

Estudio del papel de la DNA polimerasa Theta en la viabilidad de las células de cáncer de próstata.

María Couto Muga^a, Irene de Miguel García, Pedro Antonio Mateos Gómez

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. maria.couto98@hotmail.com

Palabras clave: POL θ ; DSBs; A-NHEJ; estrés replicativo; γ H2AX; ciclo celular

Resumen

Las roturas de doble cadena del DNA (DSBs) son las lesiones que más afectan a la supervivencia celular y a la integridad del genoma. Las células presentan diferentes mecanismos de reparación, entre los que encontramos un mecanismo menos estudiado denominado unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ). En este destaca la participación de la DNA polimerasa theta (POL θ), la cual se encuentra sobreexpresada en muchos cánceres, siendo necesaria para la supervivencia de las células tumorales deficientes en la recombinación homóloga (HR). Además, diferentes estudios sugieren la importancia de la polimerasa incluso en células con HR funcional, por lo que es una diana terapéutica de gran potencial. Tras comprobar previamente que las células tumorales prostáticas estudiadas no eran deficientes en la HR, el objetivo de este trabajo consistió en determinar el posible papel de POL θ frente al estrés replicativo en dichas células, las cuales dependen de POL θ para su supervivencia según resultados previos del grupo. Para ello, se realizó el silenciamiento de *POLQ* y el tratamiento posterior con agentes inductores de estrés replicativo (camptotecina, etopósido e hidroxurea) analizando después el daño producido en las células mediante la inmunodetección por western-blot de la histona γ H2AX, marcador de DSBs. También se llevó a cabo el análisis del efecto producido en el ciclo celular. Estos resultados mostraron diferencias notables entre las células silenciadas y las células control, de tal forma que la inhibición de POL θ promovió una acumulación de células en las fases G1 y S, indicando una dificultad aumentada a la hora de replicar el DNA y continuar el ciclo. Adicionalmente, en este trabajo se llevó a cabo el clonaje de un plásmido inducible por doxiciclina denominado *LT3-POLQ* capaz de silenciar *POLQ*.

Cita: Couto Muga, María; de Miguel García, Irene; Mateos Gómez, Pedro Antonio (2022) Estudio del papel de la DNA polimerasa Theta en la viabilidad de las células de cáncer de próstata. *dianas* 11 (2): e202209fa05. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202209fa05](http://www3.uah.es/dianas?e202209fa05) <http://www3.uah.es/dianas?e202209fa05>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Couto-Muga M, de-Miguel-García I, Mateos-Gómez PA. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Roturas de doble cadena del DNA

Dentro de los daños producidos en el DNA encontramos a las roturas de doble cadena (DSB) como las lesiones más severas, pudiendo provocar que la supervivencia celular y la información genética se vean gravemente comprometidas. Las DSBs pueden producirse tanto por agentes exógenos, como los agentes quimioterapéuticos o la radiación ionizante, así como por fuentes endógenas, como durante la replicación [1, 2]. Si estas roturas no son reparadas por los mecanismos de respuesta al daño en el DNA (DDR) pueden dar lugar a la muerte celular, pero si la reparación que se da no se produce correctamente, puede provocar la inducción de reordenamientos cromosómicos o de mutaciones, ambos acontecimientos identificados como dos de los más comunes en el desarrollo de la oncogénesis y otras enfermedades genéticas [3,4]. La inestabilidad genómica es uno de los principales factores asociados a las células tumorales, de tal forma que facilita la presencia de una mayor predisposición a sufrir lesiones en el DNA

como las DSBs [5]. Las dos vías principales de reparación de roturas de doble cadena que encontramos en las células son la Recombinación Homóloga (*Homologous Recombination*, HR) y la Unión de extremos no homólogos clásica (*Classical non homologous end-joining*, C-NHEJ), a las que se suma un tercer mecanismo menos estudiado denominado Unión de extremos no homólogos alternativa (*Alternative non homologous end-joining*, A-NHEJ) [2,6].

La unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ), la cual también puede ser denominada unión de extremos mediada por microhomologías (MMEJ) o, más recientemente, unión de extremos mediada por la polimerasa theta [7] es un mecanismo utilizado principalmente durante las fases S y G2 del ciclo celular. En muchos casos implica el anillamiento de microhomologías, las cuales consisten en secuencias homólogas de 1-10 pares de bases que se encuentran a ambos lados de la rotura de doble cadena [8]. El proceso de reparación comienza con la resección por la acción de la proteína CtIP y el complejo MRN [9, 10]. Adicionalmente, encontramos la participación de la proteína PARP-1, la cual interviene en el reclutamiento de los demás componentes a los extremos de DNA tras la resección. La polimerasa POL θ , codificada por el gen *POLQ*, se une a los extremos de cadena sencilla de DNA (ssDNA) y une las secuencias de microhomología para utilizarlas como cebadores y poder comenzar la síntesis de DNA. En último lugar, los extremos de DNA son ligados por acción de la DNA ligasa 3 de tal forma que finaliza el proceso de reparación. Sin embargo, el uso de microhomologías conlleva a frecuentes deleciones e incluso inserciones de secuencia [7, 11].

Cuando la recombinación homóloga o la unión de extremos no homólogos clásica están dañadas o no son funcionales, la unión de extremos no homólogos alternativa adquiere suma importancia, de tal forma que las células compensan la deficiencia de las otras vías adquiriendo una gran dependencia por la vía alternativa para su supervivencia [12, 13].

DNA polimerasa theta (POL θ)

POL θ es una enzima multifuncional, perteneciente a la familia de las polimerasas A. Fue identificada por primera vez en *Drosophila melanogaster* y se caracteriza por constar de un dominio helicasa N-terminal y un dominio polimerasa C-terminal, unidos por una región central [14,15]. POL θ es la única polimerasa eucariota con un dominio helicasa conocida hasta el momento. El dominio polimerasa es el responsable de la síntesis de DNA mientras que el dominio helicasa posee actividad ATPasa y actividad helicasa [7]. POL θ también puede actuar como una polimerasa de síntesis sobre lesión del DNA (TLS, trans-lesion synthesis) [16], siendo capaz de replicar DNA dañado, añadiendo nucleótidos incluso en presencia de lesiones mutagénicas tales como sitios AP (sitio apurínico/apirimidínico). Por ello, esta enzima participa en la tolerancia al daño en el DNA y en la reparación de otras lesiones además de DSBs [7].

Los niveles de expresión de la polimerasa POL θ en tejidos normales son muy bajos, pero esta se encuentra sobreexpresada en muchos cánceres como el cáncer de pulmón, ovario, mama o colon [15]. Sin embargo, esta expresión aumentada ha sido asociada a un peor pronóstico de los pacientes y, por tanto, puede ser utilizada como un indicador de la agresividad del cáncer [7, 11]. Debido a la dependencia por la vía alternativa en las células tumorales deficientes en la recombinación homóloga, la expresión de POL θ es esencial para la supervivencia y proliferación de aquellas células con ausencia o mutaciones en genes implicados en la vía homóloga como *BRCA1* y *BRCA2* [16], asociados a distintos tipos de cáncer, como el cáncer de mama.

De forma adicional, existe una creciente evidencia de que la pérdida de POL θ puede ser perjudicial incluso en presencia de una HR funcional, lo que se ha asociado a la participación de POL θ frente al estrés replicativo [13]. Esta polimerasa tendría un papel importante en la reparación de roturas de doble cadena generadas a partir del colapso de la horquilla de replicación [18]. Se ha sugerido que la regulación positiva de POL θ en células tumorales competentes en la HR puede haber sido favorecida durante la tumorigénesis con el objetivo de permitir una adaptación a niveles elevados de estrés replicativo, incrementando su viabilidad [7, 13]. Por lo tanto, esto sugiere que la expresión elevada de POL θ en algunos cánceres no solo está asociada a los mecanismos de compensación en células deficientes en HR, sino que también ofrece una ventaja de crecimiento a células con HR funcional [13, 17].

Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CP) se encuentra entre los cinco cánceres con mayor incidencia y mortalidad, siendo el cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres. Además de su alta incidencia, se caracteriza por tener una gran heterogeneidad clínica y ser de lento crecimiento. En su desarrollo destaca la función del receptor de andrógenos (RA), cuya transmisión de señales determina el crecimiento, progresión e infiltración del tumor. En el CP localizado, los tratamientos iniciales son la prostatectomía radical o la radiación, mientras que en el localmente avanzado o metastásico se da la castración quirúrgica o química inhibiendo la señalización del RA. Este tratamiento es inicialmente eficiente pero irremediablemente se da recurrencia de la enfermedad y aparece el estadio de CP resistente a la castración, que es incurable. A pesar de los avances, sigue existiendo una gran necesidad clínica de

encontrar nuevas terapias y de la identificación de vías metabólicas o componentes con papeles esenciales en su desarrollo [18-20].

Estudios previos realizados por este grupo indican que el silenciamiento de POL θ en diferentes líneas celulares de CP, como PC3 y LNCaP, reduce su viabilidad de forma notable, lo cual sugiere que la expresión de esta polimerasa es esencial para la supervivencia de estas células tumorales. Debido a ello, la DNA polimerasa POL θ puede considerarse una potencial diana terapéutica y una nueva vía de tratamiento para el CP, que tendría efecto tanto en las células que responden a andrógenos (LNCaP), como en las que son independientes de ellos (PC3). Además, este grupo también ha comprobado con anterioridad la correcta funcionalidad de la recombinación homóloga. Nuestros resultados indican que la inhibición de la HR mediante el silenciamiento de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en estas células tumorales de próstata lleva a un significativo descenso de la viabilidad. Esto sugiere que no son deficientes en dicha vía y que el motivo por el que la polimerasa POL θ es esencial en la supervivencia de estas células no estaría determinado por el uso del mecanismo alternativo como vía compensatoria en la reparación de DSBs debido a mutaciones o defectos en la HR, tal y como diversos estudios sugieren que ocurre en otras células tumorales [12, 16]. Por tanto, esto indicaría que POL θ podría tener una gran relevancia incluso en estas células competentes en la HR [13, 17]. El objetivo de este proyecto es determinar si el papel de POL θ en las células tumorales de CP radica en su posible participación frente al estrés replicativo, función descrita con anterioridad de esta polimerasa [13].

Material y Métodos

Cultivo de líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de CP obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC). La línea celular PC3 procede de metástasis ósea de adenocarcinoma de próstata. Estas células carecen del receptor de andrógenos (RA), por lo que son independientes de ellos y representan clínicamente la etapa independiente de andrógenos de CP *in vitro*, considerada más agresiva y equivalente al CP metastásico resistente. La segunda línea, LNCaP, procede de metástasis en ganglio linfático. Presentan el receptor de andrógenos (AR), por lo que sus células son sensibles a andrógenos y representan clínicamente la etapa dependiente de andrógenos de CP *in vitro*, considerada menos agresiva. Ambas líneas fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de solución de antibiótico, 1% de solución de L-glutamina y 1% de solución de aminoácidos. Las células transfectadas con los plásmidos inducibles *LT3-Renilla* y *LT3-POLQ* fueron cultivadas en medio RPMI sin tetraciclina (Gibco) para evitar la activación del promotor antes de la realización de los ensayos de silenciamiento. La línea celular HEK293T, caracterizadas por ser células embrionarias de riñón humano y utilizadas para la producción de lentivirus, fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma), suplementado con los mismos componentes que el medio RPMI. Todas las líneas fueron mantenidas en el incubador a 37°C en condiciones de humedad y 5% de CO₂.

Clonaje plasmídico

El plásmido *shPOLQ* fue clonado con anterioridad a la realización de este trabajo mediante la utilización del vector *PLKO.1*. Para el clonaje del plásmido inducible denominado como *LT3-POLQ*, en primer lugar, se digirió el vector *LT3-Renilla* con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* y se purificó. Seguidamente se realizó una PCR del inserto que se iba a utilizar para formar el plásmido *LT3-POLQ* siguiendo el protocolo *PCR Using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (BioLabs). El inserto fue digerido con *EcoRI* y *XhoI* y posteriormente purificado para llevar a cabo la ligación del vector digerido con el inserto. Finalmente, se realizó la transformación en células competentes. Para confirmar la secuencia de los plásmidos de interés introducidos en las bacterias, se purificaron y se mandaron muestras para su secuenciación.

Transformación de células competentes

Las bacterias utilizadas fueron de la cepa *Stb13*. Tras descongelarlas, se añadió a cada una de ellas el plásmido de interés a transformar, dejando la mezcla en incubación durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, se realizó un choque térmico incubando la mezcla a 42°C durante 40 segundos para, a continuación, transferirlas a hielo durante 2 minutos. Se añadió medio LB (10 g/l peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl) sin antibiótico y se dejó incubar durante 15 minutos en agitación y a 37°C. Finalmente, la mezcla se plaqueó en placas de LB con ampicilina ya que este era el gen de resistencia que presentaban los vectores utilizados *PLKO.1* y *LT3-Renilla*.

Aislamiento y purificación de los vectores plasmídicos

El DNA utilizado en las transfecciones se purificó mediante la utilización del *NZYMaxiprep kit* (NZYTech). Tras la incubación de un preinóculo de 1,5 ml durante cinco horas, las bacterias

transformadas se dejaron crecer en matraces con 200 mL de medio LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C y en agitación. Posteriormente, se aislaron los plásmidos siguiendo el protocolo del kit.

Transfección de células HEK293T

La obtención de lentivirus de segunda generación portadores de las diferentes secuencias de shRNA se consiguió mediante la transfección en células HEK293T con una confluencia aproximadamente del 80%. Se preparó la mezcla de transfección utilizando los plásmidos lentivirales *VSV-G* (3µg) y *PsPAX* (5µg), junto con el vector lentiviral de interés (10µg), en una disolución de NaCl (150mM). Posteriormente, para la formación de los liposomas se añadió polietilenimina (PEI, 1mg/ml) en una relación de 1µl por cada 3µg de DNA presente, dejando incubar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió la mezcla de transfección a los cultivos celulares y, tras cinco horas, se cambió el medio de cultivo por medio fresco. Los sobrenadantes fueron recogidos a las 48 y 72h.

Silenciamiento de genes mediante shRNA e infección viral

El silenciamiento se llevó a cabo mediante infecciones lentivirales a intervalos utilizando el sobrenadante de las células HEK293T previamente transfectadas para producir cada tipo de virus. Infecciones paralelas con los vectores *pLKO.1-shControl* o *LT3-Renilla* se utilizaron como control negativo en los experimentos ya que no silenciaban ningún gen. Las denominaciones de los plásmidos y los genes que silencian se encuentran recogidos en la Tabla 1. Tras las infecciones con los plásmidos *shControl* y *shPOLQ*, las células fueron seleccionadas durante tres días con puromicina (Sigma-Aldrich) con una concentración de 3mg/ml para PC3. Las células infectadas con *LT3-Renilla* y *LT3-POLQ* fueron seleccionadas con neomicina (Sigma-Aldrich) con una concentración final de 0,9mg/ml en PC3 y 1mg/ml en LNCaP durante cinco días. Las placas infectadas se compararon con placas control no infectadas a las que se había añadido la misma concentración.

Plásmido	Gen silenciado	Gen de resistencia
<i>pLKO.1-puro-shControl</i>	-	Puromicina
<i>pLKO.1-puro-human_PolQ</i>	<i>POLQ</i>	Puromicina
<i>LT3-Renilla</i>	-	Neomicina
<i>LT3-POLQ</i>	<i>POLQ</i>	Neomicina

Tabla 1.- Se indican los plásmidos utilizados junto con el gen, si procede, que silencia cada uno y el gen de resistencia correspondiente.

RT-qPCR

El aislamiento de RNA se realizó usando el *NZY Total RNA Isolation kit* (NZYTech). Tras la cuantificación de RNA total extraído, se realizó su transcripción inversa a cDNA utilizando 2µg de RNA mediante el *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYTech). Por último, para cuantificar los niveles de expresión, se realizó una qPCR utilizando el *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)* en el sistema 7500 Fast Real-Time PCR. El protocolo consistió en un programa con un calentamiento inicial a 95°C durante 2 minutos y 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Los niveles de expresión de los genes se normalizaron con respecto al control interno mediante la utilización del método $\Delta\Delta Ct$.

Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó mediante la capacidad de las células de reducir el MTT (Sigma), sal de tetrazolio que se reduce por la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Se añade el reactivo MTT (0,5mg/ml) en el cultivo y se homogeniza, incubando la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 2h. Como control blanco del reactivo, este se añade a un pocillo que contiene únicamente medio. Tras la incubación, se retira el medio y se disuelven los cristales de formazán resultantes mediante la adición de isopropanol. La placa se deja a temperatura ambiente y en agitación durante cinco minutos y finalmente se procede a la lectura de absorbancia de cada pocillo en un lector de placas Elisa a 595 nm.

Western-Blot

Tras la selección con puromicina, se sembraron las células en placas de seis pocillos a una densidad de 200.000 células/pocillo. Tras 24h se realizaron los tratamientos con los diferentes agentes inductores de estrés: camptotecina (Sigma-Aldrich), etopósido (Sigma-Aldrich) e hidroxurea (Sigma-Aldrich). Cuatro días después las células se tripsinizaron, centrifugaron y se lisaron en PBS y tampón Laemmli 4x (SDS 20%, 4% 2-mercaptoetanol, 40% glicerol, 4% azul de bromofenol, 0,25 M Tris y agua miliQ) con una relación de 100ul de mezcla (50ul PBS/50ul tampón Laemmli) por cada millón de células. 10ul de los

lisados celulares completos fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida el 10% a 120 W durante 100 minutos en tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl, 192mM Glicina y 1% SDS) y posteriormente la transferencia se realizó a membranas PVDF a 100 V durante 90 minutos en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 20% metanol). Finalizada la transferencia, las membranas fueron incubadas en TTBS (Tris 0,1mM, NaCl 1,5mM y 0,05% Tween-20) con leche desnatada al 5% durante 30-60 minutos. A continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios de interés diluidos en TTBS con leche al 5% a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos utilizados fueron Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Monoclonal Antibody (Invitrogen) con una dilución de 1:300 y Alpha-Tubulin Monoclonal Antibody (Invitrogen) con dilución 1:4000. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG (Sigma) diluido a 1:5000 en TTBS con leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TTBS y las membranas fueron incubadas durante 2 minutos en un reactivo de detección quimioluminiscente (*WesternBright ECL*), revelando la membrana en un sistema BioRad ChemiDoc Imager.

Análisis del ciclo celular por citómetro de flujo

Tras la selección con puomicina, se sembraron las células en placas de seis pocillos a una densidad de 200.000 células/pocillo. Tras 24h se realizaron los tratamientos con los diferentes agentes inductores de estrés. Cuatro días después las células se tripsinizaron y centrifugaron. El pellet de células se fijó con 1ml de etanol frío al 70% durante 30-50 minutos a 4°C. Posteriormente el pellet se lavó con PBS y se resuspendió en 500µl de una solución de yoduro de propidio y RNasas (Immunostep) dejándolo incubar durante 15-30 minutos. El análisis del efecto del silenciamiento y el tratamiento con drogas en el ciclo celular se realizó con un citómetro de flujo MACS Quant 10 (Unidad de Cultivos, UAH).

Microscopia de fluorescencia

Tras la selección con neomicina, las células PC3 y LNCaP transfectadas con el plásmido inducible *LT3-POLQ* se sembraron en placas µ-Dish 35 mm (Ibidi) y se añadió doxiciclina (Sigma) a una concentración final de 1µg/ml en ambas líneas celulares. Tras cinco días de cultivo, los núcleos se tiñeron con una solución de Hoechst 33342 (Invitrogen) a una concentración final de 5µg/ml durante 20 minutos a 37°C. La obtención de imágenes se realizó con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Unidad de Cultivos, UAH).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo se realizó con el programa Excel del paquete Office de Microsoft. Los valores están indicados como la media de los valores obtenidos ± desviación estándar (D. S). Las diferencias significativas de los datos se determinaron mediante GraphPad Prism 9. Los resultados se consideraron significativos con una $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***)).

Resultados y discusión

Silenciamiento de POLQ y tratamiento con agentes inductores de estrés replicativo

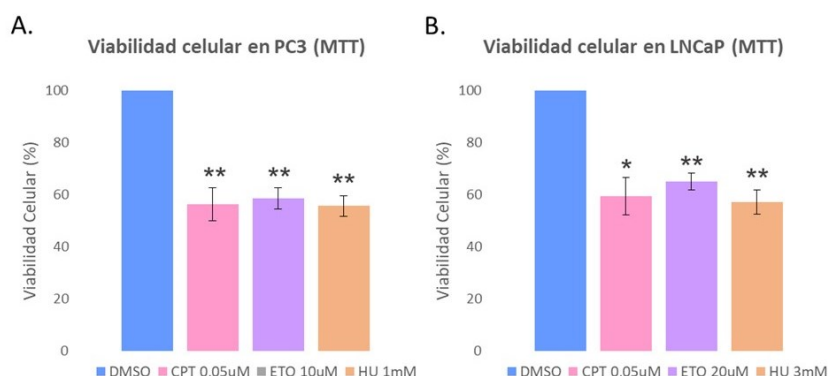


Figura 1.- Efecto en la viabilidad celular del tratamiento con camptotecina, etopósido e hidroxiurea. A. Estudio del efecto de los fármacos en PC3 mediante ensayos MTT tras cuatro días del tratamiento utilizando DMSO como control negativo. B. Estudio del efecto de los fármacos en LNCaP mediante ensayos MTT tras cuatro días del tratamiento utilizando DMSO como control negativo. Las barras de los gráficos representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos. (**, $p < 0.01$), (*, $p < 0.05$).

Este trabajo trató de elucidar la relevancia que la polimerasa theta podría tener en la protección frente al estrés replicativo en estas células de CP. Para ello, se planteó el uso de agentes inductores de estrés replicativo tras silenciar *POLQ* en las células. Los fármacos utilizados fueron camptotecina (CPT) y etopósido (ETO), inhibidores de la topoisomerasa I y II, respectivamente, e hidroxurea (HU), agente capaz de inhibir la síntesis de DNA mediante la depleción de los desoxirribonucleótidos. Estos inhibidores favorecen la aparición de DSBs durante la replicación del DNA, lo que requerirá de la reparación de las mismas para que la replicación pueda continuar.

En primer lugar, se analizó la viabilidad celular en las líneas celulares PC3 y LNCaP tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los fármacos. De esta forma, se determinó que la concentración adecuada a utilizar de cada fármaco era aquella que producía una reducción de la viabilidad de aproximadamente el 40% (figura 1). Una vez elegidas las dosis a utilizar, se planteó comenzar los ensayos de silenciamiento de *POLQ* inicialmente en la línea PC3 y, posteriormente, continuar con la línea LNCaP. Sin embargo, por falta de tiempo, la línea LNCaP no se empleó en esta parte del trabajo.

El silenciamiento de *POLQ* se realizó mediante la utilización del plásmido *shPOLQ* utilizando como control un shRNA-control. Los silenciamientos conseguidos en la línea PC3 fueron del 80% (figura 2). Tras finalizar la selección, las células fueron sembradas y tratadas con los agentes inductores según lo explicado en los apartados de western-blot o análisis del ciclo celular en Material y métodos.

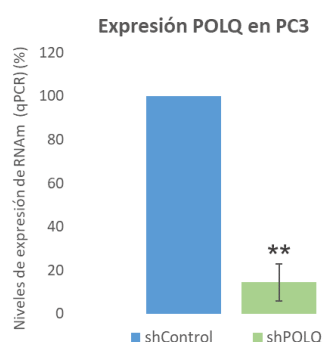


Figura 2.- **Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de *POLQ* en la línea celular PC3.** La expresión de los genes se midió mediante RT-qPCR usando como referencia el gen *RPLP0* y tomando como control el *shControl*. Las barras de los gráficos representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos. (***, $p < 0.001$).

Para detectar la presencia de DSBs en las células, se llevó a cabo la inmunodetección por western-blot de la histona fosforilada H2AX (γ H2AX), marcador de roturas de doble cadena de DNA [22]. El análisis de la presencia de esta histona nos permitiría comprobar el daño producido en las células tras el silenciamiento y posterior tratamiento. Mediante esta técnica observamos que todos los tratamientos aumentaban la detección de γ H2AX (figura 3) en la línea control. Sin embargo, esto no ocurría en las células con silenciamiento de *POLQ*. Esto estaría indicando que la inhibición de $POL\theta$ estaría reduciendo la detección de DSBs, al contrario de lo esperado ya que está encargada de reparar este tipo de daño [13, 18].

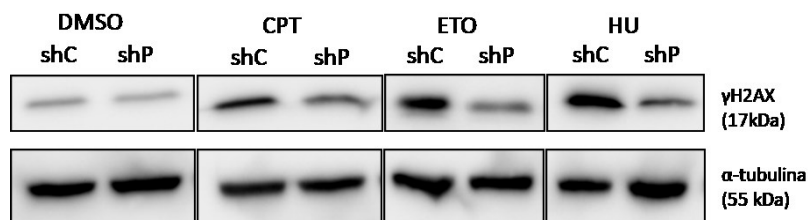


Figura 3.- **Niveles de γ H2AX en la línea celular PC3 tras el silenciamiento y tratamiento con camptotecina, etopósido e hidroxurea.** Se utilizó DMSO como control negativo de los tratamientos y los niveles de α -tubulina se muestran como control de carga. shC hace referencia a *shControl* y shP a *shPOLQ*. Las imágenes pertenecen a un experimento representativo de un total de tres realizados.

Para tratar de comprender estos resultados, se planteó estudiar lo que podría estar ocurriendo en las células mediante el análisis de ciclo celular con yoduro de propidio.

Analizando los datos obtenidos con DMSO observamos que la inhibición de *POLQ* implica una mayor acumulación de células en la fase S en comparación con el control (figura 4). Además, también se observa el desplazamiento del pico de las células en fase G1, sugiriendo que muchas de estas células están en el inicio de la fase S (figura 4A), lo que estaría indicando la dificultad a la hora de replicar el DNA. Tras el tratamiento con CPT y ETO, en shControl se da una acumulación de las células en la fase G2/M y cierto

aumento en la fase S, en comparación con el tratamiento con DMSO (figura 4). Este incremento en fase S estaría de nuevo indicando dificultad a la hora de llevar a cabo la replicación por la presencia de DSBs.

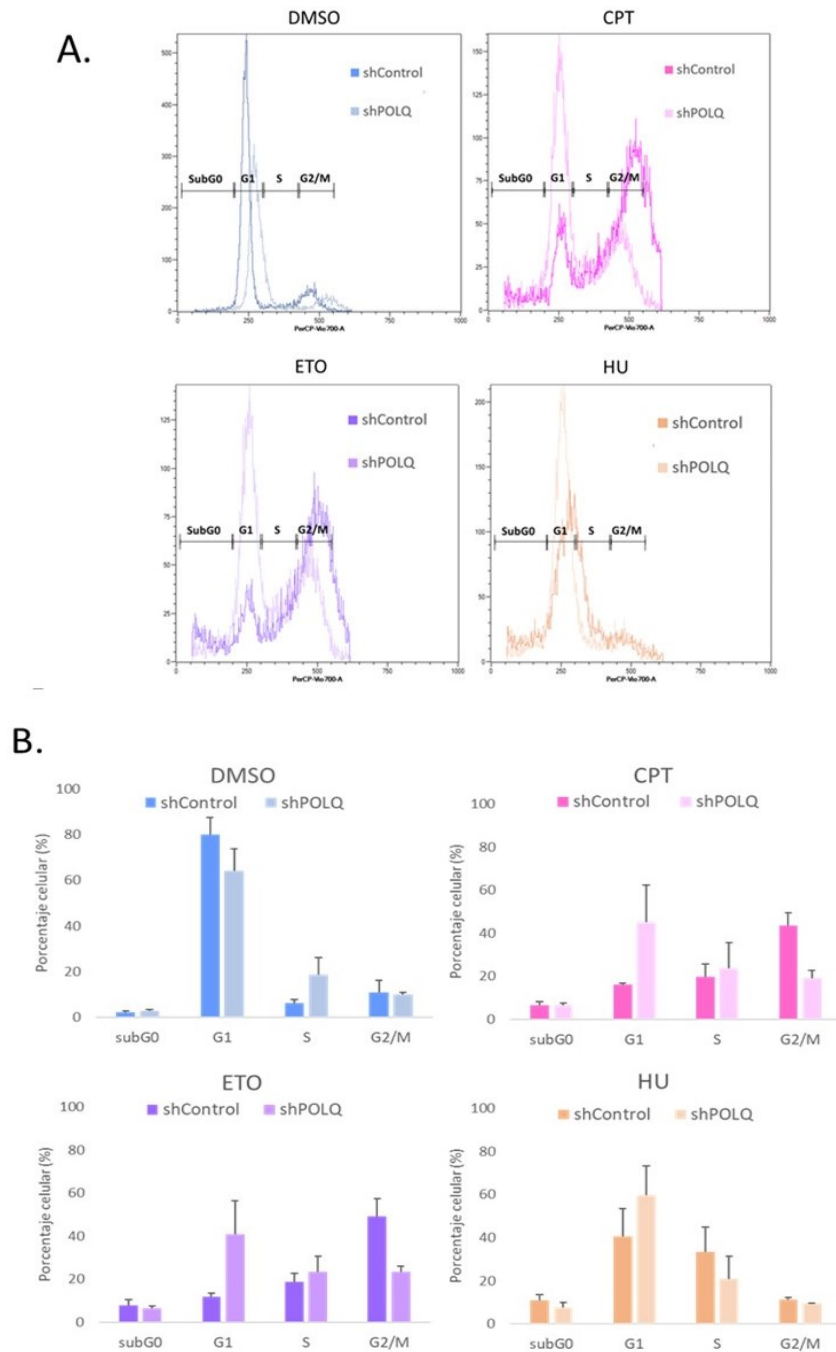


Figura 4.- **Análisis de ciclo celular en células PC3 *shControl* y *shPOLQ* tras el tratamiento con fármacos.** A. Histogramas de las fases del ciclo celular en *shControl* y en *shPOLQ*, se representa la detección del ioduro de propidio (PerCP-Vio700A) frente al número celular. Los diferentes tratamientos se muestran en la parte superior. Las imágenes pertenecen a un experimento representativo de un total de tres realizados. B. Porcentaje de células con *shControl* y *shPOLQ* en cada fase del ciclo tras el tratamiento con los diferentes fármacos. En la parte superior se indican los tratamientos y en la inferior las fases del ciclo. Las barras de los gráficos representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos.

En la bibliografía se describe que el tratamiento con CPT en células cancerígenas de pulmón [22] y con ETO en células de diferentes tipos de cáncer (mama, cervical, osteosarcoma y glioblastoma) [23] llevaría a una acumulación de las células en fase G2 por la activación del punto de control de G2/M, evitando así la progresión del ciclo y la división celular debido a la presencia de daño en las células. Por lo tanto, lo que observamos en el caso de las células control tras los tratamientos es lo esperable tras el uso de estos fármacos. Sin embargo, en las células con *POLQ* silenciado y tratadas posteriormente con CPT o ETO, las gráficas obtenidas muestran resultados notablemente distintos. En comparación con *shControl*, en *shPOLQ* se observa una disminución de células en fase G2/M, un ligero incremento en fase S y un aumento destacado de las que están en fase G1 (figura 4). De nuevo el pico de G1 aparece ligeramente

desplazado a la derecha, lo mismo que ocurre en caso del tratamiento con DMSO (figura 4A). Esto sugeriría que las células encuentran aún más dificultad a la hora de iniciar y progresar con la replicación. También indicaría una activación de los puntos de control de las fases G1 y S de tal forma que las células, al detectar la presencia de DSBs que no estarían siendo reparadas por la polimerasa POL θ , bloquean el avance en el ciclo, evitando así la duplicación de DNA dañado. En la bibliografía encontramos un estudio donde se obtienen resultados similares tras el empleo de CPT en células de cáncer de colon [24]. En él se sugiere que el bloqueo en el ciclo antes de entrar en fase S se produce por la detección de fallos en la reparación del DNA. Esta hipótesis estaría evidenciando que el silenciamiento de *POLQ* estaría provocando defectos en la reparación de DSBs y estas estarían acumulándose, dando lugar a la activación de los diferentes puntos de control del ciclo que evitan el progreso hacia la división celular.

En cuanto al tratamiento con HU, se observan resultados ciertamente similares entre las células control y las células silenciadas (figura 4). En ambas líneas, con HU disminuye el porcentaje celular en G1 y destaca el incremento de células en fase S. Esto sugiere la acumulación de células en S debido a la falta de desoxirribonucleótidos por la acción del fármaco, impidiendo así la replicación del DNA. Este efecto en el ciclo celular ha sido descrito con anterioridad [25]. Además, en shPOLQ encontramos el mismo aumento de células que parecen estar en el inicio de la fase S en comparación con el control, lo que indicaría que tras inhibir POL θ las células presentan más daño en el DNA y encuentran una mayor dificultad para entrar en fase S y continuar el ciclo.

En conjunto, estos resultados estarían indicando que la inhibición de POL θ conlleva a una acumulación de células al inicio de la fase S. Para continuar estudiando el papel de POL θ frente al estrés replicativo en estas células tumorales de CP, se consideraría interesante realizar experimentos de sincronización de ciclo, pudiendo observar las posibles diferencias en la capacidad de las células para progresar en el ciclo celular. Además, medir los niveles de las proteínas implicadas en los diferentes puntos de control podría dar claridad a estos resultados.

Clonaje plasmídico para silenciamiento inducible de POLQ

De forma complementaria, en este trabajo se llevó a cabo el clonaje de un plásmido inducible por doxiciclina denominado *LT3-POLQ* que permitiera silenciar de forma controlada la polimerasa POL θ . Esto permitiría tener líneas celulares cuya disponibilidad pudiera ser más duradera, a diferencia de aquellas silenciadas con *shPOLQ*, ya que el silenciamiento comienza desde el inicio de la transfección. Las líneas celulares PC3 y LNCaP fueron infectadas con los virus que contenían *LT3-Renilla* (control) y *LT3-POLQ* y, tras la selección con neomicina, se llevaron a cabo análisis de los niveles de silenciamiento de la enzima para comprobar la eficacia del sistema. Se obtuvieron silenciamientos del 60% en PC3 y 50% en LNCaP (figura 5) por lo que se concluyó la adecuada funcionalidad del plásmido.

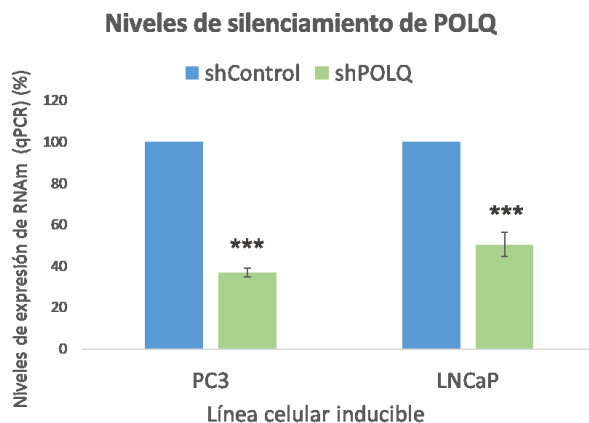


Figura 5.-Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de *POLQ* en las líneas inducibles de PC3 y LNCaP. La expresión de los genes se midió mediante RT-qPCR usando como referencia el gen *RPLP0* y tomando como control el *shControl*. Las barras de los gráficos representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar de los mismos. (***, $p < 0.001$).

Adicionalmente, el plásmido contenía la secuencia que permitía la síntesis de la proteína dsRed de forma que, al activarse el promotor tras la adición de doxiciclina, se pudiera observar mediante microscopía de fluorescencia la presencia y activación de la construcción en las líneas celulares infectadas. La técnica se llevó a cabo según lo explicado en el apartado de microscopía de fluorescencia de Material y métodos. Las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia permitieron comprobar la presencia de la construcción en las líneas celulares PC3 y LNCaP (figura 6). En ambas líneas celulares, en las placas en las que no se añadió doxiciclina (DOX-), no se detectaron células rojas. Sin embargo, sí se detectó fluorescencia en las placas en las que se había añadido previamente la doxiciclina (DOX+), confirmando así la adecuada infección de las células y la activación del plásmido.

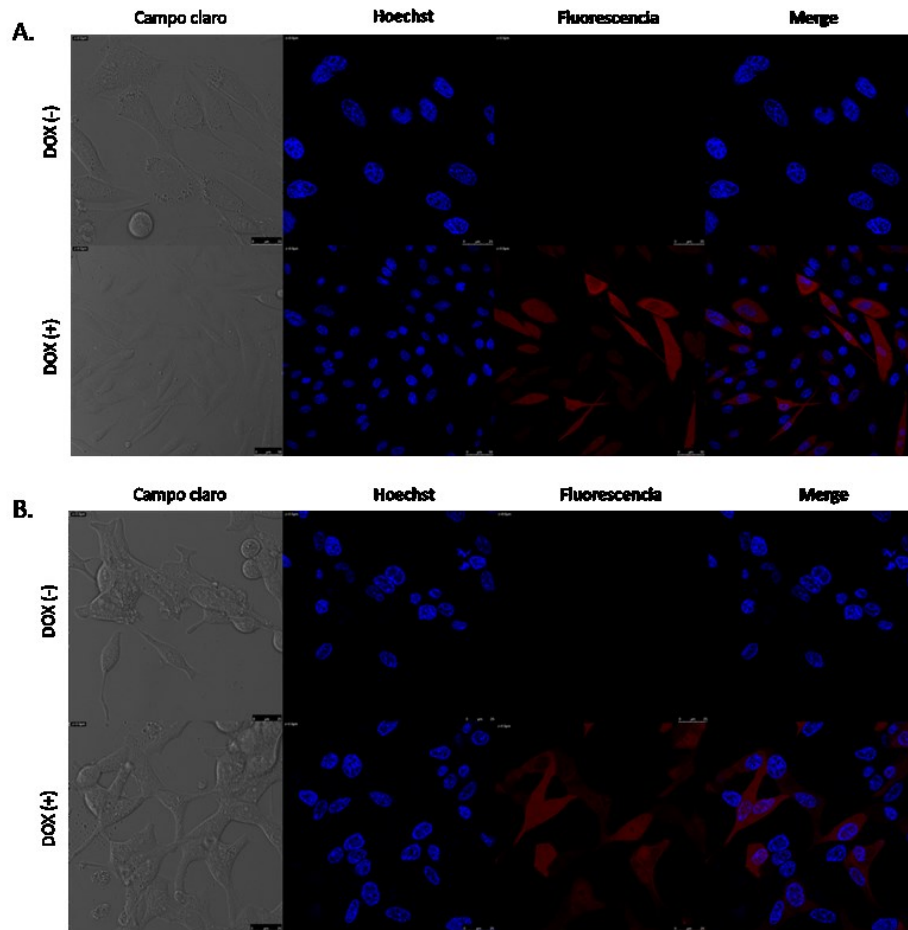


Figura 6.- Activación del plásmido inducible *LT3-POLQ*. Comprobación de niveles de fluorescencia tras la adición (DOX+) o no (DOX-) de doxiciclina. Se muestran las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia que pertenecen a un experimento representativo de dos realizados. A. Línea celular PC3. B. Línea celular LNCaP.

Una vez comprobada la funcionalidad del plásmido inducible *LT3-POLQ*, resultaría interesante continuar con el estudio del papel de POL θ frente al estrés replicativo en estas líneas inducibles, repitiendo los diferentes experimentos realizados en este trabajo y añadiendo aquellos que permitan aportar nueva información al estudio.

Conclusiones

Los experimentos llevados a cabo en este trabajo nos han permitido detectar cuál es la principal función de la polimerasa theta en las células de cáncer de próstata. Nuestros resultados indican que la inhibición de POL θ tiene un efecto sobre la distribución del ciclo celular, de tal forma que se produce una acumulación de células en la fase S, especialmente al inicio, retrasando y dificultando la duplicación del DNA y el progreso del ciclo. Esto sugiere que su función en estas células es hacer frente al estrés replicativo. Además, nuestros datos muestran el correcto establecimiento de líneas celulares inducibles de PC3 y LNCaP, las cuales contienen el plásmido inducible por doxiciclina *LT3-POLQ*, capaz de inhibir la polimerasa theta.

Referencias

1. Lieber M. R. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79: 181–211
2. Chang, H. H., Pannunzio, N. R., Adachi, N., and Lieber, M. R. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(8): 495-506.
3. Bunting, S. F., and Nussenzweig, A. 2013. End-joining, translocations and cancer. *Nature reviews Cancer*, 13(7): 443-454.
4. Hoeijmakers, J. H. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15): 1475-1485.

5. Lord, C. J., and Ashworth, A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381): 287-294.
6. Thompson, L. H. 2012. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(2): 158-246
7. Schrepf, A., Slyskova, J., and Loizou, J. I. 2021. Targeting the DNA repair enzyme polymerase θ in cancer therapy. *Trends in cancer*, 7(2): 98-111
8. Mateos-Gomez, P. A., Kent, T., Deng, S. K., McDevitt, S., Kashkina, E., Hoang, T. M. and Sfeir, A. 2017. The helicase domain of Pol θ counteracts RPA to promote alt-NHEJ. *Nature structural and molecular biology*, 24(12): 1116-1123.
9. Ahrabi, S., Sarkar, S., Pfister, S. X., Pirovano, G., Higgins, G. S., Porter, A. C., and Humphrey, T. C. 2016. A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic acids research*, 44(12): 5743-5757.
10. Seol, J. H., Shim, E. Y., and Lee, S. E. 2018. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 809: 81-87.
11. Brambati, A., Barry, R. M., and Sfeir, A. 2020. DNA polymerase theta (Pol θ)—an error-prone polymerase necessary for genome stability. *Current opinion in genetics & development*, 60: 119-126.
12. Ceccaldi, R., Liu, J. C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M. I., and D'Andrea, A. D. 2015. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair. *Nature*, 518(7538): 258-262.
13. Goullet de Rugy, T., Bashkurov, M., Datti, A., Betous, R., Guitton-Sert, L., Cazaux, C., and Hoffmann, J. S. 2016. Excess Pol θ functions in response to replicative stress in homologous recombination-proficient cancer cells. *Biology Open*, 5(10): 1485-1492.
14. Yousefzadeh, M. J., and Wood, R. D. 2013. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA repair*, 12(1): 1-9.
15. Wood, R. D., and Doublíé, S. 2016. DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA repair*, 44: 22-32.
16. Mateos-Gomez, P. A., Gong, F., Nair, N., Miller, K. M., Lazzarini-Denchi, E., and Sfeir, A. 2015. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature*, 518(7538): 254-257.
17. Wang, Z., Song, Y., Li, S., urian, S., Xiang, R., Chiba, T., and Wu, X. 2019. DNA polymerase θ (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *Journal of Biological Chemistry*, 294(11): 3909-3919.
18. Soria, A.M., Cardá, C.L., López, A.B. and Hernández, J.G. 2012. El cáncer de próstata resistente a castración. Mecanismos de progresión y nuevos tratamientos. *Revista Cubana de Urología*, 1(1): 106-122.
19. Pernar, C.H., Ebot, E.M., Wilson, K.M. and Mucci, L.A. 2018. The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(12): a030361.
20. Savón Moiran, L. 2019. Cáncer de próstata: actualización. *Revista Información Científica*, 98(1): 117-126.
21. Kuo, L. J., and Yang, L. X. 2008. γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*, 22(3): 305-309.
22. Wu, K. M., Chi, C. W., Lai, J. C. Y., Chen, Y. J., and Kou, Y. R. 2020. TLC388 induces DNA damage and G2 phase cell cycle arrest in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Control*, 27(1): 1073274819897975.
23. Bloniarz, D., Adamczyk-Grochala, J., Lewinska, A., and Wnuk, M. 2021. The lack of functional DNMT2/TRDMT1 gene modulates cancer cell responses during drug-induced senescence. *Aging (Albany NY)*, 13(12): 15833.
24. Goldwasser, F., Shimizu, T., Jackman, J., Hoki, Y., O'Connor, P. M., Kohn, K. W., and Pommier, Y. 1996. Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer research*, 56(19): 4430-4437.
25. Musiałek, M. W., and Rybaczek, D. 2021. Hydroxyurea-The Good, the Bad and the Ugly. *Genes*, 12(7): 1096.