

Universidad de Salamanca

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC)

Programa de doctorado:

Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional

Funciones de VRK1 en respuesta a daño génico y estrés oxidativo y sus implicaciones en nuevas terapias contra el cáncer

Traducción de la
memoria para optar al título de doctor presentada por:

Elena Navarro Carrasco

Director:

Dr. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena

Salamanca, 2022



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



GOBIERNO
DE ESPAÑA



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro



Instituto de Biología Molecular y Celular
del Cáncer (IBMCC)



Prof. Dr. Pedro A. Lazo
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
Universidad de Salamanca – CSIC
Campus Miguel de Unamuno
37007, Salamanca
España

Dr. Pedro Alfonso Lazo-Zbikowski Taracena, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que la **traducción** de la memoria de tesis doctoral titulada “Funciones de VRK1 en respuesta a daño génico y estrés oxidativo y sus implicaciones en nuevas terapias contra el cáncer”, presentada por la graduada en Biología **Elena Navarro Carrasco**, se corresponde con la tesis doctoral presentada realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC).

Y para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 29 de septiembre de 2022.

Pedro A. Lazo-Zbikowski

Traducción al castellano tesis doctoral Elena Navarro Carrasco

Título:

Funciones de VRK1 en respuesta a daño génico y estrés oxidativo y sus implicaciones en nuevas terapias contra el cáncer.

Resumen:

VRK1 es una serina treonina quinasa que fue caracterizada en 1997. VRK1, junto con VRK2 y VRK3, forma la familia de las caseín quinasas. VRK1 es principalmente nuclear y se expresa en todos los tejidos, especialmente en los más proliferativos. Esta quinasa está compuesta por 396 aminoácidos. Su estructura se compone principalmente de un dominio quinasa en su región N-terminal, en el que se encuentra el sitio catalítico y el sitio de unión al ATP y una región flexible en su región C-terminal, la cual es susceptible a sufrir modificaciones que regulan la actividad de la quinasa.

A lo largo de las últimas décadas, se ha asociado a VRK1 con múltiples procesos imprescindibles para el correcto funcionamiento celular, entre los cuales se incluyen la respuesta a daño génico, la remodelación de la cromatina y la regulación del ciclo celular. A su vez, se han descrito numerosas proteínas que son dianas directas de VRK1, entre las que se incluyen factores de transcripción como p53, c-Jun, CREB y Sox2; proteínas relacionadas con la respuesta a daño génico como 53BP1, H2AX, NBS1 y Tip60; proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina como las histonas H3 y H2A; y otras proteínas nucleares como BANF1 y coilina.

Asimismo, se ha relacionado la desregulación del funcionamiento de VRK1 con diferentes patologías humanas. Por una parte, la sobreexpresión de la quinasa está asociada al mal pronóstico de diferentes tipos de cáncer como el de mama, hígado, pulmón y diferentes gliomas. Además, en los últimos 5 años, se han descrito 25 variantes patogénicas de VRK1 cuyos pacientes que las sufren desarrollan enfermedades neurodegenerativas con diferentes cuadros clínicos

como atrofia espinal muscular, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatías motoras distales, microcefalia, hipoplasia ponto cerebelar y ataxia.

Por todo ello, es este trabajo nos hemos centrado en elucidar diferentes funciones de VRK1 y proponer aplicaciones de su inhibición en tratamientos contra el cáncer. Por una parte, nuestro primer objetivo ha sido estudiar el efecto de la delección de VRK1 en la respuesta a daño génico causada por temozolomida (TMZ) y olaparib en células de glioblastoma, así como su implicación en la muerte de células tumorales.

Glioblastoma multiforme (GBM) se considera el tumor cerebral maligno más común. La supervivencia media de los pacientes que presentan GBM es de 12.6 meses con un 90% de mortalidad en los primeros 5 años. Actualmente, el tratamiento del GBM comprende cirugía, quimioterapia con TMZ y radioterapia. Sin embargo, la proporción de pacientes que desarrollan resistencia al tratamiento debido a la rápida reparación del daño que se produce en las células tumorales hace que su pronóstico sea muy grave.

Por todo ello, en esta tesis doctoral hemos estudiado el efecto de la ausencia de la quinasa humana VRK1 en la acumulación del daño y en la respuesta de reparación tras el tratamiento con TMZ y olaparib (un inhibidor de PARP-1 usado con sensitizante) en células de GBM. Para nuestros estudios hemos utilizado técnicas de inmunofluorescencia, WB, estudios de fosfoproteómica y citometría de flujo. Hemos observado que, en ausencia de VRK1, se produce una acumulación del daño génico tras el tratamiento con TMZ y olaparib. Además, hemos observado que, en ausencia de la quinasa, hay una alteración en diferentes rutas de respuesta a daño génico tras dichos tratamientos. Para analizar las consecuencias que la acumulación del daño y la desregulación de la respuesta a daño génico podría tener, hemos estudiado el efecto de la depleción de VRK1 sobre la muerte celular en células de GBM. Hemos observado que, en ausencia de VRK1 y tras los tratamientos con TMZ y olaparib, hay un incremento en la muerte de las células tumorales.

Teniendo en cuenta estos resultados, proponemos la inhibición de VRK1 con fármacos específicos para la desregulación de la respuesta a daño génico como tratamiento de GBM en una estrategia de letalidad sintética.

Por otra parte, el segundo objetivo de este trabajo de tesis doctoral es el estudio de la función de VRK1 en la remodelación de la cromatina en respuesta a estrés oxidativo.

Las especies reactivas (principalmente especies reactivas de oxígeno o ROS) se producen en las células en circunstancias normales debido al metabolismo celular o por factores externos. La acumulación de ROS por un mal funcionamiento de los procesos encargados de su regulación da lugar a la producción de estrés oxidativo en las células. La acumulación de ROS produce la oxidación de componentes celulares como el DNA, proteínas y lípidos, alterando la homeostasis celular. Por todo ello, la exposición prolongada a estrés oxidativo está asociada con el desarrollo de enfermedades humanas como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas.

Las células tumorales presentan un estrés oxidativo crónico debido a su alto metabolismo. Este estado causa mutagénesis y inestabilidad genómica. Numerosos tratamientos de cáncer aprovechan para incrementar este estrés oxidativo y dar lugar a la muerte de las células tumorales.

En este trabajo estudiamos el papel de VRK1 en la respuesta temprana a estrés oxidativo mediante la regulación de la remodelación de la cromatina. Para nuestros estudios hemos utilizado técnicas de inmunofluorescencia, WB, estudios de fosfoproteómica y ensayos quinasa radiactivos. Primeramente, hemos observado una rápida y transitoria activación de VRK1 tras la exposición de células tumorales a peróxido de hidrógeno. Además, hemos observado que, el tratamiento con peróxido de hidrógeno en ausencia de la quinasa produce una acumulación de estrés oxidativo y, como consecuencia, una acumulación de daño génico en células tumorales. Asimismo, hemos detectado una desregulación en la fosforilación de numerosas proteínas implicadas en la remodelación de la

cromatina, así como en las modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a las mismas.

Por todo ello, nuestros resultados sugieren que VRK1 tiene un papel fundamental en la respuesta a estrés oxidativo mediante la remodelación de la cromatina. A su vez, su inhibición podría dar lugar a una acumulación de estrés oxidativo, lo que podría potenciar el efecto de fármacos que causan estrés oxidativo como estrategia de tratamiento en diversos tipos de cáncer.

Conclusiones:

1. La depleción de VRK1 altera la fosforilación diferencial de proteínas clave en la respuesta a daño génico y en la remodelación de la cromatina tras la inducción de daño génico en células tratadas con doxorubicina.
2. La inducción de daño en el DNA y de la respuesta a daño es independiente de los niveles de MGMT en células de glioblastoma.
3. El tratamiento con olaparib sensibiliza las células de GBM al daño génico producido por TMZ.
4. La ausencia de VRK1 altera la respuesta al daño génico inducida por el tratamiento con TMZ y olaparib, alterando la acetilación de la H4K16, la dimetilación de la H4K20 y la formación de focos de 53BP1 y γ HAX, lo que lleva a una acumulación de daño en el DNA.
5. La depleción de VRK1 potencia la muerte de células de GBM en respuesta a la exposición a TMZ y olaparib.
6. En respuesta a estrés oxidativo, VRK1 se fosforila y activa en la línea celular tumoral A549.
7. La depleción de VRK1 induce la acumulación de estrés oxidativo y daño en el DNA tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno en la línea celular A549.
8. La ausencia de VRK1 revierte el estado de fosforilación de proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina en células tratadas con peróxido de hidrógeno.
9. La depleción de VRK1 altera el patrón de PTMs de histonas en respuesta al tratamiento con peróxido de hidrógeno.