Edusfarm 9 *(2017), 41-58*
ISSN: 1886-6271

Rebut: 18 d'octubre de 2017
Acceptat: 27 d'octubre de 2017

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

AUBETS, Eva[1]; CIUDAD, Carlos J.
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia
Av. Joan XXII, núm. 27, 08028 Barcelona

Abstract
Replication stress activates the *ATR-CHK1* pathway to produce cell cycle arrest and provide enough time to repair DNA damage. Alteration of this checkpoint can lead to the development of illnesses such as cancer. In this study, we investigated the inhibition of genes involved in the *ATR-CHK1* pathway, like *WEE1* and *CHK1*, using polypurine reverse Hoogsteen hairpins (PPRHs).

Five PPRHs directed against different regions of *WEE1* and *CHK1* showed a high decrease in cell viability in different cell lines. Furthermore, inhibition of both genes triggered an increase in the percentage of apoptotic cells.

We concluded that the inhibition of components from the *ATR-CHK1* pathway by PPRHs was proven to be highly effective, and therefore may constitute a possible new approach in anti-cancer gene therapy.

Keywords: PPRH, cancer, gene silencing, apoptosis.

Resumen
El estrés replicativo produce una activación de la vía *ATR-CHK1* que permite la parada del ciclo celular y reparación del DNA. La alteración de este punto de control puede desencadenar el desarrollo de enfermedades como el cáncer. En el presente estudio se investigó la inhibición de genes involucrados en la vía *ATR-CHK1*, como *WEE1* y *CHK1*, mediante pinzas de polipurinas (PPRH).

Cinco PPRH dirigidas contra diferentes regiones de los genes *WEE1* y *CHK1* revelaron una destacada disminución de la viabilidad celular en diferentes líneas celulares. Además, la inhibición de ambos genes desencadenó un aumento del porcentaje de células apoptóticas.

Concluimos que la inhibición de componentes de la vía ATR-CHK1 mediante PPRH ha demostrado ser de gran eficacia y, por lo tanto, podría ser una nueva aproximación en terapia génica anticancerosa.

Palabras clave: PPRH, cáncer, silenciamiento génico, apoptosis.

Resum
L'estrès replicatiu produeix una activació de la via *ATR-CHK1* que permet l'aturada del cicle cel·lular i la reparació del DNA. 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*, com *WEE1* i *CHK1*, mitjançant pinces de polipurines (PPRH).

Cinc PPRH dirigides contra diferents regions dels gens *WEE1* i *CHK1* van produir una destacada disminució de la viabilitat cel·lular en diferents línies cel·lulars. Tanmateix, la inhibició d'ambdós gens va desencadenar un augment del percentatge de cèl·lules apoptòtiques.

Concloem que la inhibició de components de la via *ATR-CHK1* mitjançant PPRH ha demostrat ser de gran eficàcia, i per tant, podria ser una possible nova aproximació en teràpia gènica anticancerosa.

Paraules clau: PPRH, càncer, silenciament gènic, apoptosi.

[1] Graduada en farmàcia (eva395@msn.com).

©Universitat de Barcelona

1. Introducció

Segons l'Organització Mundial de la Salut, el càncer és la segona causa major de mort després de les malalties cardiovasculars. L'any 2015, 8,8 milions de persones van morir a causa del càncer; això significa que, de cada sis persones que moren al món, una és a causa del càncer (WHO, 2017).

El càncer és el resultat d'un creixement continu incontrolat de les cèl·lules. Aquest procés pot afectar qualsevol línia cel·lular del cos; conseqüentment, es coneixen més de cent tipus de tumors. N'existeixen dos, benignes i malignes, però només els darrers són considerats càncer per la seva capacitat invasora i metastàtica (Cooper, 2000).

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, en conseqüència, al desenvolupament de malalties com el càncer (Sørensen i Syljuåsen, 2012). 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 (Vriend *et al.*, 2013).

1.1. Sistema de control del cicle cel·lular

El sistema de control del cicle cel·lular està constituït per un conjunt d'interruptors bioquímics connectats que 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 (Alberts *et al.*, 1983). Per tant, són necessaris sistemes de control del cicle cel·lular i de reparació del DNA per a una correcta proliferació i supervivència (Vera *et al.*, 2015).

Hi ha tres punts principals de control: inici (G1), entre el pas de la fase G2 a mitosi (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 (Alberts *et al.*, 2010).

Els principals components del sistema de control són les proteïnes quinases dependents de ciclina (Cdk: *cyclin-depenent 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 ciclines (dites així perquè són sintetitzades i degradades segons l'etapa del cicle cel·lular de manera cíclica). Hi ha quatre tipus de ciclines, classificades segons l'estadi del cicle en què s'uneixen a Cdk (taula 1) (Alberts *et al.*, 2010).

Taula 1. Classificació de les ciclines i les Cdk segons la fase del cicle cel·lular en què estan implicades principalment (Alberts *et al.*, 2010).

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

©Universitat de Barcelona

La unió de ciclines a Cdk permet que el centre actiu quedi al descobert, fet que produeix una activació parcial de Cdk. Per a l'activació total de Cdk és necessària 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 (Alberts *et al.*, 2010).

1.1.1. 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 de provocar l'entrada a la mitosi. L'estat de fosforilació de *CDK1* és controlat per:

- Dues 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* (Matheson *et al.*, 2016).

1.1.2. Via ATR-CHK1

Quan es produeix dany en el DNA s'activa la via *ATR-CHK1*, que 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 la quinasa *CHK1* (*Checkpoint Kinase 1*). *CHK1* està involucrada en l'aturada del cicle cel·lular mitjançant dos mecanismes: d'una banda, l'estimulació de la quinasa *WEE1*, i de l'altra, la inactivació de la fosfatasa *CDC25* (Zhang i Hunter, 2014).

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) (Sørensen i Syljuåsen, 2012; Vriend *et al.*, 2013; Mak *et al.*, 2014).

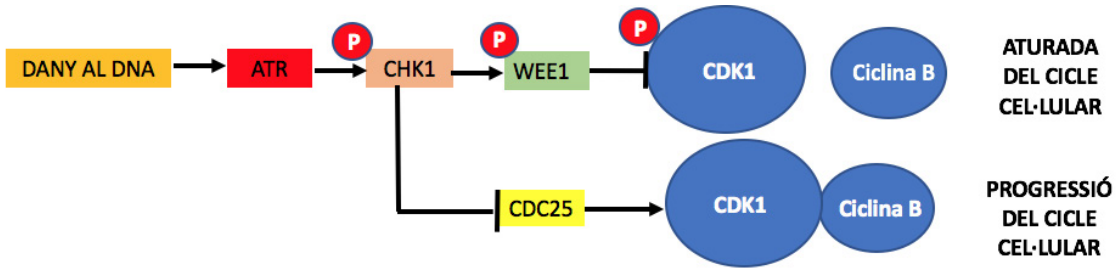


Figura 1. Via *ATR-CHK1* implicada en la reparació de dany al DNA. Font: representació esquemàtica adaptada de Matheson *et al.* (2016).

©Universitat de Barcelona

Per tant, quan es produeix dany en el DNA, el gen *WEE1* participa en l'aturada del cicle cel·lular per tal de proporcionar temps suficient 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 provocant la mort cel·lular.

El gen *WEE1* està sobreexpressat en diversos càncers com el glioblastoma, l'osteosarcoma, el melanoma, el càncer de pit o de còlon (Vriend *et al.*, 2013; Matheson *et al.*, 2016). El gen *CHK1* també és expressat en alts nivells en càncers com els de còlon, pit, fetge o nasofaringe (Zhang i Hunter, 2014).

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

1.2. Modulació de l'expressió gènica amb PRRHs

Recentment, s'han dissenyat unes noves molècules silenciadores anomenades pinces de polipurines (*Polypurine reverse Hoogsteen hairpins*, PPRH). S'ha estudiat l'habilitat d'aquestes molècules per silenciar diversos gens relacionats amb el càncer, com el de la survivina, dihidrofalat reducatasa i telomerasa (Villalobos *et al.*, 2015), i han demostrat eficàcia tant *in vitro* com *in vivo* (Rodríguez *et al.*, 2013).

Existeixen altres molècules de silenciament gènic com el siRNA. En estudis comparatius amb siRNA s'ha demostrat que els PPRH presenten diversos avantatges importants, com la millora de l'estabilitat o una baixa immunogenicitat, i més econòmics que els siRNA (Villalobos *et al.*, 2014).

Els PPRH 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, cosa 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 tríplex (Rodríguez *et al.*, 2013).

Els PPRH es poden unir tant a la cadena codificant com a la cadena motlle. Els PPRH dissenyats 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 PPRH dissenyats contra la cadena codificant poden unir-se al DNA i al mRNA tot impedint la unió de factors d'empalmament (figura 2) (Rodríguez *et al.*, 2013; Almagro *et al.*, 2011).

2. 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 dels gens *WEE1* i *CHK1* i realitzar una anàlisi comparativa dels PPRH dissenyats contra diferents regions.
3. Analitzar l'efecte de la inhibició dels gens *WEE1 i CHK1* pels PPRH sobre la viabilitat cel·lular i investigar si l'apoptosi forma part del mecanisme d'acció aquestes pinces de polipurines.

©Universitat de Barcelona

Edusfarm 9 (2017), 41-58
ISSN: 1886-6271

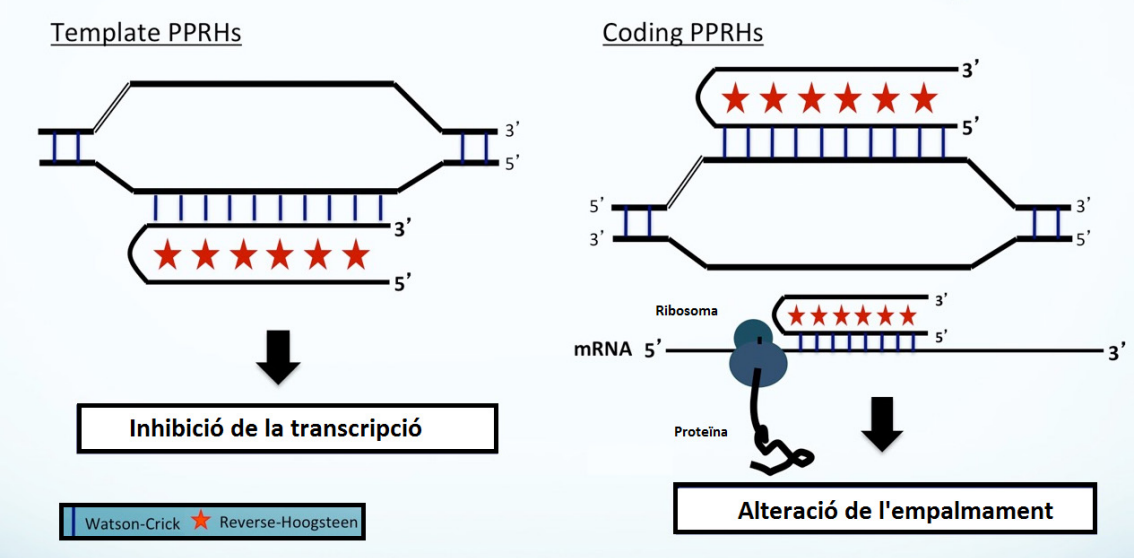


Figura 2. Mecanisme d'inhibició dels gens pels PRRHs. A l'esquerra, en el cas de PPRH dirigits contra la cadena motlle (Template PPRH), i a la dreta, contra la cadena codificant (Coding PPRH).

3. Material i mètodes

3.1. Cultius cel·lulars

En aquest estudi es van utilitzar les línies cel·lulars següents: HeLa (càncer de cèrvix-uterí humà), MCF7 (càncer de mama humà), SKBR3 (càncer de mama humà), PC3 (càncer de pròstata humà). Aquestes línies 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 CO_2.

3.2. Disseny de PPRH

Per al disseny de PPRH és essencial trobar una seqüència de polipurines. Aquestes es troben principalment en regions no codificants, com és el cas de promotors i introns (Almagro *et al.*, 2009). Es va utilitzar el software Triplex-forming Oligonicleotide Target Sequence Search (http://utw10685.utweb.utexas.edu/tfo/), eina que permet la cerca de seqüències de polipurines en el gen seleccionat que formaran les cadenes antiparal·leles del PPRH.

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

A la taula 2 es mostren les seqüències dels PPRH dissenyats contra el gen *WEE1* (HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11) i de tres controls negatius utilitzats (HpmycI1-SC, HpDI3-SC, HpWEE1Pr-WC). En la figura 3 s'indiquen les regions d'unió dels tres PPRH en el gen WEE1. Van ser sintetitzats per Sigma-Aldrich com a oligodeoxinucleòtids no modificats. Els oligonucleòtids liofilitzats es van resuspendre a la concentració d'1 mM en tampó estèril Tris-EDTA (1mM d'EDTA i 10mM de Tris, a pH 8,0) i es van emmagatzemar a –20°C.

©Universitat de Barcelona

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

Nom	Gen	Estructura
HpWEE1Pr-T	***WEE1***	5'- GGGACGAGGGGCAAGAAGCGG TTTT 3'- GGGACGAGGGGCAAGAAGCGG T
HpWEE1I5-C	***WEE1***	5'- GGGAGAGGAGGGAGAGACGACAAG TTTT 3'- GGGAGAGGAGGGAGAGACGACAAG T
HpWEE1E11-C	***WEE1***	5'- GGGAGGTGGGAAAGGAGTAG TTTT 3'- GGGAGGTGGGAAAGGAGTAG T
HpCHK1I10-T	***CHK1***	5'- AAGGAAGAAAGAGAGGAGGGAGG TTTT 3'- AAGGAAGAAAGAGAGGAGGGAGG T
HpCHK1I13-C	***CHK1***	5'- AGGTGAGGAGGATAGGCAGA TTTT 3'- AGGTGAGGAGGATAGGCAGA
HpCHK1I1-T	***CHK1***	5'- GTGGATGAGATAGAAGGGGAAGG TTTT 3'- GTGGATGAGATAGAAGGGGAAGG T
HpCHK1I1-C	***CHK1***	5'- GGGAAGGAGGAGGGAGAGGTGGG TTTT 3'- GGGAAGGAGGAGGGAGAGGTGGG T
HpmycI1-SC	***MYC***	5'-AGAGAAGAGGAAGAGAGGAAAGAGAGGAAGAGGA TTTT 3'- AGAGAAGAGGAAGAGAGGAAAGAGAGGAAGAGGA T
HpDI3-SC	***DHFR***	5'- GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA TTTT 3'- GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA T
HpWEE1Pr-WC	***WEE1***	5'- GGGACGAGGGGCAAGAAGCGG TTTT 3'- GGGACGAGGGGCAAGAAGCGG T

3.3. Transfecció dels PPRH

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 metilsulfat, Biontex). És un liposoma catiònic que, en contacte amb el DNA, forma espontàniament complexos 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 PPRH per a la transfecció és 1:100 (Almagro, 2009 *et al.*). En el cas dels estudis dosi-resposta, la concentració més baixa

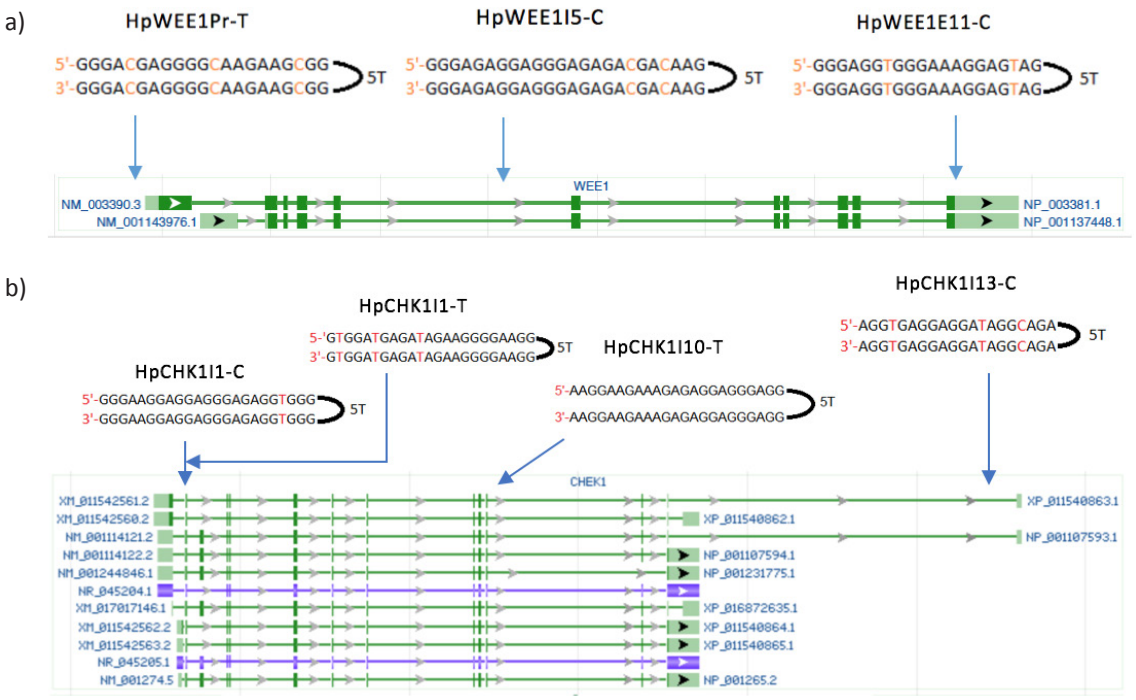


Figura 3. Unió dels PPRH al seu gen. (A) Representació esquemàtica del gen *WEE1* i les seves isoformes. (B) Representació esquemàtica del gen *CHK1* i les seves isoformes. Les fletxes blaves indiquen on s'uneixen els PPRH dissenyats. Les línies més gruixudes representen els exons i les més primes, els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

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 aquest 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.

3.4. 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 al cap de 24 h van ser transfectades. Cinc dies després de la transfecció es van 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 reti-

©Universitat de Barcelona

rar el medi i s'hi va afegir la solució de lisi (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 lisi 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).

3.5. Determinació de l'apoptosi

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

3.5.1. Assaig amb caspasa 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 implicats en l'apoptosi. Es van 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-hi 50 µl del reactiu Caspase-Glo 3/7 (relació 1:1 medi i reactiu). Seguidament, es va deixar incubar 1 h i es va mesurar la luminescència utilitzant el luminòmetre Modulus™ 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.

3.5.2. Mètode de rodamina

En el cas de rodamina, es van sembrar 60.000 cèl·lules i es van transfectar després de 24 h. Es va afegir rodamina 123 (Sigma-Aldrich) al cap de 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 × g a 4°C durant 5 minuts. El pèl·let es va netejar amb PBS (*Phosphate buffered saline*) 1x. A continuació, el pèl·let es va resuspendre en 500 µl de PBS 1x fred i s'hi va afegir iodur de propidi (Sigma-Aldrich) a una concentració final de 5 µg/ml. Finalment, es va realitzar l'anàlisi amb el citòmetre CyAn™ ADP (Beckman Coulter, Inc.).

3.6. Disseny de primers

Es va utilitzar el programa Primer-Blast del NCBI per a buscar primers que generessin un producte d'una mida de 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.

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

Forward	CCTTTTGCAAGTTGGCCGAG
Reverse	TCGCCCTCTTCAACTTGTGG

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 van afegir

©Universitat de Barcelona

4,75 µl d'una barreja de transcriptasa inversa a 15,25µl de mostra de RNA, per tal de convertir el RNA a cDNA. La barreja contenia 2 µl de *buffer* 10x, 1 µl de dNTPs, 0,25µl d'hexàmers, 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'una barreja que contenia: 10 µl *buffer* 5x, 0,75 µl dNTPs, 0,5 µl del primer *forward*, 0,5 µl del primer *reverse*, 33 µl d'aigua MQ i 0,25 µl d'*one taq* polimerasa. Les condicions dels cicles de PCR van 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 amb 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.

4. Resultats

4.1. Efecte dels PPRH contra WEE1 *i* CHK1 *en la viabilitat cel·lular*

Per avaluar l'efecte dels PPRH es van incubar 10.000 cèl·lules HeLa en plaques de 6 pous a una concentració de 100nM de PPRH i 10µM de DOTAP (concentracions efectives en estudis d'altres PPRH). Per excloure que la toxicitat fos deguda al DOTAP es van cultivar cèl·lules en un pou amb 10µM de DOTAP. A més, es va fer un control negatiu amb un PPRH *scrambled*, que 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-s'hi i, en conseqüència, no hauria de produir citotoxicitat.

Després de cinc dies d'incubació, es va realitzar un MTT per tal de quantificar les cèl·lules viables. Els tres PPRH van mostrar ser eficaços, en reduir la viabilitat cel·lular més d'un 85%. Respecte a *CHK1*, HpCHK1I1-C va mostrar una alta activitat i va reduir la viabilitat cel·lular quasi un 100%. En canvi, els PPRH dirigits contra els introns 10 i 13 només van reduir entre un 30 i un 40% la viabilitat, motiu pel qual van ser descartats de l'estudi.

A més a més, es va poder comprovar que la disminució de la viabilitat quan les cèl·lules eren incubades únicament amb DOTAP era mínima i que, per tant, la citotoxicitat no era deguda al DOTAP. A més, l'*scrambled* no reduïa més d'un 21% la viabilitat, fet que demostra la importància que el PRRH contingui una seqüència especifica 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, que 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 s'hi 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).

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

©Universitat de Barcelona

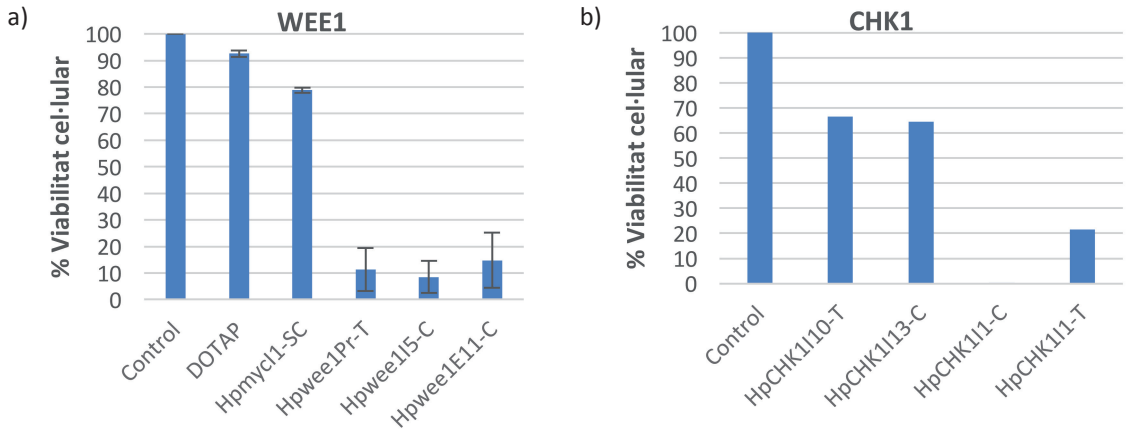


Figura 4. Viabilitat cel·lular. (A) Efecte dels PPRH dissenyats contra *WEE1* representat en forma de percentatge respecte al control. Cèl·lules HeLa incubades amb DOTAP, *scrambled*, HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11. (B) Efecte dels PPRH dissenyats contra *CHK1* representat en forma de percentatge respecte al control. Cèl·lules HeLa incubades amb HpCHK1I10, HpCHK1I13-C, HpCHK1I1-C i HpCHK1I1. Els resultats corresponen a la mitjana ± SE (*Standard Error*).

a)

HpWEE1Pr-T	GGGACGAGGGGCAAGAAGCGGTTTTTGGCGAAGAACGGGGAGCAGGG
HpWEE1Pr-WC	GGGACGAGGGGCAAGAAGCGGTTTTTCCGCTTCTTGCCCCTCGTCCC

b)

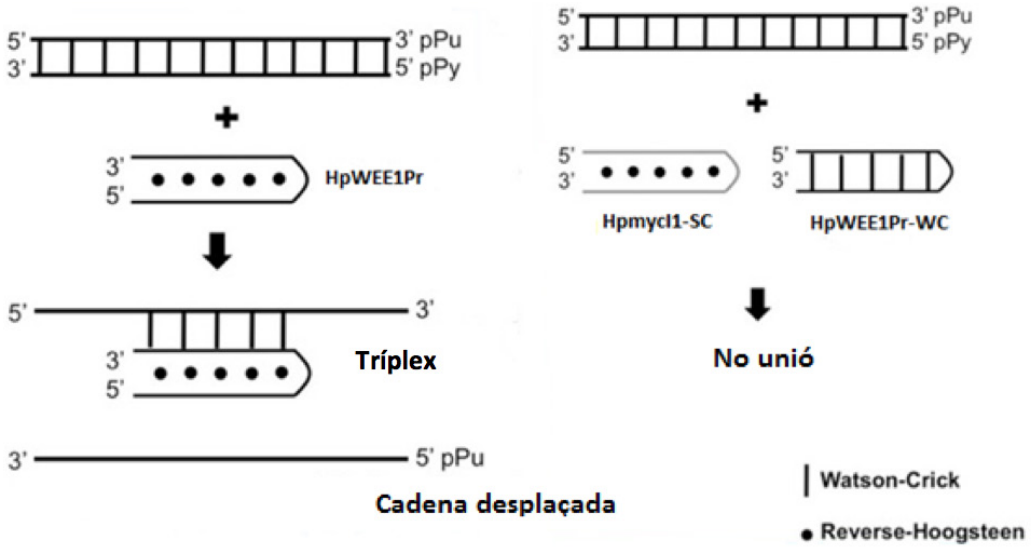


Figura 5. Controls negatius. (A) Comparació de l'estructura del PPRH dirigit contra el promotor amb enllaços de Hoogsteen (HpWEE1Pr-T) i amb enllaços de Watson i Crick (HpWEE1Pr-WC). (B) Representació esquemàtica de la unió de HpWEE1Pr-T, HpWEE1Pr-WC i HpmycI1-SC.

©Universitat de Barcelona

A continuació, es va fer un cribratge dels 5 PPRH seleccionats (HpCHK1I1-C, HpCHK1I1-T, HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11) per tal de comprovar-ne l'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 PPRH a una concentració de 100 nM. Cinc dies després de la transfecció es va fer l'assaig MTT.

En general, els PPRH 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. Quant a *WEE1*, els PPRH van demostrar ser més eficaços en cèl·lules HeLa que en la resta de línies, seguit de PC3 (figura 7).

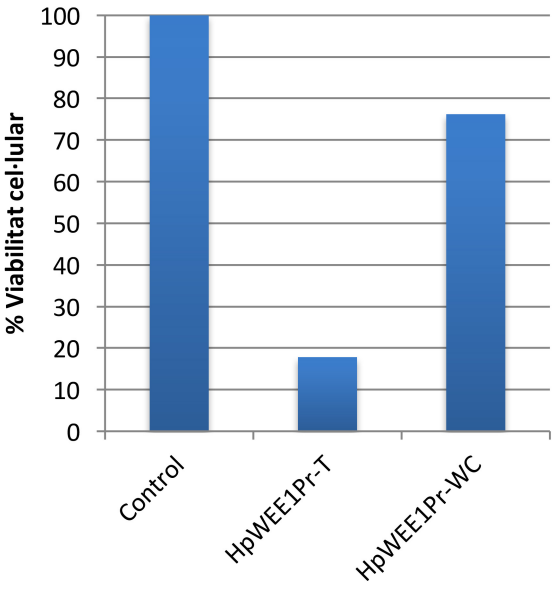


Figura 6. Efecte del control negatiu Watson i Crick. Comparació de l'efecte produït per HpWEE1Pr i HpWEE1Pr-WC en la viabilitat cel·lular expressat en forma de percentatge respecte al control.

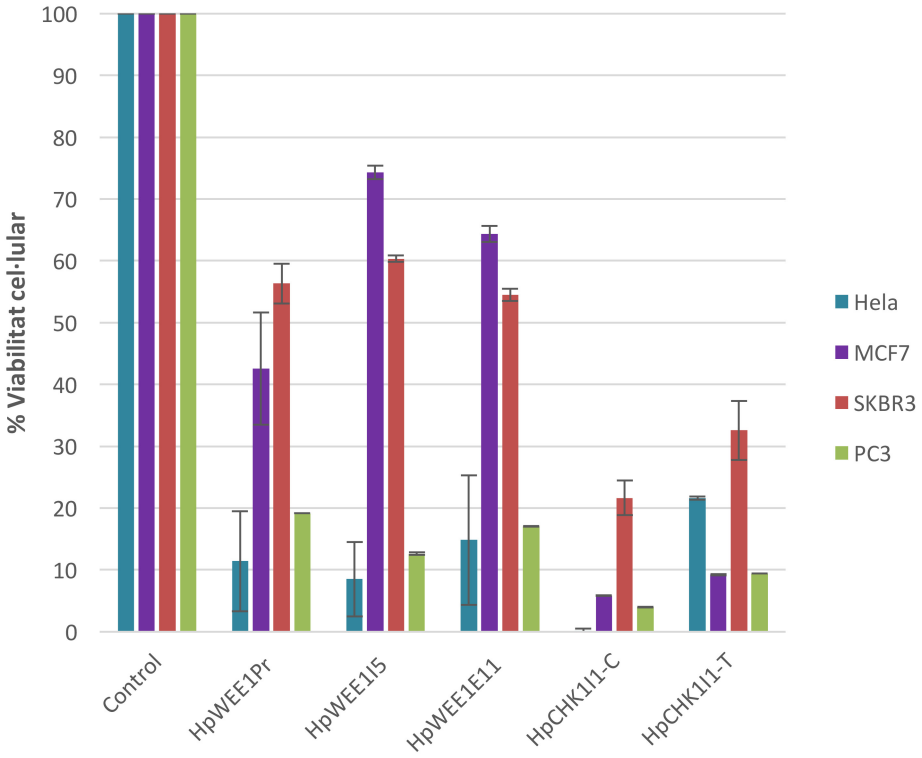


Figura 7. Assaig de viabilitat cel·lular en diferents línies cel·lulars. Incubació de cèl·lules HeLa, MCF7, SKBR3, PC3 amb HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E1, HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T. Les dades corresponen a la mitjana ± SE.

©Universitat de Barcelona

4.2. Avaluació de l'efecte dels PPRH contra WEE1 *i* CHK1 *segons concentració i temps*

Un cop confirmat que els PPRH 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.

Donada 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.

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 dependent 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), seguida 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, raó per la qual no es van considerar eficaços per sota d'aquestes concentracions.

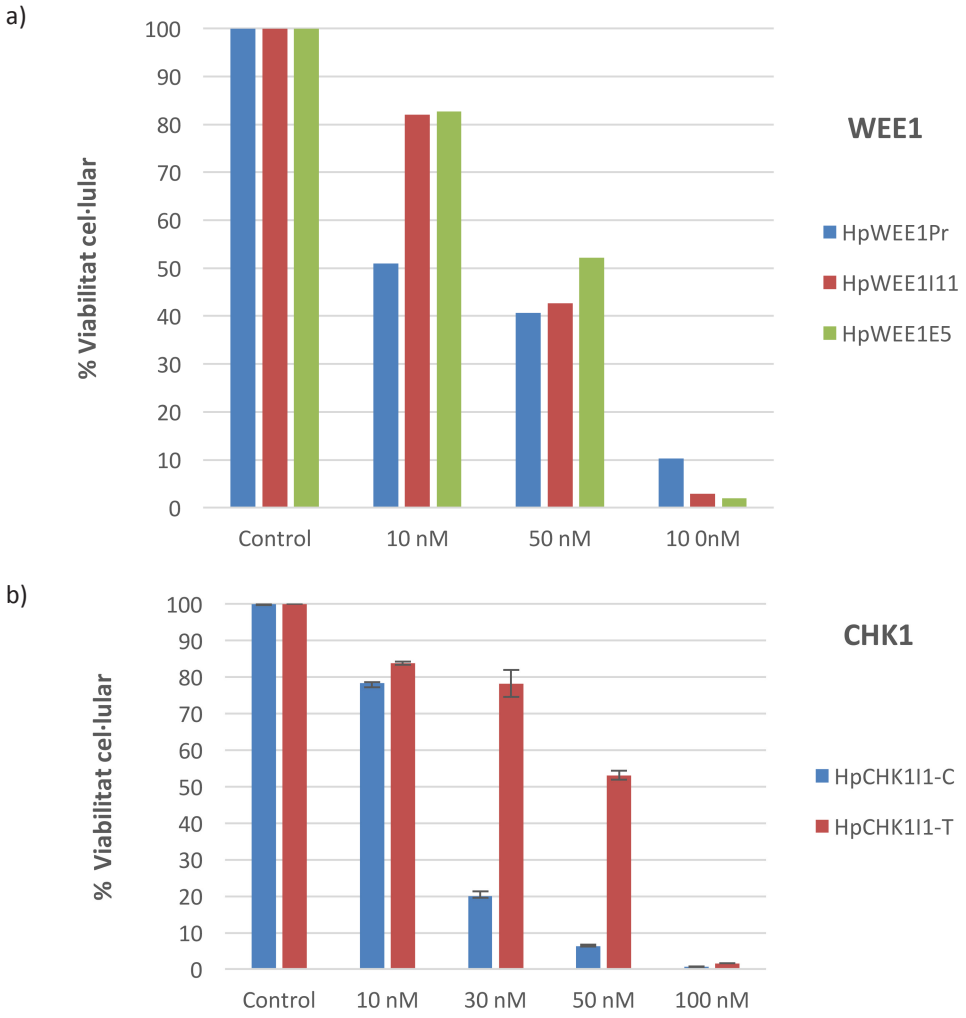


Figura 8. Assaig dosi-resposta. (A) Viabilitat de cèl·lules HeLa després d'inhibir el gen *WEE1* amb HpWEE1Pr, HpWEE1I5 i HpWEE1E11 a 10 nM, 50 nM i 100 nM. (B) Viabilitat de cèl·lules HeLa després d'inhibir el gen *CHK1* amb HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T a 10 nM, 30 nM, 50 nM i 100 nM. Les dades corresponen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

©Universitat de Barcelona

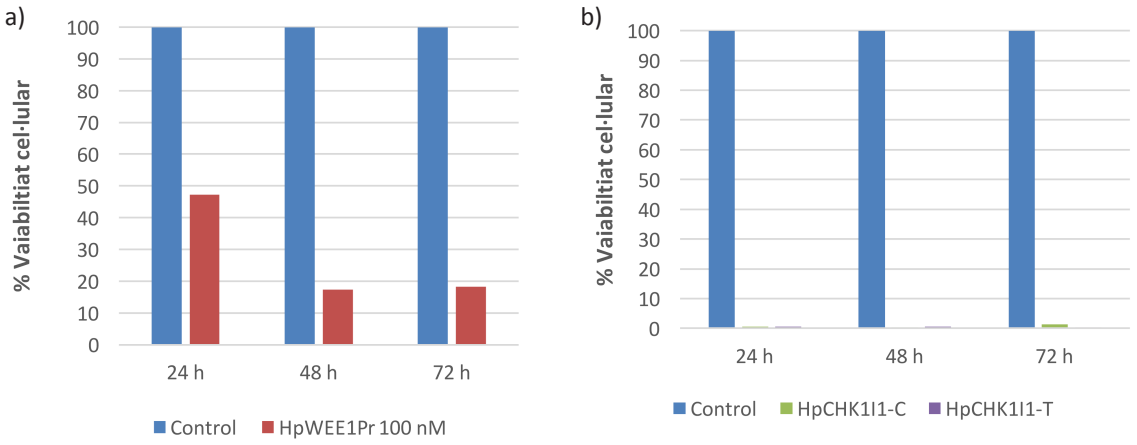


Figura 9. Dependència del temps. (A) Avaluació de la viabilitat cel·lular al cap de 24 h, 48 h i 72 h de transfectar cèl·lules HeLa amb HpWEE1Pr. (B) Avaluació de la viabilitat cel·lular després de 24 h, 48 h i 72 h de transfectar cèl·lules HeLa amb HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T.

Un cop fet l'assaig dosi-resposta, es va dur a terme un estudi de temps-resposta per tal de determinar el temps de contacte del PPRH necessari per a produir efecte. Aquest estudi es va realitzar a una concentració de 100nM PPRH. Els medis de cultiu es van canviar al cap de 24 h, 48 h i 72 h de la transfecció. L'assaig MTT es va fer sis dies després de la transfecció. HpWEE1Pr va mostrar una alta citotoxicitat després de 24 h. A més, tant HpCHK1I1-C com HpCHK1I1-T van produir una reducció de la viabilitat cel·lular de quasi el 100% al cap de 24 h (figura 9).

4.3. Avaluació de l'efecte dels PPRH en l'apoptosi

4.3.1. Test Caspase 3/7

L'assaig de caspasa 3/7 es va dur a terme 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 després de 24 h ja es produïa una reducció important de la viabilitat cel·lular i que en estudis amb rodamina no hi havia hagut augment en cèl·lules apoptòtiques al cap de 24 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).

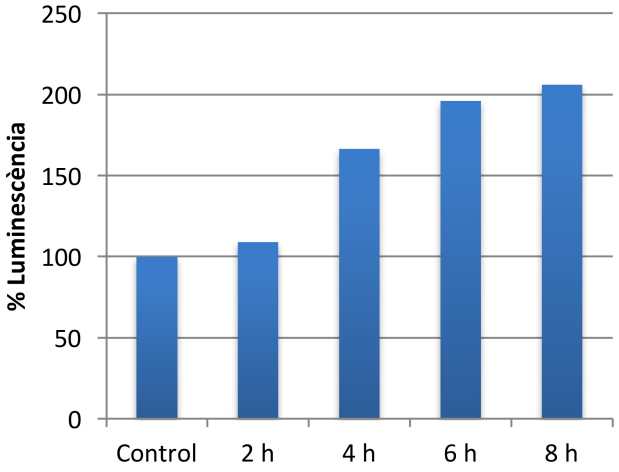


Figura 10. Percentatge de luminescència respecte al control en l'assaig caspasa 3/7 al cap de 2 h, 4 h, 6 h i 8 h.

©Universitat de Barcelona

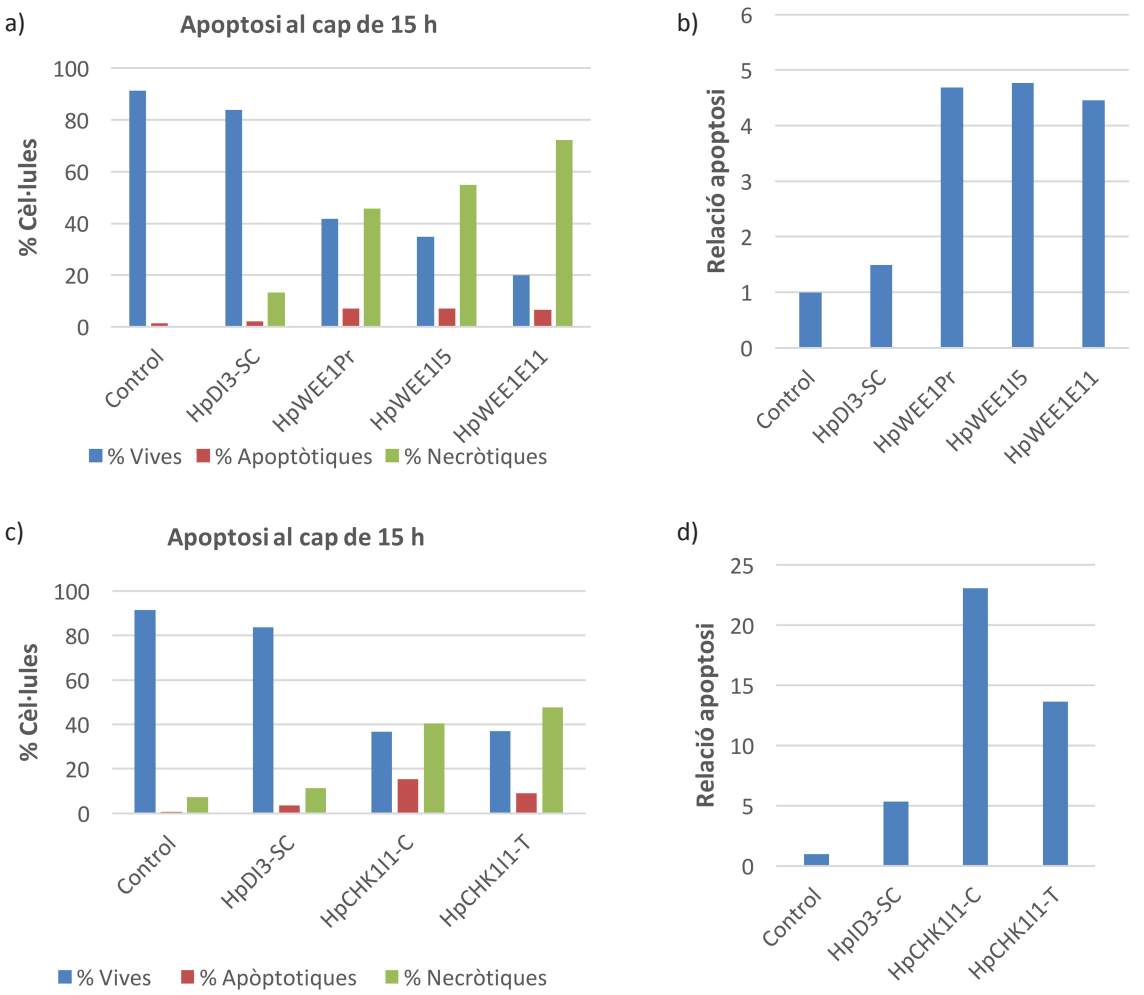


Figura 11. Avaluació de l'apoptosi pel mètode de la rodamina. (A) Percentatges de cèl·lules necròtiques, apoptòtiques i vives després de 15 h respecte al control amb els PPRH dirigits contra el gen *WEE1*. (B) Relació de cèl·lules apoptòtiques respecte al control després d'inhibir el gen *WEE1*. (C)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

4.3.2. Mètode de rodamina

Per tal d'avaluar el percentatge de població de cèl·lules vives, apoptòtiques 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 al cap de 6 h, 15 h i 24 h amb cèl·lules HeLa. El màxim percentatge de cèl·lules apoptòtiques es va trobar després de 15 h de ser transfectades amb els 3 PPRH.

Pel que fa a *CHK1*, es va estudiar l'apoptosi al cap de 15 h de la transfecció, ja que era el temps en què l'apoptosi era major quan s'inhibia *WEE1.* Els dos PPRH dirigits contra *CHK1* van mostrar un 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 (figures 11A i 11C).

©Universitat de Barcelona

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 HpCHK1-C i HpCHK1I1-T, respectivament (figura 11D).

4.4. 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*.

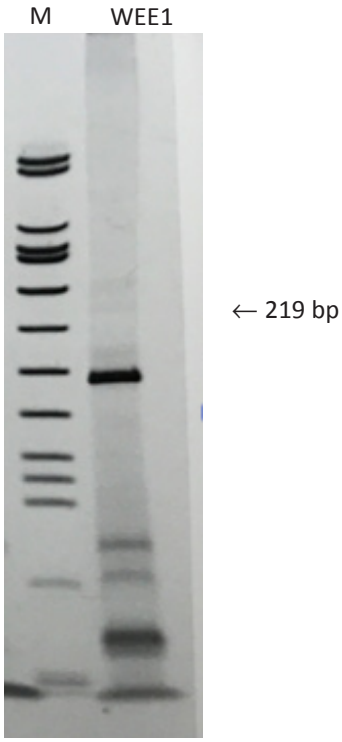


Figura 12. Electroforesi de poliacrilamida del fragment amplificat per PCR del gen *WEE1* amb els primers dissenyats. M correspon al carril carregat amb els marcadors (Roche #VIII) i *WEE1* al carregat amb el gen amplificat pels primers.

5. 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 cicle 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*, i aquesta última produeix una fosforilació inhibitòria de *CDK* i causa l'aturada del cicle cel·lular. El dany al DNA estabilitza la proteïna p53 i, com a conseqüència, es transcriuen gens implicats en la reparació del DNA, l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi (Meek, 2004; Medema, 2012).

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

L'objectiu d'aquest estudi era avaluar l'eficàcia dels PPRH en el silenciament dels gens *WEE1* i *CHK1*. Cinc PPRH (HpWEE1Pr, HpWEE1I5, HpWEE1E11, HpCHK1I1-C i HpCHK1I1-T) han resultat eficaços contra

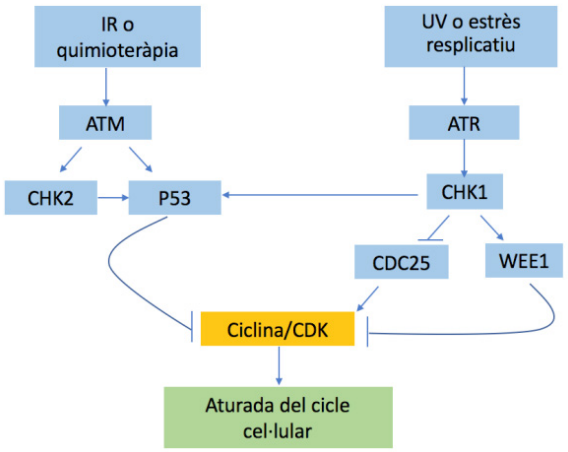


Figura 13. Vies implicades en la reparació del DNA. A l'esquerra, la via ATM-CHK2, i a la dreta, la via ATR-CHK1.

©Universitat de Barcelona

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 a 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 a determinar que la citotoxicitat observada és deguda a una disminució de l'expressió dels gens i, per tant, s'haurà de detectar una menor quantitat de mRNA i de proteïna. Actualment, per tal d'amplificar i quantificar el mRNA, s'han dissenyat un parell de primers per al gen *WEE1* que han demostrat ser selectius. Tanmateix, es podria determinar tot utilitzant sondes TaqMan específiques per a 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 PPRH 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 entre el 30 i el 40%. Aquest fet pot estar relacionat amb l'elevat nombre d'isoformes que presenta *CHK1* i el 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. Això podria explicar per què 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, que 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 PPRH ha provocat una reducció de la viabilitat cel·lular de quasi el 100% a 100 nM. Aquest fet suggereix que és més ràpid 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 caspasa 3/7 ha confirmat un augment en l'activitat de les caspases, cosa 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 al cap de 8 hores, i són 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 al cap de 6 h, temps en què les caspases ja han augmentat l'activitat, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques és mínim, i hi ha un retard entre l'activació dels efectors i l'apoptosi. Després de 15 h se situa el màxim de cèl·lules apoptòtiques. Al cap de 24 h el nombre de cèl·lules apoptòtiques disminueix i augmenta el de cèl·lules necròtiques, fet que indica que l'apoptosi es produeix al voltant d'unes 15 h (figura 11).

Paral·lelament, els estudis de rodamina han mostrat un major grau d'apoptosi després de 15 h amb la inhibició del gen *CHK1*. Estudis a diferents temps, al voltant d'unes 15 h, serien necessaris per a determinar el temps en què 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 i, consegüentment, una disminució en la quantitat de cèl·lules viables. Estudis en què es quantifiqués el nombre 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*, ha demostrat ser d'una gran eficàcia contra diferents línies cel·lulars. Això fa pensar que la inhibició

©Universitat de Barcelona

d'aquesta via pot ser d'una 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). A la taula 4 es proposa el disseny d'un PPRH dirigit contra *ATR* que servirà per a futurs estudis amb aquesta nova diana.

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

Nom	Estructura
HpATRI35	5'- GGAGCGAGAGAGAAGAGAGGGAGGAAGGAGA TTTTT 3'- GGAGCGAGAGAGAAGAGAGGGAGGAAGGAGA T

6. 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 PPRH.
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 PPRH produeix un augment en la població de cèl·lules apoptòtiques acompanyat d'una disminució de la viabilitat cel·lular.

7. Bibliografia

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1983) *Biología molecular de la célula*. Barcelona, Omega, 2010.

Almagro, M.C. de, Coma, S., Noé, V., Ciudad, C.J. (2009) «Polypurine hairpins directed against the template strand of DNA knock down the expression of mammalian genes». *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), pp. 11579-11589.

Almagro, M.C. de, Mencia, N., Noé, V., Ciudad, C.J. (2011) «Coding polypurine hairpins cause target-induced cell death in breast cancer cells». *Human Gene Therapy*, 22(4), pp. 451-463.

Cooper, G.M. (2000) «The Development and Causes of Cancer», a Cooper, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland, Sinauer Associates.

Mak, J.P., Man, W.Y., Ma, H.T., Poon, R.Y. (2014) «Pharmacological targeting the ATR-CHK1-WEE1 axis involves balancing cell growth stimulation and apoptosis». *Oncotarget*, 5(21), pp. 10546-10557.

Matheson, C.J., Backos, D.S., Reigan, P. (2016) «Targeting WEE1 kinase in cancer». *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(10), pp. 872-881.

Medema, R.H., Macůrek, L. (2004) «Checkpoint control and cancer»,. *Oncogene*, 31(21), pp. 2601-2613.

Meek, D.W. (2004) «The p53 response to DNA damage». *DNA Repair*, 3(8-9), pp. 1049-1056.

NCBI Resource Coordinators (2016) «Database resources of the National Center for Biotechnology Information». *Nucleic Acids Research*, 44 (Database issue), pp. D7-D19.

©Universitat de Barcelona

Rodríguez, L., Villalobos, X., Dakhel, S., Padilla, L., Hervas, R., Hernández, J.L. *et al.* (2013) «Polypurine reverse Hoogsteen hairpins as a gene therapy tool against survivin in human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo». *Biochemical Pharmacology*, 86(11), pp. 1541-1554.

Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G. (2012) «Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication». *Nucleic Acids Research*, 40(2), pp. 477-486.

Vera, J., Raatz, Y., Wolkenhauer. O., Kottek, T., Bhattacharya, A., Simon, J.C., Kunz, M. (2015) «Chk1 and Wee1 control genotoxic-stress induced G2-M arrest in melanoma cells». *Cell Signal*, 27(5), pp. 951-960.

Villalobos, X., Rodríguez, L., Prévot, J., Oleaga, C., Ciudad, C.J., Noé, V. (2014) «Stability and immunogenicity properties of the gene-silencing polypurine reverse Hoogsteen hairpins». *Molecular Pharmaceutics*, 11(1), pp. 254-264.

Villalobos, X., Rodríguez, L., Solé, A., Lliberós, C., Mencia, N., Ciudad, C.J. *et al.* (2015) «Effect of Polypurine Reverse Hoogsteen Hairpins on Relevant Cancer Target Genes in Different Human Cell Lines». *Nucleic Acid Therapeutics*, 25(4), pp. 198-208.

Vriend, L.E., De Witt Hamer, P.C., Van Noorden, C.J., Würdinger, T. (2013) «WEE1 inhibition and genomic instability in cancer». *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836(2), pp. 227-235.

World Health Organization (2017) *Cancer*. Disponible a: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/ [accés: 13.3.2017].

Zhang, Y., Hunter, T. (2014) «Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy». *International Journal of Cancer*, 134(5), pp. 1013-1023.

8. Agraïments

Voldria donar les gràcies al Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Universitat de Barcelona per haver-me ofert 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 en els intel·lectuals.