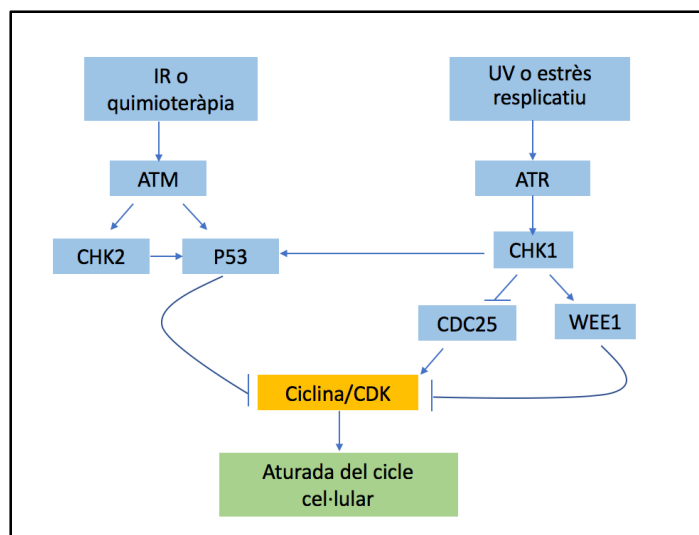


Figura 13: Vies implicades en la reparació del DNA. A l'esquerra la via *ATM-CHK2* i a la dreta la via *ATR-CHK1*.

L'objectiu d'aquest estudi era avaluar l'eficàcia dels PPRHs en el silenciament dels gens *WEE1* i *CHK1*. Cinc PPRHs (HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11, HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T), han resultat eficaços contra els seus respectius gens *in vitro* en diferents línies cel·lulars. La inhibició dels gens *WEE1* i *CHK1* per separat ha reduït la

viabilitat de cèl·lules HeLa més d'un 80%, fet que mostra que aquests components són vitals per la supervivència cel·lular i que la seva inhibició produeix la mort cel·lular.

Experiments de Real time PCR i Western Blot seran necessaris, per determinar que la citotoxicitat observada és deguda a una disminució de l'expressió dels gens, i per tant, s'haurà de detectar menor quantitat de mRNA i de proteïna. Actualment, per tal d'amplificar i quantificar el mRNA s'han dissenyat un parell de primers pel gen *WEE1* que han demostrat ser selectius. Tanmateix, es podria determinar tot utilitzant sondes TaqMan específiques per aquest gen.

Després de comparar l'efecte contra diferents regions del gen *WEE1* (HpWEE1Pr, HpWEE1I15 i HpWEE1E11), s'ha conclòs que el PPRH més efectiu és el dirigit contra la seqüència del promotor, encara que tots han mostrat activitat. En canvi, només dos PPRHs dels quatre dissenyats contra *CHK1* han sigut eficaços. Si bé HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T han mostrat una alta citotoxicitat, HpCHK1I10 i HpCHK1I13 només han produït una reducció d'entre el 30-40%. Aquest fet pot estar relacionat l'elevat nombre d'isoformes que presenta *CHK1* i al nombre d'introns que presenta cada isoforma (Figura 3B). Quan *CHK1* és inhibit pel PPRH dirigit contra l'intró 13, les isoformes més curtes podrien mantenir la funció del gen. Aquest fet podria explicar perquè el PPRH dirigit contra un intró proper a 3' no té activitat, i en canvi, aquells dirigits a llocs propers de l'intró 1 tenen una alta citotoxicitat.

L'estratègia PPRH-diana més efectiva ha estat la dirigida a *CHK1* amb HpCHK1I1-C. Aquesta ha produït una reducció de la viabilitat cel·lular de més del 80% a 3 nM PPRH. Passades 24 h de la transfecció, la inhibició de *CHK1* amb els dos PPRHs ha produït una reducció de la viabilitat cel·lular de quasi el 100% a 100 nM. Aquest fet suggereix que l'efecte és més ràpid l'inhibir *CHK1* amb HpCHK1I1 o HpCHK1I1-T que *WEE1* amb HpWEE1Pr. Caldria fer estudis de dependència del temps a concentracions més baixes en el cas de *CHK1*.

L'assaig Caspa 3/7, ha confirmat un augment en l'activitat de les caspases, el que demostra l'activació d'enzims relacionats amb l'apoptosi, i per tant, suggereix que l'apoptosi està implicada en el procés de mort cel·lular quan hi ha supressió de *WEE1*. L'augment de l'activitat de les caspases s'observa fins a les 8 hores, sent necessaris estudis de més llarga durada per a saber quan s'arriba a l'activitat màxima.

En l'estudi de l'apoptosi amb rodamina, s'ha comprovat que a les 6 h, temps en què les caspases ja han augmentat l'activitat, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques és mínim, havent-hi un retràs entre l'activació dels efectors i l'apoptosi (Annex II). A les 15 h se situa el màxim de cèl·lules apoptòtiques. A les 24 h el nombre de cèl·lules apoptòtiques disminueix i augmenta el de necròtiques, fet que indica que l'apoptosi es produeix al voltant de les 15 h (Figura 11).

Paral·lelament, els estudis de rodamina han mostrat un major grau d'apoptosi a les 15 h amb la inhibició del gen *CHK1*. Estudis a diferents temps, al voltant de les 15 h, serien necessaris per trobar el temps on es troba el màxim percentatge de cèl·lules apoptòtiques en els dos casos i poder comparar els màxims.

La pèrdua de funció del gen *WEE1* i *CHK1* produeix una discapacitat en la progressió del cicle cel·lular, conseqüentment, una disminució en la quantitat de cèl·lules viables. Estudis on es quantifiqués el número de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular, després d'inhibir *WEE1* i *CHK1*, serien necessaris per a comprovar en quina fase es troben principalment involucrats aquests gens.

La inhibició de components de la via *ATR-CHK1*, com *WEE1* i *CHK1*, han demostrat ser de gran eficàcia contra diferents línies cel·lulars. Això fa pensar que la inhibició d'aquesta via pot ser de gran utilitat en teràpia contra el càncer. Per aquest motiu s'ha proposat el gen *ATR* com una altra possible diana d'aquesta via (Figura 13). En la taula 4 es proposa el disseny d'un PPRH dirigit contra *ATR* que servirà per a futurs estudis amb aquesta nova diana.

Nom	Estructura
HpATRI35	5'- GGAG C GAGAGAGAAGAGAGGGAGGAAGGAGA 3'- GGAG C GAGAGAGAAGAGAGGGAGGAAGGAGA

Taula 4: Disseny de primers dirigits contra el gen *ATR*. Interrupcions marcades en vermell.

8. CONCLUSIONS

Tenint en compte els resultats d'aquest estudi, es pot concloure:

- 1) Els gens *WEE1* i *CHK1*, que participen en l'aturada del cicle cel·lular en cas de dany en el DNA, són dianes potencials en teràpia gènica contra el càncer, tal com ha demostrat la seva inhibició amb PPRHs.
- 2) Les pinces de polipurines dissenyades contra el promotor, l'intró 5 i l'exó 11 han resultat ser una eina eficaç per a silenciar l'expressió gènica de *WEE1*. En el cas de *CHK1* només els dirigits contra l'intró 1 han sigut eficaços, tot destacant la potència de HpCHK1I1-C.
- 3) El tractament amb els PPRHs produeix un augment en la població de cèl·lules apoptòtiques acompanyat d'una disminució en la viabilitat cel·lular.

9. BIBLIOGRAFIA

1. WHO World Health Organization | Cancer [Internet]. World Health Organization; February 2017 [cited 13 March 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer.
3. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3):962-70.
4. Sørensen CS, Syljuåsen RG. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(2):477-86.
5. Vriend LE, De Witt Hamer PC, Van Noorden CJ, Würdinger T. WEE1 inhibition and genomic instability in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1836(2):227-35.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 5a ed. Barcelona: Omega;2010. p. 1060-1067.
7. Vera J, Raatz Y, Wolkenhauer O, Kottek T, Bhattacharya A, Simon JC, Kunz M. Chk1 and Wee1 control genotoxic-stress induced G2-M arrest in melanoma cells. *Cell Signal*. 2015;27(5):951-60.
8. Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. Targeting WEE1 kinase in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(10):872-881.
9. Zhang Y, Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer*. 2014;134(5):1013-23.
10. Mak JP, Man WY, Ma HT, Poon RY. Pharmacological targeting the ATR-CHK1-WEE1 axis involves balancing cell growth stimulation and apoptosis. *Oncotarget*. 2014;5(21):10546-57.
11. Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute [Internet]. National Cancer Institute; 6 April 2017 [cited 20 March 2017]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.
12. Baudino TA. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*. 2015;12(1):3-20.
13. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009;1(2):1-4.
14. Abdulkareem IH, Zurmi IB. Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract*. 2012;15(1):9-14.
15. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860–921.
16. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304–1351.

17. Buchsbaum JD, Curiel DT. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004;16(4): 275-288.
18. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther.* 2014;2:27-46.
19. Baban CK, Cronin M, O'Hanlon D, O'Sullivan GC, Tangney M. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioeng Bugs.* 2010;1(6):385-394.
20. Lundin KE, Gissberg O, Smith CIE. Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum Gene Ther.* 2015;26(8):475-485.
21. Sridharan K, Gogtay NJ. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82(3):659-72.
22. Khorkova O, Wahlestedt C. Oligonucleotide therapies for disorders of the nervous system. *Nat Biotechnol.* 2017;35(3):249-263.
23. de Almagro MC, Coma S, Noé V, Ciudad CJ. Polypurine hairpins directed against the template strand of DNA knock down the expression of mammalian genes. *J Biol Chem.* 2009;284(17):11579-89.
24. Villalobos X, Rodríguez L, Solé A, Lliberós C, Mencia N, Ciudad CJ, et al. Effect of Polypurine Reverse Hoogsteen Hairpins on Relevant Cancer Target Genes in Different Human Cell Lines. *Nucleic Acid Ther.* 2015;25(4):198-208.
25. Rodríguez L, Villalobos X, Dakhel S, Padilla L, Hervas R, Hernández JL, et al. Polypurine reverse Hoogsteen hairpins as a gene therapy tool against survivin in human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(11):1541-54.
26. Villalobos X, Rodríguez L, Prévot J, Oleaga C, Ciudad CJ, Noé V. Stability and immunogenicity properties of the gene-silencing polypurine reverse Hoogsteen hairpins. *Mol Pharm.* 2014;11(1):254-64.
27. de Almagro MC, Mencia N, Noé V, Ciudad CJ. Coding polypurine hairpins cause target-induced cell death in breast cancer cells. *Hum Gene Ther.* 2011;22(4):451-63.
28. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research.* 2016;44 (Database issue):D7-D19.
29. Meek DW. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2004;3(8-9):1049-56.
30. Medema RH, Macurek L. Checkpoint control and cancer. *Oncogene.* 2012;31(21):2601-13.

10. AGRAÏMENTS

Quan vaig començar el grau de Farmàcia em vaig interessar en la teràpia gènica. Voldria donar les gràcies al Departament de Bioquímica i Fisiologia per donar-me l'oportunitat de col·laborar en la recerca d'una nova eina de modulació gènica i augmentar el meu coneixement de genètica. En concret voldria expressar el meu agraïment al meu equip de laboratori per permetre'm desenvolupar el meu propi projecte i per guiar-me tant en els aspectes tècnics com intel·lectuals.

ANNEX I

Assaig dependència del temps



Figura Annex I: Resultats MTT dependència del temps. Viabilitat cel·lular a les 24 h, 48 h i 72 h després de la transfecció de cèl·lules HeLa amb HpCHK111-C, HpCHK111-T i HpDI3-SC. Cnt: Control, T: HpCHK111-T, SC: HpDI3-SC, C: HpCHK111-C.

ANNEX II:

Determinació de l'apoptosi pel mètode de rodamina i citometria de flux amb supressió del gen WEE1.

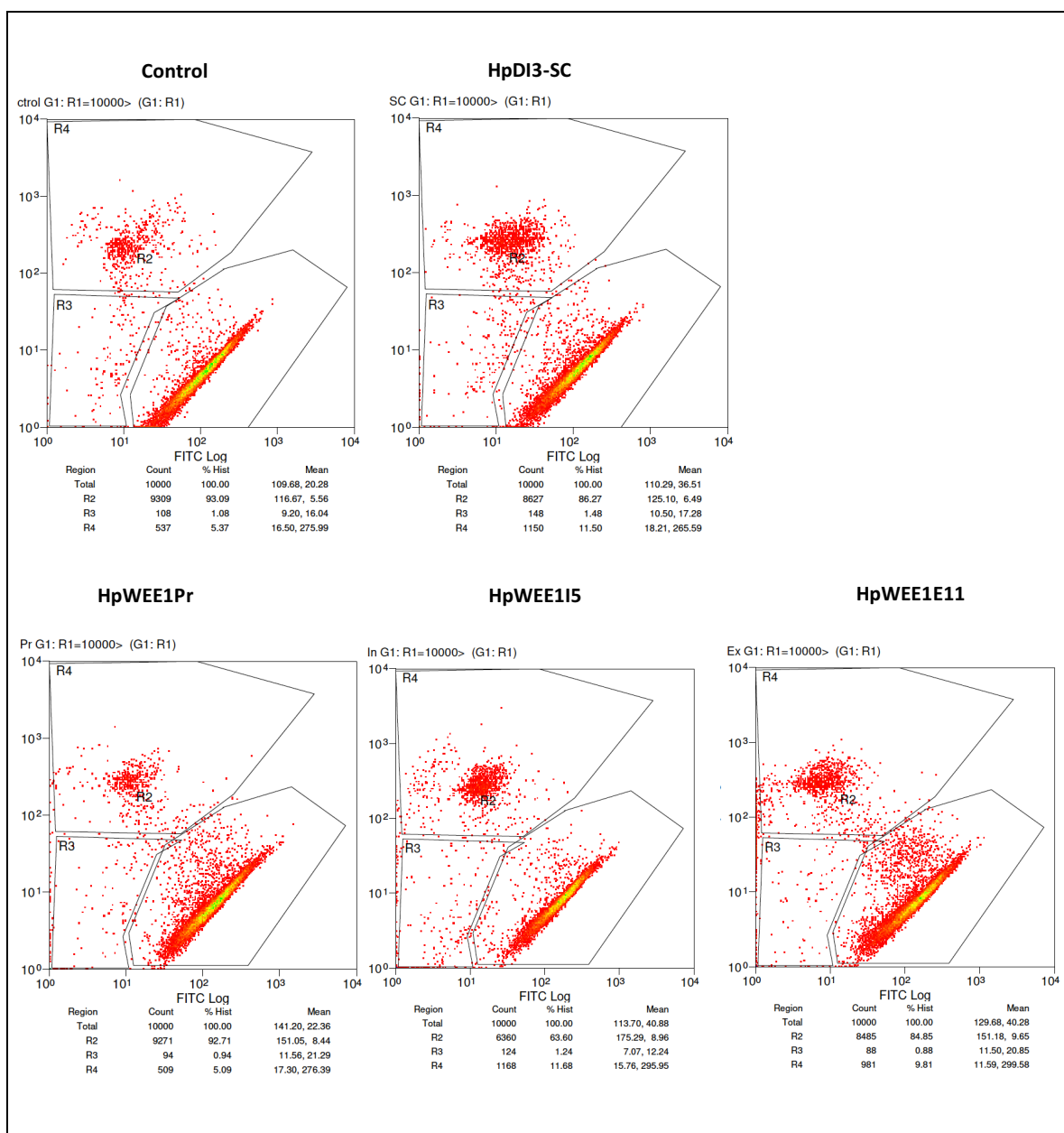


Figura Annex II.I: Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11 després de 6 h. Les cèl·lules negatives per iodur de propidi i rodamina corresponen a les cèl·lules apoptòtiques i es localitzen en la secció R3 dels gràfics. Les cèl·lules negatives per rodamina i positives per iodur de propidi són la població de cèl·lules necròtiques. Finalment, les cèl·lules positives per rodamina i negatives per iodur de propidi corresponen a la població de cèl·lules vives.

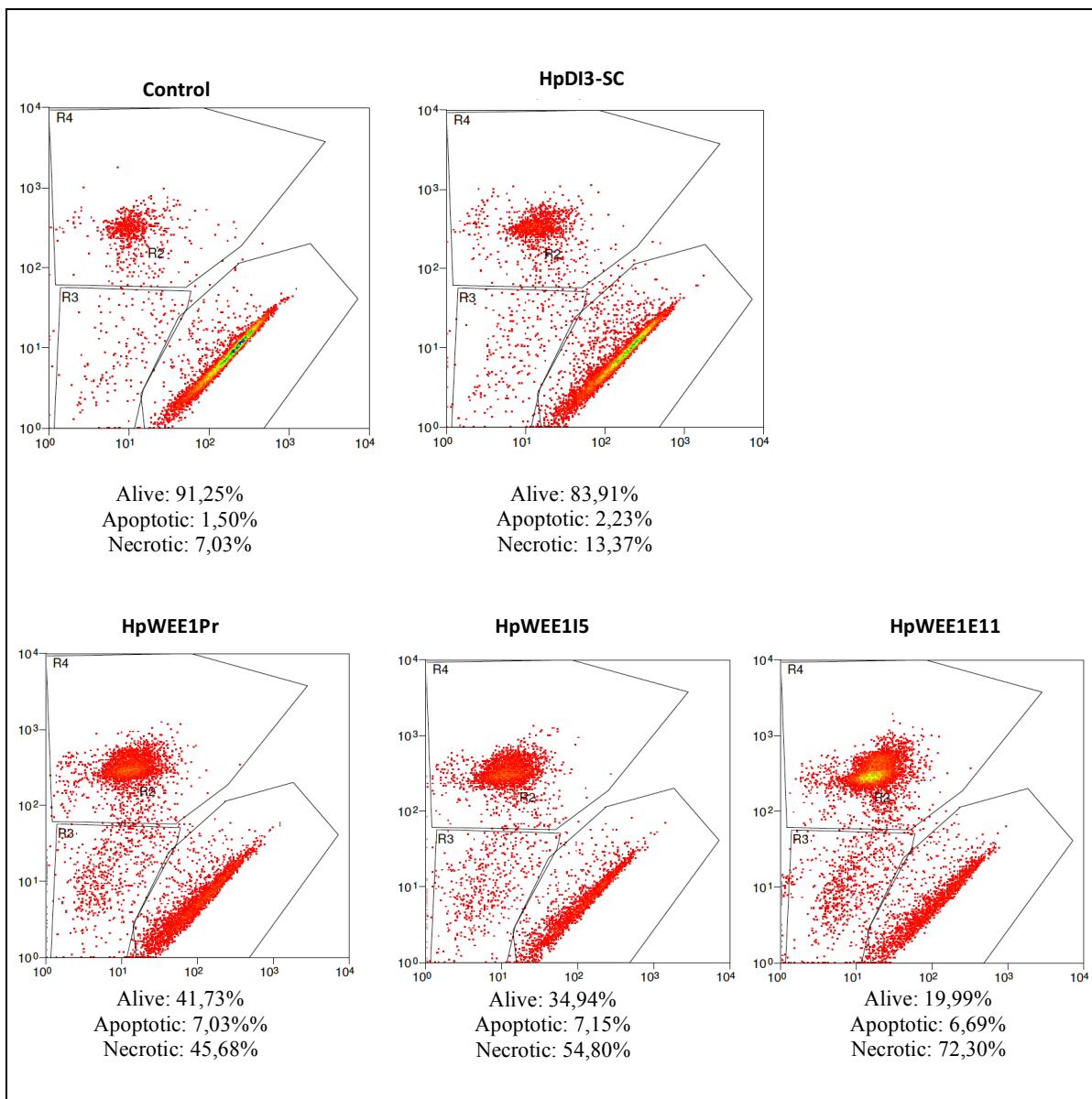


Figura Annex II.II: Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11 després de 15 h. Les cèl·lules negatives per iodur de propidi i rodamina corresponen les cèl·lules apoptòtiques i es localitzen en la secció R3 dels gràfics. Les cèl·lules negatives per rodamina i positives per iodur de propidi són la població de cèl·lules necròtiques. Finalment, les cèl·lules positives per rodamina i negatives per iodur de propidi corresponen a la població de cèl·lules vives.

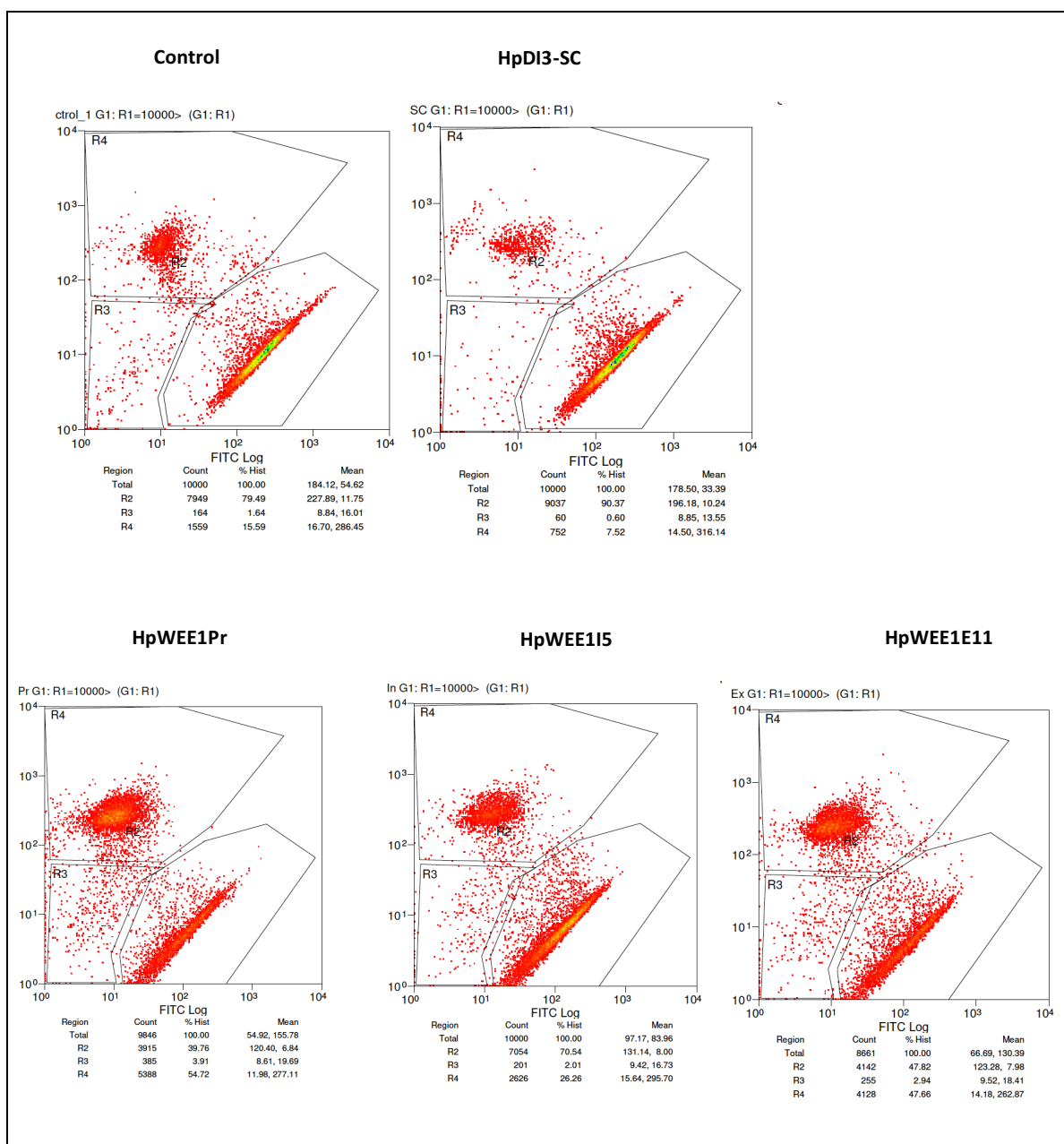


Figura Annex II.III: Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC HpWEE1Pr, HpWEE115 i HpWEE1E11 després de 24 h. Les cèl·lules negatives per iodur de propidi i rodamina corresponen a les cèl·lules apoptòtiques i es localitzen en la secció R3 dels gràfics. Les cèl·lules negatives per rodamina i positives per iodur de propidi són la població de cèl·lules necròtiques. Finalment, les cèl·lules positives per rodamina i negatives per iodur de propidi corresponen a la població de cèl·lules vives.

ANNEX III:

Determinació de l'apoptosi pel mètode de rodamina i citometria de flux amb supressió del gen *CHK1*.

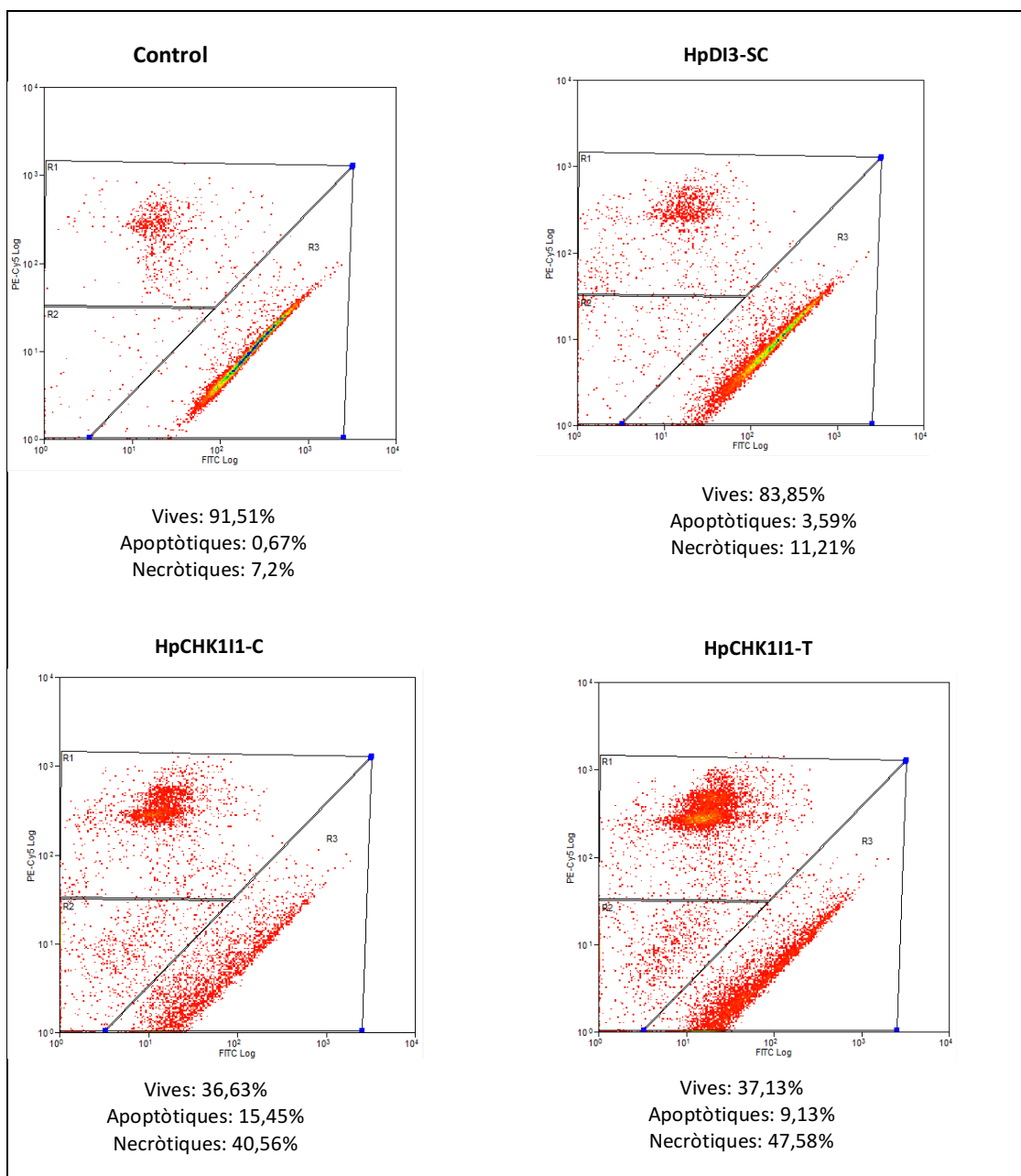


Figura Annex III: Resultats citometria de flux de cèl·lules HeLa transfectades amb HpDI3-SC, HpCHK111-C i HpCHK111-T després de 15 h. Les cèl·lules negatives per iodur de propidi i rodamina corresponen les cèl·lules apoptòtiques i es localitzen en la secció R3 dels gràfics. Les cèl·lules negatives per rodamina i positives per iodur de propidi són la població de cèl·lules negròtiques. Finalment, les cèl·lules positives per rodamina i negatives per iodur de propidi corresponen a la població de cèl·lules vives.