

**Líneas de Investigación CABIMER.
Curso 2023-2024**

Línea de investigación	Investigador*	e-mail
Caracterización genética y molecular de la reparación de horquillas de replicación	Félix Prado Velasco	felix.prado@cabimer.es
Señalización y tolerancia al daño en el ADN durante replicación en células humanas	Néstor García Rodríguez	nestor.garcia@cabimer.es
Estudio de estrategias neuroprotectoras frente a la radioterapia en el cáncer cerebral infantil.	Vivian Capilla González	vivian.capilla@cabimer.es
Crosstalk between metabolism and cell signaling to target glioblastoma resistance to current therapy	Mercedes Tomé	mercedes.tome@cabimer.es
Función del supresor de tumores ETV6 en el establecimiento de programas de diferenciación.	Mario García Domínguez	mario.garcia@cabimer.es
Ubiquitinación en estrés replicativo y cáncer	Román González Prieto	roman.gonzalez@cabimer.es
Determinación mecanística del efecto neuroprotector de la modulación del metabolismo del azufre en roedores	Alejandro Martín-Montalvo	alejandro.martinmontalvo@cabimer.es
Evaluación de las modificaciones post-transcripcionales alteradas en el cáncer y su modulación como una nueva aproximación terapéutica.	Alejandro Martín-Montalvo	alejandro.martinmontalvo@cabimer.es
Desvelando las funciones extracelulares de las catepsinas en la regulación del ciclo celular y la respuesta frente a daño en el ADN en células tumorales	Jonathan Martínez Fábregas	jmartinez9@us.es
Herencia asimétrica de centrosomas: relevancia en cáncer y envejecimiento	Fernando Monje Casas	fernando.monje@cabimer.es
Factors and mechanisms underlying manganese-induced cell damage	Hélène Gaillard	helene.gaillard@cabimer.es
Interacción entre colesterol y hormonas sexuales en mujeres: con alto riesgo cardiovascular	Inés Pineda Torra	ines.pineda@cabimer.es
Estudios de los mecanismos de estabilidad de la integridad genética asociados a la replicación del DNA	Iván Valle Rosado	ivrosado@us.es

***Investigadores con líneas de investigación activas que no sean profesores de la Universidad podrán actuar de directores de Trabajos Fin de Máster, siempre y cuando el trabajo sea co-dirigido por un profesor de la titulación.**

Resumen

Caracterización genética y molecular de la reparación de horquillas de replicación

El material genético está sometido a numerosos daños que comprometen su integridad. La reparación de estos daños es esencial para el correcto funcionamiento celular, y en consecuencia defectos en los mecanismos que los detectan y reparan están asociados a cáncer y numerosas enfermedades genéticas. Entre estos daños destacan los cortes de doble cadena (DSBs, del inglés double-strand break), ya que un solo DSB sin reparar es letal. La respuesta celular a DSBs ha sido ampliamente estudiada, gracias fundamentalmente al uso de nucleasas específicas de sitio que permiten analizar la reparación del corte mediante técnicas moleculares específicas de secuencia de ADN (e.g., PCR y southern blot). Una de las principales fuentes de inestabilidad genética está asociada a la integridad de las horquillas de replicación, por lo que las células disponen de mecanismos específicos de control de ciclo “checkpoints” que responden a daños en estas estructuras. A pesar de su importancia para la integridad genómica y la duplicación del genoma, poco se sabe acerca de los mecanismos implicados en la reparación de roturas en las horquillas de replicación, ya que no pueden ser abordados mediante el uso de nucleasas específicas de sitio. A diferencia de los DSBs inducidos por estas nucleasas, donde el DSB genera dos extremos, la rotura de las horquillas de replicación genera un único extremo (en la cadena naciente que se rompe), por lo que cabe esperar una respuesta de reparación diferencial. En nuestro grupo hemos generado en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* una estirpe que expresa una quimera de la subunidad mayor del complejo RPA con la nucleasa micrococcal (Rfa1-MN). RPA se une al DNA de cadena sencilla (ssDNA) que se acumula de manera dinámica y transitoria en la horquilla de replicación. Hemos demostrado que la quimera Rfa1-MN introduce DSBs en las horquillas de replicación, y usado esta construcción para buscar genes necesarios para la reparación de horquillas rotas. Este escrutinio genético ha revelado 52 genes implicados. El objetivo de este trabajo es caracterizar algunos de estos genes a nivel genético y molecular. Este estudio permitirá al estudiante familiarizarse con la genética de levaduras, con ensayos de inestabilidad genética y con el análisis de intermediarios replicativos y recombinogénicos. Además, este estudio le permitirá profundizar en los mecanismos de reparación de DNA que protegen al genoma de reordenamientos deletéreos.

Señalización y tolerancia al daño en el ADN durante replicación en células humanas

Durante la duplicación de la información genética codificada en el ADN, pueden existir perturbaciones o daños que impidan la correcta finalización de dicho proceso, generándose lo que se denomina estrés replicativo. Aunque las células presentan mecanismos de protección ante tal estrés, existen situaciones que pueden ocasionar su acumulación y promover en último término la formación de tumores. De hecho, múltiples oncogenes deben su fenotipo pro-tumoral en causar un aumento de este tipo de

estrés. Nuestro laboratorio utiliza diferentes aproximaciones para tratar de entender en detalle los mecanismos moleculares que señalizan y resuelven las situaciones de estrés replicativo. Entendiendo este proceso se podrán diseñar nuevas estrategias terapéuticas para matar selectivamente a las células tumorales, que presentan como característica altos niveles de estrés replicativo.

Estudio de estrategias neuroprotectoras frente a la radioterapia en el cáncer cerebral infantil.

Los tumores cerebrales son los tumores sólidos más comunes en los niños y representan la segunda causa de mortalidad por cáncer. Los últimos avances en diagnóstico y tratamientos han mejorado las tasas de supervivencia en estos pacientes. Sin embargo, los efectos secundarios de los tratamientos oncológicos siguen afectando la salud y calidad de vida de muchos niños que sobreviven a la enfermedad. En concreto, la radioterapia craneal puede inducir disfunción cognitiva, siendo estas secuelas más severas en los pacientes pediátricos ya que el cerebro en desarrollo es más sensible a la radiación. En este proyecto, el candidato investigará nuevas estrategias (terapia con células madre) que ayuden a minimizar los efectos secundarios de la radiación. Para ello, el estudiante se formará en el cultivo de distintos tipos celulares (iPSC, células madre mesenquimales, microglia, etc), así como en el uso de técnicas de biología molecular y celular (inmunofluorescencia, citometría de flujo, transwell assay, RT-PCR, western blot, etc). Este plan formativo permitirá avanzar en el conocimiento de la biología de las células madre y evaluar su potencial terapéutico. El candidato se formará en un entorno dinámico y participará en las reuniones semanales del grupo de investigación para discutir los resultados obtenidos. Para más información del proyecto, no dude en ponerse en contacto con el director o visitar la web del grupo.

Crosstalk between metabolism and cell signaling to target glioblastoma resistance to current therapy

Signaling and metabolic reprogramming is a hallmark of cancer and particularly of aggressive tumors, which possess a robust ability to adapt to changes and to insults to survive. The group Metabolism and Cell Signaling is interested in understanding the mechanisms of interaction between cell metabolism and cellular processes to identify key elements involved in the adaptation of cancer cells to their microenvironment and particularly to therapeutic treatments. Our group investigates the implication of key metabolic pathways such as glutamine metabolism in controlling cancer cell growth, cell death and proliferation through its crosstalk with core signaling pathways such as mTOR and Notch, to regulate cellular processes including autophagy and cell cycle. We have already shown that a glutamine-mediated activation of mTORC1 signaling and autophagy inhibition can lead to cancer cell death and tumor regression during nutritional imbalance both in vitro and in mouse model. (Villar et al. Nat Commun. 2017, doi:10.1038/ncomms14124; Bodineau et al. Nat Commun. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25079-4). We have also described a crosstalk between Notch signaling, glutamine metabolism and mTORC1 with potential therapeutic opportunities against some types of leukemia (Nguyen et al. Mol Oncol. 2021, doi: 10.1002/1878-0261.12877). We are particularly interested in glioblastoma since is the most aggressive brain tumor and one of the deadliest cancers worldwide, with an imperative need for finding more efficient

treatments. The standard of care of glioblastoma patients has not been modified since its last update in the 90s to include temozolomide as the standard chemotherapeutic agent. Still this therapeutic approach is still palliative rather than curative since tumor recurrence occurs within months after surgical resection and radio/chemotherapy period. The median survival of glioblastoma patients is less than 15 months with a 5-year survival rate of 5%. Glioblastoma encompasses a heterogeneous family of tumors at histological, cellular, genetic and metabolic levels but all of them sharing a high resistance to chemotherapy supporting a wide adaptability. Our studies are therefore orientated to determine the signaling and metabolic modifications adopted by glioblastoma cells to evade chemotherapy. In this sense, in this JAE-Intro proposal we will study: 1. Metabolic and signaling modifications in temozolomide resistance. 2. Nutritional imbalance in sensitization of glioblastoma cell to temozolomide and the molecular mechanisms involved. To this end, we will make use of cell culture techniques with several glioblastoma cellular models with different genetic, metabolic and signaling backgrounds. The experimental approaches will get advantage of both standard and cutting-edge techniques routinely used in the group, including gain- and loss-of function approaches, cell viability and cell death assays, protein and gene expression analyses as well as metabolic assays (flow cytometry, confocal microscopy, western blot, qPCR, Seahorse, among others).

Función del supresor de tumores ETV6 en el establecimiento de programas de diferenciación.

ETV6 es un supresor de tumores asociado a leucemia. En nuestro grupo hemos identificado que en condiciones de diferenciación se modifica por unión del polipéptido SUMO, un proceso conocido como sumoilación. SUMO es un pequeño polipéptido similar a la ubiquitina capaz de unirse covalentemente a otras proteínas como modificador post-traducciona. La sumoilación modula la función o propiedades de las proteínas diana. Actualmente se conocen más de mil proteínas diana de SUMO. Esta modificación participa en la mayoría de procesos celulares relevantes y es esencial, ya que su bloqueo conduce a letalidad en estado embrionario. En nuestro grupo pretendemos estudiar la función de esta modificación sobre el factor de transcripción ETV6 en el establecimiento de distintos programas de diferenciación durante el desarrollo, incluyendo la diferenciación neuronal, a músculo cardíaco/esquelético o la diferenciación de tipo endodérmico. Para ello contamos con modelos celulares de diferenciación, así como con modelos embrionarios.

Ubiquitinación en estrés replicativo y cáncer

Las células necesitan replicar sus genomas en el preciso momento y de manera fidedigna. Sin embargo, son múltiples los agentes dañinos para el DNA que pueden afectar a la integridad del genoma. Nuestras células están equipadas con una gran variedad de rutas de señalización y mecanismos de reparación del DNA que, en su conjunto, se conocen como Respuesta al Daño en el DNA (DDR). La DDR tiene como finalidad preservar la integridad del genoma o, en el caso de que los daños en el genoma sean tan

extensos que no sean reparables, inducir la muerte celular por apoptosis. Defectos en la DDR pueden derivar en inestabilidad genómica y favorecer el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer. Esta DDR se haya regulada entre otras enzimas por las ubiquitinas (o similares) ligasas o enzimas E3. Mediante una técnica desarrollada en el laboratorio conocida como TULIP2, el/la estudiante identificará los sustratos de ubiquitinación de una de estas enzimas en el contexto de la DDR en respuesta a estrés replicativo, formándose en menor o mayor medida en técnicas de cultivos celulares, ingeniería genética, microscopía de fluorescencia y purificación, análisis e inmunoprecipitación de proteínas, así como análisis de proteómica por espectrometría de masas.

Determinación mecanística del efecto neuroprotector de la modulación del metabolismo del azufre en roedores

En los últimos años ha aumentado la esperanza de vida hasta los 83 años. Sin embargo, durante el envejecimiento aparecen enfermedades numerosas enfermedades neurodegenerativas, lo que hace que las personas mayores sufran una mala calidad de vida. Por tanto, es necesario desarrollar intervenciones que prevengan las enfermedades neurocognitivas que se desarrollan en el envejecimiento. El objetivo de este proyecto es determinar las consecuencias fisiológicas de la modulación del metabolismo del azufre en la neurocognición durante la etapa adulta y la vejez de roedores. Realizaremos experimentación in vivo con roedores y experimentación mecanística usando tejidos de animales. Para ello, realizaremos experimentos de genómica (RNA-seq), proteómica (iTRAQ) y lipidómica. Entre otras técnicas de biología molecular, realizaremos inmunohistoquímica, western blot, real time PCR y determinaciones por ELISA. Mediante estos estudios podremos determinar el potencial de la modulación del metabolismo del azufre en la prevención de la aparición de marcadores neurocognitivos asociados con el envejecimiento.

Alejandro Martín-Montalvo alejandro.martinmontalvo@cabimer.es Evaluación de las modificaciones post-transcripcionales alteradas en el cáncer y su modulación como una nueva aproximación terapéutica. Envejecer con buena salud es uno de los principales retos que tenemos en la actualidad. La identificación de marcadores asociados con un envejecimiento saludable puede proporcionar nuevas dianas terapéuticas para prevenir las enfermedades asociadas con la vejez. Nuestro grupo está definiendo ciertos tipos de modificaciones post-transcripcionales que ocurren en los individuos que mantienen una óptima salud durante el envejecimiento. El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto que tiene la modulación de modificaciones posttranscripcionales que han sido descubiertas recientemente (por ejemplo, la lactilación) en el cáncer. La experimentación se realizará estudiando tejidos de ratones en un modelo experimental de cáncer. Entre otras técnicas de biología molecular realizaremos RNAseq, ChIP-seq, inmunohistoquímica, western blot, real time PCR y determinaciones por ELISA.

Desvelando las funciones extracelulares de las catepsinas en la regulación del ciclo celular y la respuesta frente a daño en el ADN en células tumorales

Los lisosomas, inicialmente descritos como la planta de reciclaje celular, están implicados en la regulación de múltiples aspectos de la fisiología celular. Esto nos ha permitido racionalizar el por qué su malfuncionamiento se encuentra en la base del desarrollo de múltiples patologías humanas, entre ellas enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. De hecho, la sobreexpresión de estas proteasas ha sido demostrada en una amplia variedad de tumores. Recientemente, el descubrimiento de que las proteasas lisosomales desempeñan funciones fuera del lisosoma, abre nuevas posibilidades para comprender a nivel molecular el papel real de estos compartimentos en la regulación de múltiples procesos biológicos, y por lo tanto su papel real en la aparición y desarrollo del cáncer. Datos preliminares generados en el laboratorio indican que estas proteasas se localizan en el núcleo celular y regulan múltiples procesos fisiológicos, desde expresión de genes hasta el control del ciclo celular y la reparación de daño en el ADN. Este proyecto pretende revelar el papel de distintas proteasas lisosomales (Cathepsina B, Cathepsina D y Cathepsina V) en la regulación del ciclo celular y la reparación de daño en el ADN en distintos modelos tumorales, como cáncer de colon, cáncer de mama, glioblastoma, etc. Para ello se pretende caracterizar: 1. Localización subcelular de las distintas proteasas lisosomales mediante microscopía de fluorescencia y western blot. 2. Silenciamiento mediante shRNA de la expresión de estas proteasas. 3. Caracterización del papel de estas proteasas en la regulación del ciclo celular. 4. Determinar el posible papel de estas proteasas en la reparación y señalización frente a daño en el ADN. 5. Caracterización proteómica de los cambios inducidos por el silenciamiento de estas proteasas e identificación de sus posibles dianas moleculares.

Herencia asimétrica de centrosomas: relevancia en cáncer y envejecimiento

Un modelo clásico de células con una división asimétrica es el de las células madre de animales, que son esenciales durante el desarrollo del organismo y para el mantenimiento de la homeostasis tisular. Para coordinar la correcta distribución del material genético con el reparto diferencial de ciertos componentes celulares durante una división asimétrica, el huso mitótico debe alinearse a lo largo de un eje de polaridad pre-establecido. El huso es un haz bipolar de microtúbulos que emanan desde centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) y que permiten la segregación de los cromosomas. No obstante, esta maquinaria también es empleada por las células para establecer asimetría durante su división. Entre los procesos de asimetría asociados al huso, un fenómeno fascinante es la distribución no aleatoria durante mitosis de los propios MTOCs que orquestan la formación del huso. La herencia asimétrica de los MTOCs es un proceso conservado evolutivamente, que puede observarse tanto durante la duplicación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como durante la división de distintas células madre de animales, en las que los MTOCs del huso se denominan centrosomas. Nuestro grupo ha contribuido al descubrimiento de nuevos reguladores clave para la distribución no aleatoria de estos MTOCs (*eLife* (2020). 2(9):e61488) y, lo que es más importante, también a desvelar la relevancia biológica de este proceso. Nuestros resultados previos demuestran que la herencia asimétrica de los MTOCs del huso es esencial para mantener el potencial replicativo de *S. cerevisiae* (*Nat Cell Biol* (2019). 21(8):952-965), al permitir la distribución diferencial de moléculas y orgánulos celulares dañados entre la célula madre y la célula hija durante mitosis. Ahora, usando líneas celulares de neuroblastoma, queremos estudiar el fenómeno de asimetría en la distribución de los centrosomas en células humanas. El trabajo a desarrollar por el estudiante se enmarcará dentro de esta nueva línea de investigación, que abre la puerta al conocimiento de

procesos que podrían reducir el potencial replicativo de las células madre y, de este modo, estar asociados con el origen de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el cáncer o ciertos síndromes neurodegenerativos.

Factors and mechanisms underlying manganese-induced cell damage

Manganese (Mn) is a trace element that is essential for life by acting, among other mechanisms, as a divalent metal cofactor for enzymes such as the mitochondrial enzyme superoxide dismutase 2, the apical activator of the DNA damage response serine/threonine kinase ATM or the Mn-activated glutamine synthetase. However, Mn becomes toxic when enriched in the human body. Overexposure to Mn leads to oxidative stress and alteration of enzymatic activities including DNA polymerases, telomerase and TORC1 signalling, among others. Despite the relevance of these functions in disease state such as cancer and neurodegenerative disorders, the molecular mechanisms underlying Mn-induced cell death or 'manganatosis' (from manganese and thanatos) are yet poorly studied. In this project, budding yeast will be used as eukaryotic model organism to explore manganatosis pathways and improve our knowledge on the factors and mechanistic causes underlying Mn-induced cell damage.

Interacción entre colesterol y hormonas sexuales en mujeres: con alto riesgo cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la principal causa de mortalidad en todo el mundo. La principal patología subyacente a las ECV isquémicas es la aterosclerosis, resultado entre otras cosas, de una mala regulación y acumulación de derivados del colesterol en la pared vascular. Las ECV, tradicionalmente consideradas enfermedades de hombres son también la primera causa de muerte entre las mujeres de todo el mundo. Esta prevalencia incluye a España, donde mueren un 6% más de mujeres por esta enfermedad. A pesar de ello, las mujeres siguen estando poco estudiadas en proyectos de investigación. Nuestro grupo colabora con expertos clínicos y académicos y con el Biobanco de Andalucía, para investigar el impacto de las hormonas sexuales como los estrógenos y lípidos derivados del colesterol en células del sistema inmune que proceden de mujeres donantes con un alto riesgo cardiovascular. En este proyecto se evaluarán las variaciones en los niveles de grasas circulantes, así como perfiles de expresión de genes regulados por los receptores activados por estrógenos o por los derivados del colesterol y se establecerán si tienen un impacto en los niveles lipídicos de la membrana celular. Este proyecto utilizará técnicas de biología molecular (extracción de RNA, retrotranscripción, PCR cuantitativa) y celular (cultivos celulares, cuantificación de los niveles de colesterol y lípidos presentes en la membrana plasmática.)

Estudios de los mecanismos de estabilidad de la integridad genética asociados a la replicación del DNA

La reparación del ADN dañado es un proceso de vital importancia para garantizar la transmisión fiel de la información genética de una célula madre a su hija. Para tal fin, las células han desarrollado vías de reparación del ADN las cuales evitan consecuencias devastadoras, como el síndrome de inestabilidad genética Anemia de Fanconi (AF). La ruta de reparación AF comprende 22 genes (FANCA a FANCW) y es esencial para la reparación de daños en el DNA asociados a la horquilla de replicación. Nuestro grupo estudia los agentes endógenos que producen estrés replicacional y su eliminación mediante la ruta AF.