

Capacidad antitumoral de dos aptámeros dirigidos a VRK1 para el tratamiento del cáncer anaplásico de tiroides.

Jesús Ángel Amo-Montiel^{1, 2, a}, Celia Pinto-Diez², Ana Salgado-Figueroa², María Elena Martín², Víctor Manuel González²

1. 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. 2. Grupo de aptámeros, Departamento de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS, 28034, Madrid, España.

a. jesus67delamo@gmail.com

Palabras clave: VRK1; kinase; ATC; DNA aptamers; cell cycle

Resumen

VRK1 (vaccinia related kinase) es una serina/treonina quinasa que tiene un papel fundamental tanto en la progresión del ciclo celular como en la respuesta al daño en el DNA, mediante la fosforilación de multitud de proteínas involucradas en estos procesos. La sobreexpresión de VRK1 en diversos tipos de cáncer tiene un impacto negativo en el pronóstico de esta patología. Por ello, VRK1 se considera como una potencial diana terapéutica en oncología. Por otra parte, el cáncer anaplásico de tiroides (ATC) es uno de los tipos de tumor más agresivos y letales, ya que tiene una gran capacidad para invadir otros tejidos. En el presente artículo se ha estudiado la capacidad antitumoral de dos aptámeros dirigidos a VRK1 en dos líneas celulares de ATC. Los resultados sugieren que ambos aptámeros tienen, en un rango de concentración de nM, un efecto antitumoral sobre las dos líneas tumorales de ATC estudiadas, de forma que el aptámero apVRKF8 produce la apoptosis de las mismas, mientras que el apVRKF28 induce un bloqueo de la progresión del ciclo celular en G2. Además, el aptámero apVRKF28 parece tener un mayor efecto sobre estas líneas, ya que, bloquea de forma significativa la capacidad que tiene una célula para dividirse después del tratamiento con el aptámero. Por consiguiente, estos inhibidores específicos de VRK1 confirman el potencial terapéutico como diana de VRK1 y se propone el aptámero apVRKF28 como inhibidor de VRK1 que podría ser utilizado para el tratamiento del ATC.

Cita: Amo-Montiel, Jesús Ángel; Pinto-Diez, Celia; Salgado-Figueroa, Ana; Martín, María Elena; González, Víctor Manuel (2024) Capacidad antitumoral de dos aptámeros dirigidos a VRK1 para el tratamiento del cáncer anaplásico de tiroides. *dianas* 13 (2): e202409fp01. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202409fp01 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202409fp01>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Amo-Montiel J, Pinto-Diez C, Salgado-Figueroa A, Martín ME, González VM. 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

Cáncer anaplásico de tiroides

El cáncer de tiroides (CT) es el tumor maligno más frecuente del sistema endocrino. La incidencia del CT ha aumentado en todo el mundo en las últimas cuatro décadas [1]. El CT se divide en tres tipos histológicos principales: diferenciado (papilar y folicular), indiferenciado (poco diferenciado y anaplásico) y medular, que surge de las células del CT [2]. Entre todas las neoplasias tiroideas, el ATC es el que cursa con peor pronóstico, y es el más letal, ya que a diferencia de los otros tipos tumorales tiroideos, es capaz de metastatizar con mucha rapidez y facilidad. Cuenta con una supervivencia media de 5-12 meses y una tasa de supervivencia a 1 año del 20-40 %. Es un cáncer poco frecuente, representa aproximadamente el 3,6% de las neoplasias malignas de tiroides en Europa. [3] En parte, debido a su rareza y su letalidad, se ha avanzado poco en el tratamiento de este tipo de cáncer hasta recientemente. Además, se suele diagnosticar cuando la enfermedad ya está muy avanzada pues no presenta muchos síntomas. El mayor obstáculo para el tratamiento del ATC sigue siendo la resistencia a los tratamientos actuales, por ello, existe una necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas, que puedan ser utilizadas en combinación con inmunoterapia, entre otras, para superar este problema. [4]

VRK1 (Vaccinia related kinase)

VRK1 es una serina/treonina quinasa que pertenece a la familia de las quinasas humanas VRK, entre las que encontramos también a VRK2 que posee dos isoformas diferentes (VRK2A y VRK2B) resultantes del procesamiento alternativo de su ARN mensajero, y a VRK3 que es catalíticamente inactiva debido a sustituciones en aminoácidos clave en su dominio quinasa. VRK1 se expresa en muchos tipos celulares y predominantemente se encuentra en el núcleo, libre en el nucleoplasma o asociada al nucléolo. Además, se ha descrito que VRK1 está asociada a la cromatina formando complejos con histonas y factores de

ensamblaje. Sin embargo, cabe destacar también su presencia en el citoplasma, asociada al aparato de Golgi en la zona perinuclear. [5] El gen de VRK1 rara vez está mutado en cáncer, pero su sobreexpresión en ciertos tumores (mieloma múltiple, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, de esófago, colon, mama, gástrico, hígado y gliomas) está relacionada con un mal pronóstico [6]. VRK1 fosforila a varios factores de transcripción como p53, c-Jun, CREB y ATF2; a varias proteínas de respuesta al daño en el DNA como H2AX y 53BP1; y, además, fosforila a las histonas H3 y H2A, regulando la modificación de histonas [7]. Los mayores niveles de ARN mensajero de VRK1 se encuentran en tejidos con una alta tasa proliferativa como el hígado y el timo. Además, diversos estudios han dilucidado que el silenciamiento de esta proteína mostraba defectos en la proliferación, ya que las células no podían completar su división normal. Por ello, VRK1 juega un papel muy importante en la progresión del ciclo celular, ya que se requiere su actividad para la progresión de la fase G0, por la fosforilación de c-Jun y CREB entre otros, G1/S, ya que regula la expresión de la ciclina D1, y G2/M, por la fosforilación de la H3 y su implicación en la fragmentación del Golgi, que es indispensable para su redistribución en las 2 células hijas en fase M [8]. Por ello, VRK1 se ha descrito como una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer. [6]

Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla, que pueden ser de ADN o de ARN, de 20 – 100 nucleótidos de longitud que se estructuran tridimensionalmente dependiendo de su secuencia, lo que les permite unirse de forma específica a una diana por interacciones electrostáticas. Los aptámeros se seleccionan a través del método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), en el cual se parte de una extensa librería de oligonucleótidos con una región central aleatoria flanqueada por dos regiones de secuencia conocida, de 18-20 nucleótidos (a las que se unirán los cebadores en la PCR). Estas secuencias se enfrentarán a la diana, y las que no se unan, se eliminarán. Mientras que aquellas que sean capaces de reconocer dicha diana, se amplificarán por PCR, completando una ronda de selección. Gracias a sucesivos ciclos, la librería inicial es reducida a unas pocas secuencias específicas para su diana [9]. Los aptámeros tienen un gran potencial diagnóstico y terapéutico debido a su capacidad de reconocimiento de forma afín y específica a su diana, y a su gran versatilidad y estabilidad a cambios de temperatura y pH. Los aptámeros son moléculas que pueden formar estructuras secundarias complejas como tallos, horquillas, cuadruplexos G, etc. Estas estructuras determinan la unión a su diana. Además, los aptámeros, a diferencia de los anticuerpos, no suelen ser inmunogénicos y su pequeño tamaño les permite una entrada más eficiente a las células [10]. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antitumoral de dos aptámeros específicos frente a la proteína VRK1 seleccionados en el laboratorio, el aptámero apVRKF8 y apVRKF28, en líneas celulares del cáncer anaplásico de tiroides.

Material y Métodos

Cultivos Celulares

Las líneas celulares eucariotas utilizadas fueron: Cal62 [Línea celular derivada del cáncer anaplásico de tiroides, caracterizada por tener mutado CREBBP (c.4621G>T); EP300 (c.4454delA), KRAS (c.34G>C); NF2; (c.643G>T); y TP53 (c.482C>A)] y 8505c [Línea celular derivada del cáncer anaplásico de tiroides, caracterizada por tener mutado BRAF (c.1799T>A), NF2 (c.385G>T), TERT (c.250C>T) y TP53 (c.742C>G)].

Ambas líneas celulares se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm² con medio completo DMEM (Biowest SAS, Francia) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de piruvato, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina, en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95%O₂. Además, se realizó una PCR con un kit (Biotools) para comprobar que los cultivos celulares estaban libres de contaminación por *Mycoplasma sp.*

Las células se levantaron de forma química empleando tripsina 1x (Gibco, Reino Unido) lavando previamente con PBS (tampón fosfato salino: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 137 mM y cloruro de potasio 2.7 mM, pH 7.4) (BioMerieux, Francia) para eliminar restos de suero que pudieran interferir en la actividad de la tripsina.

Transfección de células

El tratamiento de las células con los dos aptámeros utilizados en este trabajo (el apVRKF8 y el apVRKF28) se ha realizado con el sistema de transfección LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, EEUU). La transfección de las células se realizó 16-24 horas después de sembrarse y alcanzar el 70-80% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se utilizó la lipofectamina según las indicaciones del fabricante, ajustando los reactivos a cada densidad celular, el tipo de placa y el ensayo realizado. El complejo ADN-lipofectamina se preparó diluyendo primero por separado la lipofectamina y los aptámeros en opti-MEM (Gibco, EEUU), que se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se mezclaron para formar los complejos lipofectamina-aptámero y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se añadió la mezcla sobre las células previamente lavadas

dos veces con medio sin antibiótico para evitar interferencias con la lipofectamina. Las células se incubaron a 37°C durante 4 horas, tras las cuales se retiró el reactivo y se añadió medio completo.

Ensayos de viabilidad celular. Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT)

Las células se sembraron en placas p96 a una densidad de 10.000 células/pocillo y 48 horas después de la transfección se retiró el medio y se añadieron 100 µl /pocillo de sales de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) a 0.5 mg/ml en medio de cultivo, incubando durante 50 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de lisis (10% de dodecil sulfato sódico (SDS) y 10 mM de HCl). Tras 16-24 horas a 37°C se determinó por espectrofotometría la reducción de MTT a 540 nm en el SPECTRA FLUOR. Los resultados son expresados como porcentaje de viabilidad con respecto al control.

Ensayos de ciclo celular

Para realizar estos ensayos, se sembraron 5×10^5 células no sincronizadas por pocillo en una placa p6 que se recogieron a las 24 horas de haber sido transfectadas con ambos aptámeros. Se levantaron las células y se guardaron en tubos independientes, centrifugándolos a 400 g durante 5 minutos a 4°C entre ellos. Posteriormente, las células se fijaron con 100 µL de paraformaldehído 4% durante 10 minutos a RT. A continuación, se realizaron un lavado con 1 mL de PBS centrifugando a 400 g durante 5 minutos, y las células se resuspendieron en 500 µL de PBS. Finalmente se añadió una gota del kit Invitrogen™ FxCycle™ Violet Ready Flow™ Reagent. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y se pasaron por el citómetro de flujo. Por último, los datos fueron analizados mediante el programa Flowing software. 4.7.

Ensayos de formación de colonias

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron 5×10^5 células/pocillo en placas p6. A las 16- 24 horas, las células se transfectaron y 16-24 horas posttransfección las células se recogieron, se contaron y tras realizar las diluciones adecuadas, se resembraron 1×10^3 por duplicado en placas p6. Con las células sobrantes se obtuvieron lisados celulares. Estas placas se incubaron con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂ durante 6-12 días. Transcurrido este tiempo, cuando las células habían formado colonias de al menos 50 células, se fijaron con 1 ml/pocillo de metanol (Merck, Alemania) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron con giemsa al 0.02% (Sigma-Aldrich, EEUU) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y por último se lavaron con agua para eliminar restos del colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para contar las colonias se escaneó la p6 con el sistema de adquisición de imagen y se analizó con el software ImageJ. Los resultados se expresaron en % área de colonias respecto al control.

Obtención de lisados celulares

Con las células en suspensión sobrantes del ensayo de formación de colonias, se obtuvieron lisados celulares. Para ello, se centrifugaron los tubos a 1500 rpm 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de TLC y se volvió a centrifugar. Tras eliminar el sobrenadante, se lisaron las células en TLC tritón 1% (1:2) y se centrifugó a 11300 rpm 10 minutos a 4°C. Finalmente se guardaron los sobrenadantes a -80°C y se realizó un BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante para calcular la averiguar la concentración de proteína de cada tubo.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se llevó a cabo mediante el empleo de un sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas de BIORAD (Miniprotean II Cell) utilizando geles de poliacrilamida del 10% y 15% en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). Como agentes polimerizantes se utilizaron N-N-N'-N'-tetrametilendiamina (TEMED) al 0.86% y persulfato amónico a una concentración final de 0.45 µg/µl. La electroforesis se realizó en presencia de SDS al 10%, en un tampón de electroforesis (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; Glicina 192 mM y SDS al 10%). Como marcador de peso molecular se usó PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Las muestras se prepararon en tampón de carga (Tris-HCl 180 mM, pH 6.8; 9% de SDS; 6% de β-mercaptoetanol; 15% de glicerol y 0.025% de azul de bromofenol) en un volumen final de 30 µl y se resolvieron a 200 V durante 50 minutos-1 hora.

Transferencia de proteínas e inmunodetección (Western blot)

Las proteínas resueltas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema continuo y húmedo en solución de transferencia TrisGlicina/Metanol (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM y metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora. Las membranas fueron bloqueadas 1 hora en PBS-Blotto (o leche en polvo desnatada) al 5% a temperatura ambiente antes de incubarla con el anticuerpo primario, que se diluyó en PBS-Tween al 0,1%. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4°C, y los secundarios, diluidos en PBS-Blotto al 1%, 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo de dos maneras diferentes en función del

anticuerpo empleado: para los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se empleó un sistema de quimioluminiscencia con Clarity™ Western ECL Substrate (BIO RAD), mientras que para los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina se emplearon reactivos para ensayos colorimétricos. Entre anticuerpos y revelado se realizaron lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0.05%. La cuantificación de bandas se realizó en un analizador de imágenes equipado con el programa Image Quant TL. Los datos se obtuvieron en unidades de densidad óptica/mm².

Aptacitoquímica (ACQ) e Inmunocitoquímica (ICQ). Microscopía Confocal.

Para estudiar la localización intracelular de los aptámeros y comprobar su unión a VRK1 se realizaron estos ensayos en placas p8 (Ibidi) que son placas tratadas con un polímero específico para que se unan las células a la superficie y se pueden ver en el microscopio confocal. Para ello, las células se sembraron a una densidad de 10.0000 células/pocillo y se transfectaron con los aptámeros marcados con biotina (100 nM). Posteriormente, se fijaron las células con 300 µL de metanol frío durante 20 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con PBS-FBS al 10% durante 90 minutos. Después, se añadió anticuerpo anti VRK1 y se dejó incubando O/N a 4 °C. Al día siguiente, se lavó con 3 veces con PBS y se añadió estreptavidina-FITC 1/200 en PBS-FBS al 10% 1 h a RT en oscuridad (que reconocerá la biotina del aptámero). Después de lavar 3 veces con PBS se añadió antimouse Alexa Fluor 568 1/400 (que reconocerá el Ac anti VRK1) y tras lavar de nuevo 3 veces con PBS, se añadió 3 µL de Hoechst 1/1000 en PBS durante 5 minutos y finalmente, se lavó y se dejó en 300 µL de PBS-azida al 0,1 % y se vio al microscopio confocal. Para la ACQ no se transfectaron los aptámeros biotinilados, sino que se usaron una vez que las células estaban fijadas para que reconocieran la proteína. Es decir, se incubaron las células con ellos durante 1h a RT antes de añadir la streptavidina-FITC.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism® versión 8.0. Todos los datos representaron como la media ± error estándar de la media (SEM). Para el estudio de las diferencias significativas entre la media de dos grupos experimentales con respecto a las muestras control, se realizó una t student y el análisis de la varianza (ANOVA) para más de dos grupos. La significación estadística se expresó como: *, p<0.05 (significativo).

Resultados

Análisis de la expresión de VRK1 en diferentes líneas celulares

Inicialmente, se realizó un western blot para analizar la expresión de VRK1 en diferentes líneas celulares tumorales. De izquierda a derecha se estudió la expresión en las líneas: Cal62 (ATC), 8505c (ATC), HT29 (Cáncer de colon), A549 (Cáncer de pulmón), SW900 (Cáncer de pulmón), MCF7 (Cáncer de mama) y MDA-MB-231 (Cáncer de mama). Las líneas de cáncer de mama se utilizaron como control positivo, ya que se conocía la expresión de la proteína en ellas y en la línea MCF7 se han obtenido buenos resultados con los aptámeros usados en el presente estudio [11]

Con estos resultados, se decidió probar los aptámeros frente a VRK1 en cáncer anaplásico de tiroides, con las líneas 8505c, que mostró una mayor expresión de la proteína y Cal62 que tenía poca expresión de esta.

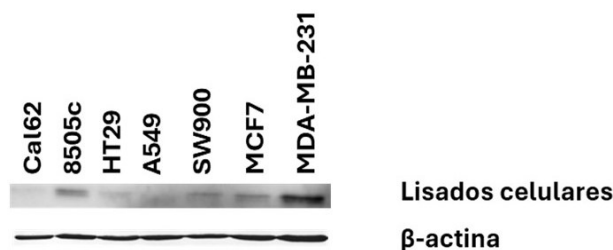


Figura 1. Análisis de la expresión de VRK1 en diferentes líneas celulares.

Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT). Viabilidad celular.

Después, se realizó un MTT en ambas líneas celulares con ambos aptámeros (apVRKF8 y apVRKF28) para calcular una IC₅₀ (concentración de aptámero a la que se produce la mitad del efecto máximo) con la que trabajar en los ensayos posteriores. Se trata de un método colorimétrico para medir la actividad metabólica celular, ya que las células viables son capaces de reducir el tinte de tetrazolio, MTT, a formazán que posee un color púrpura gracias a enzimas oxidoreductasas. De forma que, mayor intensidad de color púrpura indica una mayor cantidad de células viables que son capaces de reducir el MTT y, por tanto, mayor viabilidad celular.

Para la línea 8505c, la IC_{50} para el aptámero apVRKF8 fue de 40 nM y para el apVRKF28 de 20 nM y para la línea Cal62, la IC_{50} para el aptámero apVRKF8 fue de 10 nM y para el apVRKF28 de 5 nM. Estas concentraciones fueron utilizadas para todos los ensayos posteriores.

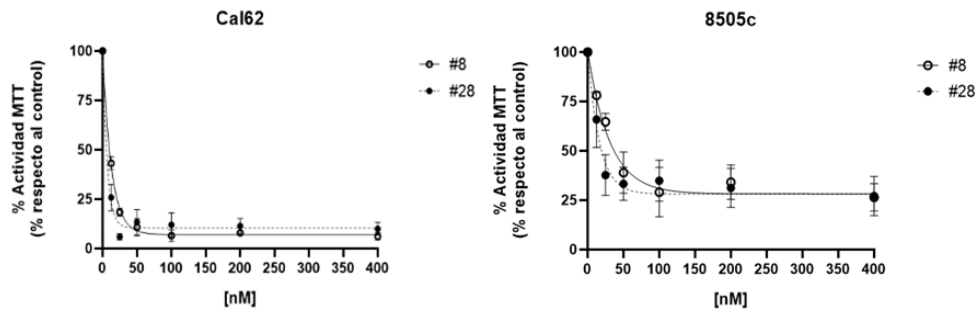


Figura 2. Determinación de la viabilidad celular en las líneas celulares Cal62 y 8505c, para calcular la IC_{50} de ambos aptámeros. Las gráficas representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Determinación de la actividad clonogénica

Fijadas las concentraciones de trabajo, se procedió a ensayos de formación de colonias, ya que la capacidad de una única célula para establecer una colonia de al menos 50 células es esencial para el funcionamiento de los tejidos [12]. Este hecho también se produce en células tumorales, pero se intenta anular para evitar recidivas [13]. Así, se podría analizar si la célula conserva su capacidad de dividirse después del tratamiento con los aptámeros de forma ilimitada.

Estos resultados sugieren capacidad inhibitoria del aptámero apVRKF8 ($p = 0,07$) y apVRKF28 ($p < 0,05$) para la actividad clonogénica de la línea Cal62 y del apVRKF28 ($p < 0,05$) sobre la línea 8505c.

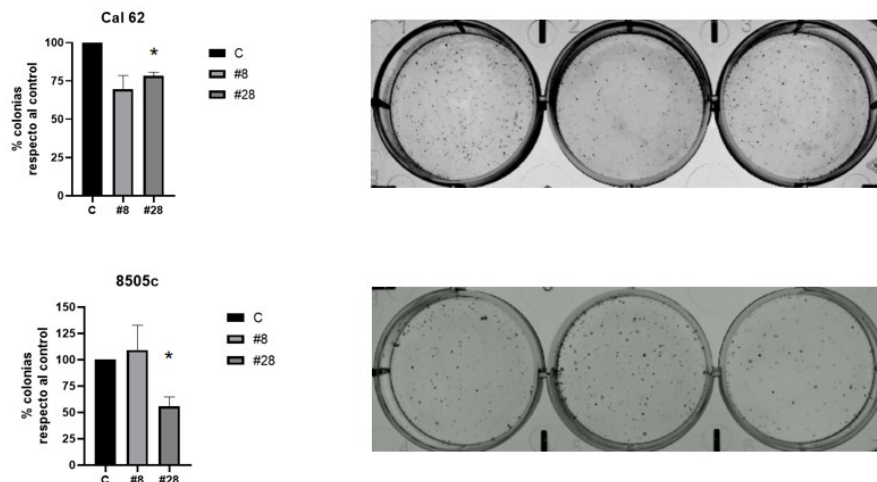


Figura 3. Efecto de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 sobre la actividad clonogénica de las líneas Cal62 y 8505c. Las gráficas representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ respecto al control)

Estudio del ciclo celular

También, para determinar si el efecto de los aptámeros en el ensayo del MTT, era debido a una parada en el ciclo celular, se estudió el efecto de los aptámeros en el ciclo celular, puesto que VRK1 es una proteína clave en la progresión del ciclo y la proliferación.

Estos resultados sugieren la capacidad del aptámero apVRKF28 de detener el ciclo celular en la fase G2/M de forma significativa en la línea Cal62. Además, en la línea 8505c se puede ver un indicio del aumento de la fase G2/M, reduciendo la fase G0/G1. Lo que sugeriría una detención del ciclo en la fase G2/M en el aptámero apVRKF28 en esta línea. Por otra parte, el aptámero apVRKF8 no parece tener implicación en el ciclo en estas líneas celulares.

Para completar más estudios sobre el ciclo celular, se analizaron mediante western blot los niveles de expresión de la proteína pCdk2 (Tyr15), ya que esta proteína se mantiene activa cuando la Tyr15 está defosforilada por la fosfatasa CDC25, de forma que elevados niveles de fosforilación de esta proteína indican una parada del ciclo en G1/S, de manera que Cdk2 estaría inactiva (fosforilación inhibitoria) y no podría progresar el ciclo [14].

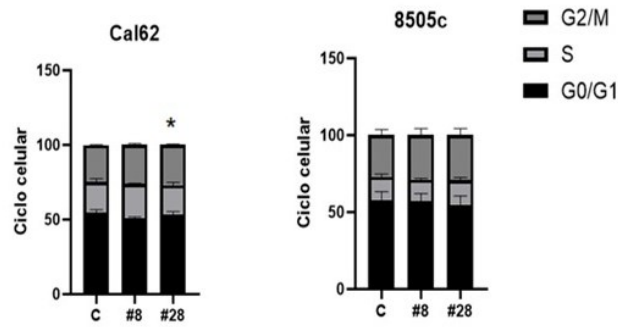


Figura 4. Efecto de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 sobre el ciclo celular en las líneas Cal62 y 8505c. Las gráficas representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0.05$ respecto al control)

También se analizaron los niveles de pH3 (Ser10), porque la H3 se fosforila en este residuo cuando los cromosomas se condensan en mitosis, por lo que elevados niveles de fosforilación de esta proteína indican una parada del ciclo en fase M.

No se muestra una diferencia significativa respecto al control, lo que indicaría que no se produce una parada del ciclo celular ni en la fase G1/S ni en la fase M, con ningún aptámero.

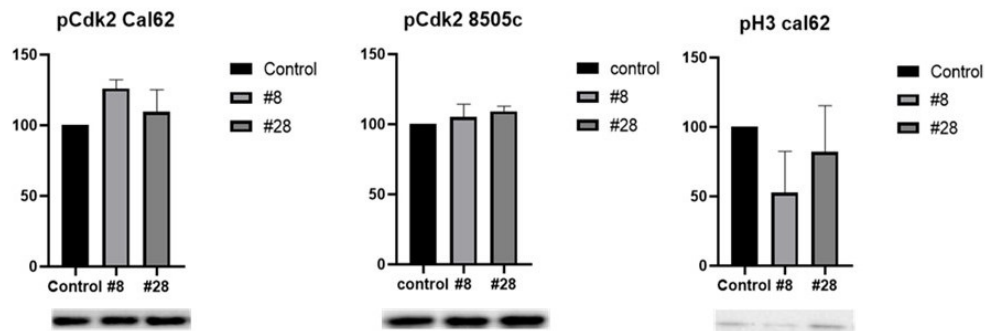


Figura 5. Estudio de marcadores del ciclo celular en las líneas Cal62 y 8505c. Las gráficas representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0.05$ respecto al control)

Estudio de la localización subcelular de la proteína VRK1 y los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 por ACQ e ICQ.

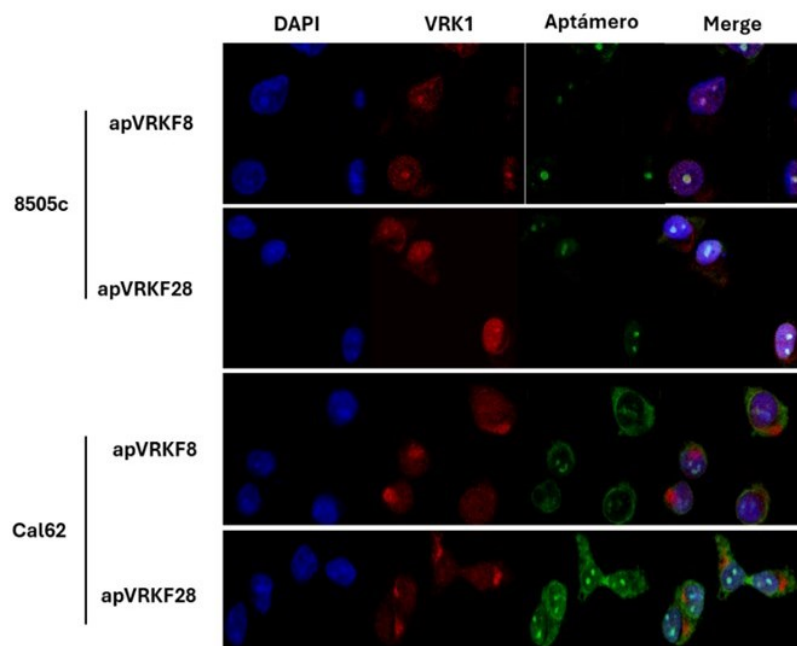


Figura 6. ACQ. Localización subcelular de VRK1 utilizando los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 (Aptacitoquímica) y un anticuerpo-anti-VRK1 (Inmunocitoquímica) en las líneas 8505c y Cal62

En la ACQ, podemos ver un patrón de distribución de VRK1 diferente en ambas líneas celulares. Ya que, en las 8505c, que presentaban mayor expresión de la proteína (Figura 1), se puede ver que la mayor parte de VRK1 se encuentra en el núcleo. Además, podemos ver una fuerte colocalización de los aptámeros con el anticuerpo mostrando la capacidad de estos de reconocer a la proteína de forma afin y específica. Sin embargo, en las Cal62 (que presentaban poca expresión de la proteína, Figura 1), VRK1 forma un acúmulo de proteína fuera del núcleo, si bien es cierto, que también está presente en el núcleo.

Como se puede ver en la figura 7, la transfección para ambos aptámeros funcionó correctamente ya que se pueden ver tanto dentro del núcleo como el citoplasma coincidiendo con la localización subcelular de VRK1. En ambas líneas celulares los aptámeros se encuentran formando agregados. Y se puede ver como la distribución de VRK1 en estas líneas celulares es diferente como se mencionaba anteriormente con la figura 6.

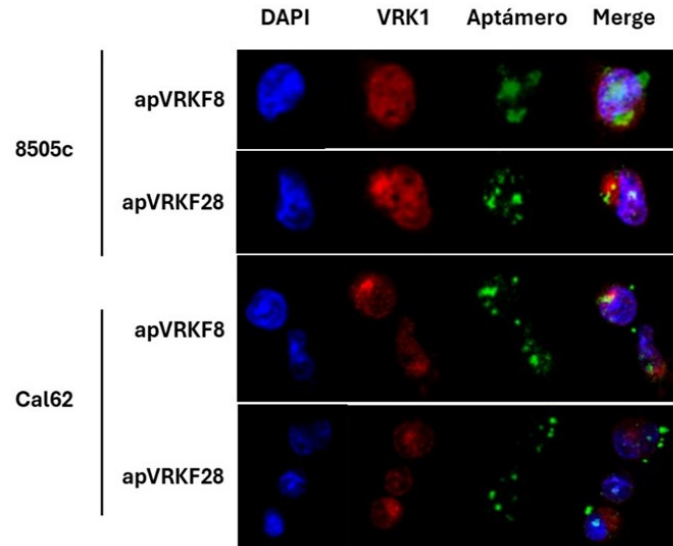


Figura 7. Localización subcelular de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 en las líneas 8505c y Cal62

Efecto de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 sobre la apoptosis

Para determinar si los aptámeros producían apoptosis en las células, se analizó la expresión de la enzima PARP procesada que es un sustrato endógeno de la caspasa 3. La actividad proteolítica de la caspasa 3 libera fragmentos de la enzima PARP de 89 KDa, y estos se encuentran presente en estados apoptóticos tardíos.

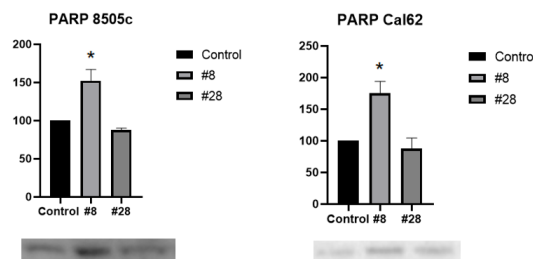


Figura 8. Efecto de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 sobre la apoptosis en líneas celulares de ATC. Las gráficas representan la media ± SEM de tres experimentos independientes. (*p<0.05 respecto al control)

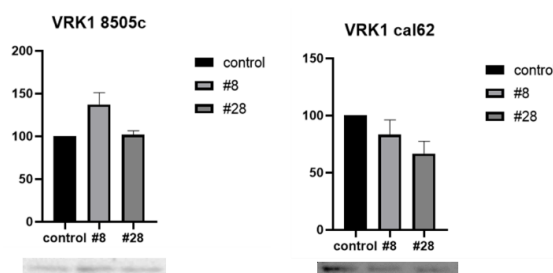


Figura 9. Efecto de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 sobre la expresión de VRK1 en líneas celulares de ATC. Las gráficas representan la media ± SEM de tres experimentos independientes. (*p<0.05 respecto al control)

Estudio de la expresión de la proteína VRK1

Para determinar si se reducía la expresión de la proteína VRK1 por el efecto de los aptámeros apVRKF8 y apVRKF28, se evaluó su expresión por western blot.

A la vista de la figura 9, solo se sugiere una reducción de la expresión de VRK1 en la línea Cal62 con ambos aptámeros (apVRKF28 \rightarrow $p=0,09$) aunque no de forma significativa. Sin embargo, este efecto no es visible en las 8505c.

Discusión

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada y la capacidad de invadir otros tejidos de las células tumorales [15]. Su incidencia, ha aumentado progresivamente en los últimos años a nivel mundial. En 2023, se estima que aparecieron 283.680 nuevos casos en España según la Asociación Española contra el cáncer (AECC). Por otra parte, VRK1 se ha descrito como una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer, pues su inhibición bloquea la proliferación y el ciclo celular de células tumorales de pulmón [16], de mama [11], ..., obteniendo resultados prometedores para el tratamiento del cáncer. Además, conociendo el potencial terapéutico que han mostrado los aptámeros a lo largo de los años por su gran capacidad de reconocimiento de dianas de forma específica y con mucha afinidad, en el presente estudio se estudió la actividad antitumoral de dos aptámeros apVRKF8 y apVRKF28 que reconocen de forma específica a VRK1 en líneas celulares de cáncer anaplásico de tiroides. Así pues, como las 8505c tenían una alta expresión de VRK1 y las Cal62 tenían poca expresión, se decidió llevar al tiempo ambas líneas celulares. Además, estos aptámeros habían bloqueado la progresión del ciclo celular en cáncer de mama [11].

En el ensayo del MTT se aprecia que las IC_{50} para la línea 8505c son más altas que para las Cal62, esto se espera por una mayor expresión de la proteína, si bien es cierto que el aptámero apVRKF28 parece ser más potente en estas líneas tumorales, ya que su IC_{50} es la mitad que la del aptámero apVRKF8. Además, son concentraciones del rango de 5-40 nM lo cual indica que estos aptámeros poseen mucha más potencia en las líneas celulares de ATC que otros inhibidores estudiados que están en el rango μ M [17].

Siguiendo esta línea del estudio, para ver si los aptámeros podrían potencialmente reducir el desarrollo del tumor, se evaluaron la actividad clonogénica y la proliferación celular. El aptámero apVRKF28 inhibió de forma significativa la capacidad clonogénica de las células en ambas líneas celulares, sin embargo, el apVRKF8 no tuvo este efecto en las 8505c, pero sí sugiere una reducción en la formación de colonias en la línea Cal62 aunque de forma no significativa ($p=0,07$). Además, el aptámero apVRKF28 también sugiere una parada del ciclo en fase G2/M de forma significativa en las Cal62 y de forma no significativa en 8505c. Si bien en otros estudios la inhibición de VRK1 producía una parada del ciclo en G1 [11,16] en otras líneas tumorales diferentes, la parada en G2/M que sugiere este estudio en las líneas de ATC, puede tener que ver con la implicación de VRK1 en la fosforilación en la Thr3 de la H3, la cual es necesaria para salir de la fase G2. Así, al inhibir VRK1 con el apVRKF28 se impediría esta fosforilación y no podría entrar la célula en profase [8]. Como se sugiere una parada en G2/M se quiso averiguar si la parada se producía en G2 o en M, de forma que, al analizar la fosforilación de la H3 en la Ser10, que es realizada por la Aurora quinasa B y es necesaria para entrar en anafase (Fase M tardía), no se vieron aumentos significativos en dicha fosforilación. Esto sugiere que la parada del ciclo producida por el aptámero apVRKF28 era en la fase G2. Estudiando otro marcador del ciclo (pCdk2) también se descartó la parada en G1/S, ya que no se vieron diferencias significativas en la fosforilación de Tyr15 con respecto al control. Para futuras aproximaciones, sabiendo que VRK1 es necesaria para la progresión del ciclo celular y puede desempeñar diferentes papeles en cada fase del ciclo celular, [18] sería necesario probar diferentes concentraciones de aptámero a diferentes tiempos para observar los efectos del aptámero apVRKF28 sobre el ciclo celular. Incluso, se podrían sincronizar las células previamente a los tratamientos para poder visualizar mejor estos efectos.

Aunque se esperaría un efecto similar con ambos aptámeros, el aptámero apVRKF8 no mostraba efecto significativo sobre el ciclo celular, pero sí genera apoptosis significativamente en ambas líneas celulares al aumentar la expresión de PARP procesada, relacionada con la apoptosis tardía. Además, correlacionaría con otros estudios en los que la inhibición de VRK1 genera apoptosis en cáncer de ovario [19]. Esto indicaría que cada uno de los aptámeros tiene un mecanismo de inhibición de VRK1 diferente, ya que apVRKF28 produce una parada del ciclo en G2 sin generar apoptosis, mientras que el apVRKF8 genera apoptosis sin afectar al ciclo (la cual también se pudo observar en la inmunocitoquímica, ya que con el aptámero apVRKF8 se pudieron ver células apoptóticas que no se observaron con el apVRKF28. Datos no mostrados)

En cuanto a la localización subcelular de VRK1 se puede ver un patrón de expresión de la proteína diferente. En ambas líneas se puede ver la localización tanto nuclear como citoplasmática de VRK1 como se ha indicado en estudios recientes [20]. Así, en las células 8505c (que mostraban mucha más expresión de la proteína) se puede apreciar la mayor parte de VRK1 es nuclear, y en las Cal62 se pueden apreciar acúmulos de VRK1 fuera del núcleo. En la ACQ se puede ver la fuerte colocalización que presentan ambos aptámeros con la proteína VRK, lo que indicaría que realmente el efecto producido de los aptámeros es debido a su

interacción con VRK1. Asimismo, la localización de los aptámeros es citoplasmática y nuclear y se encuentran formando acúmulos.

Tras analizar la expresión de VRK1 se puede observar una reducción de sus niveles en las Cal62, aunque no de forma significativa, pero no en las 8505c. Este hecho sugiere que, en las Cal62, como tienen

poca expresión de VRK1, presenten algún tipo de mecanismo de retroalimentación positiva, de forma que al inhibir VRK1, se esté bloqueando este bucle y, por ello, se produzca una bajada en la expresión de VRK1. Sin embargo, posiblemente en las 8505c no se produzca este mecanismo de forma tan evidente ya que al inhibir la expresión de VRK1 no se está afectando a sus niveles.

Para futuras aproximaciones se podría evaluar la expresión de proteínas reguladas por VRK1 como la ciclina D, H2AX o p53. Además de realizar otros ensayos de migración, invasión,... para poder evaluar en detalle el efecto de estos aptámeros sobre las líneas celulares de ATC.

Conclusiones

En el presente trabajo, se han obtenido datos que revelan un potencial terapéutico de dos aptámeros frente a VRK1 en líneas celulares de ATC, con concentraciones muy bajas de estos, siendo el aptámero apVRKF28 el que produce un mayor efecto antitumoral en ambas líneas celulares probadas. Así, se muestra el potencial de los aptámeros como herramientas biotecnológicas y biomédicas, siendo excelentes candidatos para participar en futuras terapias para combatir enfermedades como el cáncer. Además, se evalúa a VRK1 como una gran diana terapéutica para frenar la progresión tumoral en el ATC.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todo el equipo de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal, especialmente a los doctores Víctor M. González y M. Elena Martín por su gran esfuerzo, ayuda y dedicación durante estos meses. También a Ana y Celia por enseñarme y ayudarme en cada momento, y a todos mis compañeros de laboratorio. Gracias.

Bibliografía

1. Araque, K. A., S. Gubbi, and J. Klubo-Gwiedzinska, J. 2020. Updates on the Management of Thyroid Cancer. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 52(8), 562–577.
2. Prete, A., P. Borges de Souza, S. Censi, M. Muzza, N. Nucci, and M. Sponziello. 2020. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 11, 102.
3. Smallridge, R. C., K. B. Ain, S. L. Asa, K. C. Bible, J. D. Brierley, K.D. Burman, E. Kebebew, N. Y. Lee, Y. E. Nikiforov, M. S. Rosenthal, M. H. Shah, A. R. Shaha, R. M. Tuttle, and American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Taskforce. 2012. American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 22(11), 1104–1139.
4. Cabanillas, M. E., M. Zafereo, M. D. Williams, R. Ferrarotto, R. Dadu, N. Gross, G. B. Gunn, H. Skinner, G. Cote, H. B. Grosu, P. Iyer, and N. L. Busaidy. 2018. Recent advances and emerging therapies in anaplastic thyroid carcinoma. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-87.
5. Lopez-Sanchez, I., M. Sanz-Garcia and P. A. Lazo. 2008. Plk3 interacts and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation. *Molecular and cellular biology*, 29(5):1189-1201
6. Campillo-Marcos, I., R. García-González, E. Navarro-Carrasco, and P. A. Lazo. 2021. The human VRK1 chromatin kinase in cancer biology. *Cancer letters*, 503, 117–128.
7. Campillo-Marcos, I., and P. A. Lazo. 2018. Implication of the VRK1 chromatin kinase in the signaling responses to DNA damage: a therapeutic target?. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 75(13), 2375–2388.
8. Lazo P. A. 2024. Nuclear functions regulated by the VRK1 kinase. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 15(1), 2353249.
9. Zhuo, Z., Y. Yu, M. Wang, J. Li, Z. Zhang, J. Liu, X. Wu, A. Lu, G. Zhang, and B. Zhang. 2017. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), p. 2142.
10. Maier, K. E. and M. Levy. 2016. From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 5, 16014.

11. Carrión-Marchante, R., V. Frezza, A. Salgado-Figueroa, M. I. Pérez-Morgado, M. E. Martín and V. M. González. 2021. DNA Aptamers against Vaccinia-Related Kinase (VRK) 1 Block Proliferation in MCF7 Breast Cancer Cells. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(5), 473.
12. Puck, T. T. and P. I. Marcus. 1956. Action of x-rays on mammalian cells, *J. Exp. Med.*, 103:653-66
13. Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protocol*, 1: 2315-9
14. Gu, Y., J. Rosenblatt and D. O. Morgan. 1992. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *The EMBO journal*, 11(11), 3995–4005.
15. Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp. 646–674
16. Du, N., B. Zhang and Y. Zhang. 2023. Downregulation of VRK1 Inhibits Progression of Lung Squamous Cell Carcinoma through DNA Damage. *Canadian respiratory journal*, 2023, 4533504.
17. D'Agostino, M., P. Voce, M. Celano, M. Sponziello, S. Moretti, V. Maggisano, A. Verrienti, C. Durante, S. Filetti, E. Puxeddu, and D. Russo. 2012. Sunitinib exerts only limited effects on the proliferation and differentiation of anaplastic thyroid cancer cells. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 22(2), 138–144.
18. Valbuena, A., I. López-Sánchez, and P. A. Lazo. 2008. Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression. *PloS one*, 3(2), e1642.
19. Kim, D. Y., H. Yun, J. E. You, J. U. Lee, D. H. Kang, Y. S. Ryu, D. I. Koh, and D. H. Jin. 2024. Inactivation of VRK1 sensitizes ovarian cancer to PARP inhibition through regulating DNA-PK stability. *Experimental cell research*, 438(1), 114036.
20. Valbuena, A., I. Lopez-Sánchez, F. M. Vega, A. Sevilla, M. Sanz-García, S. Blanco, P. A. Lazo. 2007. Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 465 (1), pp. 219-226