

Tesis Doctoral

# La degradación de p21 inducida por luz UV facilita la replicación de ADN lesionado y preserva la estabilidad genómica

Mansilla, Sabrina Florencia

2014-03-07

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mansilla, Sabrina Florencia. (2014-03-07). La degradación de p21 inducida por luz UV facilita la replicación de ADN lesionado y preserva la estabilidad genómica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mansilla, Sabrina Florencia. "La degradación de p21 inducida por luz UV facilita la replicación de ADN lesionado y preserva la estabilidad genómica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-07.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***La degradación de p21 inducida por luz UV  
facilita la replicación de ADN lesionado y  
preserva la estabilidad genómica***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

**Sabrina Florencia Mansilla**

**Director de tesis: Dra. Vanesa Gottifredi**

Consejero de estudios: Dr. Julio Caramelo

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir- IIBBA-Conicet

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Noviembre 2013

# Índice

<b>1 Resumen</b> .....	5
<b>2 Abstract</b> .....	6
<i>Abreviaturas</i> .....	7
<i>Agradecimientos</i> .....	8
<i>Dedicatoria</i> .....	10
<b>3 Introducción</b> .....	11
<b>3.1 La inestabilidad de la molécula de ADN desafía la probabilidad de lograr un copiado fiel</b> .....	11
3.1.1 El ADN: un molde imperfecto.....	11
3.1.2 Los mecanismos auxiliares de la replicación de ADN.....	12
3.1.3 Mi aporte al entendimiento de la replicación de ADN lesionado.....	13
<b>3.2 Replicación del ADN en organismos superiores</b> .....	13
3.2.1 Barreras replicativas.....	15
3.2.3 Las lesiones causadas por luz UVC.....	18
<b>3.3 Síntesis de ADN por Translesión (TLS): replicar ahora reparar después</b> .....	19
3.3.1 Polimerasas especializadas o de translesión (TLS).....	20
3.3.2 Ubiquitinación de PCNA: Modelo de TLS acoplado a la horquilla.....	24
3.3.3 Modelo de TLS por llenado de brechas (GAP filling).....	25
3.4.1 Atascamiento irreversible de horquillas: colapso de horquillas.....	27
3.2.3 Estrés replicativo.....	28
3.2.4 Marcadores de estrés replicativo.....	29
<b>3.4 p21 Cip1/Waf1</b> .....	31
3.4.1 p21, PCNA y proteínas de unión a PCNA.....	32

3.4.2 Degradación de p21 en respuesta a ADN dañado: la excepción a la regla .....	34
<b>4 Materiales y Métodos</b> .....	37
<b>4.1 Cultivo celular</b> .....	37
<b>4.2 Agentes genotóxicos</b> .....	38
<b>4.3 Transfección</b> .....	40
<b>4.4 Plásmidos utilizados</b> .....	40
<b>4.5 Mutagénesis dirigida</b> .....	41
<b>4.6 Análisis de proteínas</b> .....	41
4.6.1 Preparación de extractos totales e inmunoprecipitación en fracción soluble .....	41
4.6.2 Inmunoprecipitación cromatinica .....	43
<b>4.7 Análisis del ciclo celular</b> .....	44
4.7.1 Citometría de flujo .....	44
4.7.2 Incorporación de análogos de bases.....	45
4.7.3 Índice de proliferación por bloqueo de citocinesis .....	46
<b>4.8 Inmunomarcación y análisis de proteínas por microscopia</b> .....	46
4.8.1 Reclutamiento de polimerasas de TLS a zonas de ADN dañado.....	47
4.8.2 Inmunohistoquímica.....	47
4.8.3 Cuantificación de $\gamma$ H2AX.....	48
4.8.4 Estirado e inmunotinción de fibras de ADN .....	49
4.8.5 Microscopia de fluorescencia y confocal.....	50
<b>4.9 Determinación de viabilidad e inestabilidad genómica</b> .....	51
4.9.1 Viabilidad celular y ensayo de formación de colonias .....	51
4.9.2 Análisis de formación de micronúcleos (MN).....	52
<b>5 Resultados</b> .....	53
<b>5.1 Estabilización de p21 como herramienta de trabajo</b> .....	53
5.1.1 Caracterización de las construcciones estables de p21.....	54

<b>5.2 La estabilización de p21 luego de irradiación UV induce un aumento en marcadores de estrés replicativos</b> .....	56
5.2.1 La estabilización de p21 incrementa la fosforilación de H2AX.....	57
5.2.2 La estabilización de p21 induce la formación de focos de 53BP1 .....	58
<b>5.3 La pérdida de interacción entre p21 y PCNA luego de irradiación UV previene la acumulación de marcadores de estrés replicativos</b> .....	60
<b>5.4 La estabilización de p21 luego de irradiación UV induce muerte celular.</b> .....	61
5.4.1 La interacción persistente de p21 y PCNA después de irradiación UV causa un aumento de la fracción SubG1 en un perfil de ciclo celular.....	61
5.4.2 La interacción persistente entre p21 y PCNA desencadena un aumento en la muerte celular luego de irradiación UV.....	62
<b>5.5 La falta de degradación de p21 luego de irradiación UV induce aumento en la inestabilidad genómica asociada a fase S</b> .....	65
5.5.1 La interacción persistente entre PCNA y p21 induce inestabilidad genómica luego de irradiación UV .....	65
5.5.2 La estabilización de p21 induce inestabilidad genómica asociada a fase S luego de irradiación UV .....	67
<b>5.6 La estabilización de p21 afecta negativamente el proceso de TLS</b> .....	68
5.6.1 La estabilización de p21 impide el reclutamiento focal de todas las polimerasas de TLS luego de irradiación UV .....	69
5.6.2 p21 a través de su dominio de unión a PCNA inhibe el reclutamiento focal de todas las polimerasas de TLS luego de irradiación UV .....	71
5.6.3 La estabilización de p21 impide la formación de complejos de PCNA con las polimerasa de TLS.....	75
<b>5.7 Ensayo de fibras de ADN: una herramienta para medir la progresión de horquillas en replicación activa</b> .....	76
<b>5.8 La interacción sostenida entre p21 y PCNA retrasa la velocidad de replicación sobre ADN lesionado</b> .....	79
5.8.1 La estabilización de p21 después de irradiación UV retrasa la progresión de la fase S y la tasa de división celular .....	81
<b>5.9 p21 endógeno modula la velocidad d replicación sobre ADN lesionado</b> .....	84

5.9.1 p21 endógeno afecta la cinética de reclutamiento de las polimerasas de TLS .....	87
<b>6 Discusión</b> .....	<b>90</b>
<b>6.1 p21 debe ser removido de PCNA en horquillas en replicación activas que encuentra ADN molde dañado por irradiación UV</b> .....	<b>90</b>
6.1.1 Precisión de la TLS: balance entre degradación de p21 y acceso de las polimerasas especializadas a PCNA. ....	93
<b>6.2 Competición y cooperación: un balance clave en horquillas detenidas frente a una lesión</b> .....	<b>95</b>
6.2.1. PCNA y REV1: su contribución e importancia a la función de la TLS. ....	97
<b>6.3 Regulación de TLS: p21 cumple con los requisitos para ser considerado un regulador negativo de TLS</b> .....	<b>99</b>
<b>6.4 La síntesis de ADN por Translesión como posible blanco terapéutico</b>	<b>101</b>
<b>7 Conclusiones generales</b> .....	<b>104</b>
<b>8 Referencias bibliográficas</b> .....	<b>105</b>

# 1 Resumen

Mientras que el incremento en los niveles del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas p21 ha sido reportado extensamente en respuesta a variados tratamientos genotóxicos, lo opuesto ocurre en respuesta a la irradiación UVC en donde p21 disminuye sus niveles de expresión como consecuencia de una proteólisis. Esta degradación sugiere que p21 podría estar reprimiendo algún proceso relevante para la respuesta celular a la irradiación UVC. En este trabajo demostramos que la estabilización forzada de p21 luego de luz UV bloquea la replicación sobre ADN lesionado. Este impedimento está relacionado con un defecto en el reclutamiento de polimerasas especializadas necesarias para replicar sobre ADN dañado, que forman parte de un proceso conocido como Síntesis de ADN por Translesión, TLS, (del inglés Translesion DNA Synthesis). Los defectos observados en la replicación de ADN lesionado correlacionan con un aumento en los marcadores de estrés replicativo, inestabilidad genómica y aumento de la muerte celular. Interesantemente estos efectos deletéreos desaparecen si se remueve el sitio de unión a PCNA, (PIP box) de p21, sugiriendo que la pérdida de interacción entre p21 y PCNA es suficiente como para permitir el reclutamiento de proteínas de unión a PCNA (como las polimerasas especializadas) relevantes para la respuesta a irradiación UV. Por otro lado la expresión de una construcción degradable de p21 tuvo un efecto transiente sobre los eventos de replicación temprana y sobre el reclutamiento de las polimerasa de TLS en respuesta a irradiación UV. Estos defectos temporarios desaparecen en correlación con la degradación de p21, sin observarse consecuencias sobre eventos de replicación tardía o sobre la estabilidad genómica. En conjunto, nuestros datos sugieren que la función biológica asociada a la degradación de p21 en respuesta a irradiación UV es la de promover la replicación sobre ADN lesionado a través de una correcta y efectiva activación de los eventos de TLS.

## **Palabras claves**

*p21,  $\gamma$ H2AX, 53BP1, TLS, polimerasas especializadas, ADN lesionado, PCNA, inestabilidad genómica.*

## 2 Abstract

### ***UV-triggered p21 degradation facilitates damaged-DNA replication and preserves genomic stability***

While many genotoxic treatments upregulate the cyclin kinase inhibitor p21, agents such as UV irradiation trigger p21 degradation. This suggests that p21 blocks a process relevant for the cellular response to UV. Here we show that forced p21 stabilization after UV strongly impairs damaged-DNA replication, which is associated with permanent deficiencies in the recruitment of DNA polymerases from the Y family (involved in translesion DNA synthesis -TLS), with the accumulation of DNA damage markers and increased genomic instability. Remarkably, such noxious effects disappear when disrupting the PCNA interacting motif (PIP) of stable p21, thus suggesting that the release of PCNA from p21 interaction is sufficient to allow the recruitment to PCNA of partners (such as Y polymerases) relevant for the UV response. Expression of degradable p21 only transiently delays early replication events and Y polymerase recruitment after UV irradiation. These temporary defects disappear in a manner that correlates with p21 degradation with no detectable consequences on later replication events or genomic stability. Together, our findings suggest that the biological role of UV-triggered p21 degradation is to prevent replication defects by facilitating the tolerance of UV-induced DNA lesions.

**Key words:**

*p21,  $\gamma$ H2AX, 53BP1, TLS, Y family polymerases, damaged DNA, PCNA, genomic instability.*



# ***Abreviaturas***

**TLS:** *Síntesis de ADN por Translesión*

**PCNA:** *antígeno nuclear de células proliferantes*

**Pol:** *polimerasa*

**CPD:** *dímeros de pirimidinas en anillo de ciclobutano*

**CDK:** *quinasas dependiente de ciclinas*

**CKI:** *inhibidores de quinasas dependiente de ciclinas*

**Dominio PIP:** *sitio de interacción con PCNA*

**EV:** *vector vacío*

**NER:** *reparación por escisión de nucleótidos*

**PFA:** *paraformaldehído*

**UBM y UBZ:** *dominios de unión a ubiquitina*

**CDC:** *corte a doble cadena*

**CldU:** *Clorodeoxiuridina*

**IdU:** *Iododeoxiuridina*

**BrdU:** *Bromodeoxiuridina*

**EdU:** *Etinildeoxiuridina*

**GFP:** *proteína verde fluorescente*

**UV:** *ultravioleta*

**IP:** *inmunoprecipitación*

# *Agradecimientos*

Este trabajo tuvo la participación directa e indirecta de muchísima gente que por ahí no sabe lo mucho que me ayudo, por eso quiero dedicarle las siguientes palabras a la gente que hizo posible transitar de la mejor manera esta etapa de mi vida.

Quiero empezar agradeciendo a Vanesa, mi directora de tesis, que confió y creyó en mi cuando me eligió para ser parte de su laboratorio. Por enseñarme lo que es hacer buena ciencia, con momentos de frustración pero con muchos más de satisfacción. Gracias por seguir creyendo en mí y por darme el espacio para equivocarme, discutir y sobre todo para crecer como profesional y como persona.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, tengo la suerte de formar parte de un grupo de trabajo increíble, de una calidad humana y compañerismo pocas veces visto, por eso gracias a cada uno de ustedes por todo!. Macro y micro (belenes) más que decirles gracias por absolutamente todo, me quedo corta, las dos con sus experiencias de vida y con la calidad humana que tienen me dieron muchísima fuerza y energía para seguir en momentos de mucho dolor, y me hicieron reír muchísimo cuando más lo necesitaba. Martin aprendí a conocerte y sos un tipazo, siempre que necesite una mano con algo aparecías con alguna solución sin que yo te vaya a pedir ayuda. A Gaston, gracias por enseñarme a trabajar en el labo y por compartir conmigo tus experiencias de trabajo, el proyecto me lo heredaste y gracias a tus colaboraciones también salió adelante. Juli gracias por compartir casi 5 años de trabajo conmigo y por haberme recibido tan bien cuando apenas llegue al lab. Marina, sos nueva pero ya sos una más del grupo, también gracias! A la FIL por abrimme las puertas de sus instalaciones, es un instituto que por suerte tiene todo lo que se puede pedir para poder trabajar en ciencia. A Agencia y Conicet por haber financiado las becas correspondientes para poder realizar este trabajo. A mis vecinos de lab, los chicos del 202, a Laurita que es una genia, gracias por pasar y charlar para distraernos un rato, a todos los chicos del 202 por los almuerzos y mates compartidos. Al 213 y sus integrantes y a toda la gente que forma parte de la FIL, la verdad que da mucho placer trabajar con gente tan cálida y buena onda.

A mis amigas de la vida, Ceci, Candi, Marian, Lenki, Naty, Sole, Adri, Vani, Tucu, Flori, Fabi.... Gracias por seguir bancándome, y por ser parte de mi familia del alma que fui formando cuando me vine de Bariloche, las quiero muchísimo!

Por ultimo dejo a las personas que están muy cerca mío y que forman parte de mi historia. A mi familia, a mi papa Adrian y mi hermana Catita, hemos pasado mucho en estos años, cosas muy dolorosas y cosas muy lindas, pero a pesar de todo seguimos juntos, por eso doy gracias a la vida por tenerlos conmigo y porque todo lo que pasó hizo que nos uniéramos más. Los quiero muchísimo y espero ser un buen ejemplo a seguir para Cata, como siempre te dije gordita todo pasa por algo y todo se acomoda para bien, lo que te propongas lo vas a conseguir.

Al amor de mi vida, que se hizo presente cuando más lo necesitaba y de la manera más inadvertida. A Lucas gracias por elegirme, por bancarme, por acompañarme, por apoyarme y por darme fuerzas y contención en todo momento, poniéndome a mí como prioridad frente a todas tus obligaciones. Espero que estas pocas palabras puedan reflejar lo mucho que te amo y anhelo profundamente que la vida nos siga manteniendo juntos para hacerme viejita con vos y formar una hermosa familia. Te amo muchísimo, gracias por todo!

Dejo para el final el agradecimiento eterno que tengo para la persona que me dio la vida, que me enseñó a pelear por lo que uno quiere y que con perseverancia y paciencia todo llega. A mi mama, Anahi, que siempre me escucho y me banco al 100% cuando me fui de mi casa a estudiar, a pesar de que el dinero no sobraba y sabiendo que íbamos a estar lejos. A ella porque fue todo y más de lo que yo hubiera podido tener como madre, por su amor incondicional y por su entereza como mujer. El ejemplo que ella me dio es la mejor escuela que yo podría haber tenido. Simplemente gracias viejita, sé que estarías llena de orgullo porque logre mi objetivo, y porque todo el esfuerzo finalmente valió la pena. No te tengo físicamente pero te llevo conmigo siempre.

# ***Dedicatoria***

*“Solo existen dos días en el año en que no se puede hacer nada. Uno se llama ayer y otro mañana. Por lo tanto hoy es el día ideal para amar, crecer, hacer y principalmente vivir “*

*Dalai Lama*

*Para vos Mamá,*

## 3 Introducción

### *3.1 La inestabilidad de la molécula de ADN desafía la probabilidad de lograr un copiado fiel*

---

Los libros de texto indican que la replicación de ADN es un proceso que permite la duplicación exacta del material genético. Sin embargo, la naturaleza inestable del ADN (la cuál es de mucha utilidad desde el punto de vista evolutivo), hace que la duplicación inalterada del mismo sea un evento ideal, posiblemente no alcanzable en la realidad. El objetivo de esta introducción es el de proveer información que deje en evidencia la complejidad (y probablemente la inexistencia) de un evento de duplicación de ADN libre de errores de copiado.

#### *3.1.1 El ADN: un molde imperfecto*

La replicación del ADN, que tiene lugar durante la fase S del ciclo celular, tiene como objetivo duplicar el material genético de la célula. El desafío del proceso de replicación es el de copiar el ADN de la manera más fiel posible dado que cualquier error de copiado es transmitido a la célula hija y perpetuado en las generaciones siguientes pudiendo dar lugar a mutaciones que alteran la estabilidad genómica de la célula. Por esto el proceso de la replicación de ADN es altamente complejo y no involucra solo a los complejos moleculares encargados del copiado de ADN sino varios complejos auxiliares involucrados en preservar la velocidad y la finalización del proceso de duplicación de ADN. El fin último de los mecanismos auxiliares es el de proteger la viabilidad celular y prevenir cambios genómicos, variables que dependen en gran medida de una eficiente duplicación del ADN.

Para comprender la necesidad de eventos de auxilio de la replicación normal es necesario discutir inicialmente variables que pueden desafiar la replicación de ADN. Existen barreras replicativas muy frecuentes que ponen en peligro la continuidad de la replicación de ADN. Aún en ausencia de estrés replicativo el ADN está sometido a frecuentes cambios químicos o daño/lesiones que resultan en su mayoría del efecto colateral del propio metabolismo celular.

Dichas lesiones en el ADN causan, en mayor o menor medida, deformaciones en la estructura del ADN que representan un obstáculo insuperable para las polimerasas replicativas que copian el ADN molde. El frenado del proceso de copiado y mucho más aún, el desacople de los complejos replicativos del ADN molde pueden promover errores (mutaciones) por lo que los eventos de auxilio se hacen indispensables. Es importante destacar que los eventos de auxilio pueden ser necesarios en manera frecuente ya que, por el contrario a lo esperado, dicha situación podría presentarse en cualquier evento de replicación de ADN. Esto queda en evidencia cuando se mide la frecuencia de acumulación de lesiones por células. El número es inesperadamente alto: aproximadamente 30.000 lesiones espontáneas por día (1), valor que sube en casi dos órdenes de magnitud durante una inocente exposición a luz solar (2). Por lo tanto, el ADN molde, lejos de ser perfecto, presenta continuos desafíos que no pueden ser acomodados por el proceso de replicación basal. Por esto, los mecanismos auxiliares de la replicación de ADN son necesarios durante la replicación y sirven para garantizar la sobrevivencia celular y su estabilidad genómica.

### *3.1.2 Los mecanismos auxiliares de la replicación de ADN*

Los mecanismos auxiliares de la estabilidad genómica y la sobrevivencia celular han evolucionado y se han conservado desde las levaduras hasta los seres humanos. Entre ellos, los mecanismos biológicamente más relevantes son: **la reparación del ADN**, que promueve la remoción de la lesión de la manera más eficiente posible; **el mecanismo de chequeo de fase S**, encargado de la estabilización de horquillas atascadas y de generar una ventana temporal para la remoción de lesiones disminuyendo la velocidad de replicación mediada por la inhibición en el disparo de orígenes de replicación; y los **mecanismos de tolerancia al daño genómico**, que promueven la utilización de bases lesionadas como molde replicativo, evitando el atascamiento de horquillas de replicación activas. Dentro de los mecanismos de tolerancia se destaca la síntesis de ADN por translesión (TLS, del inglés Translesion DNA Synthesis). Fallas en el desempeño de cualquiera de estos mecanismos auxiliares a la replicación de ADN lesionado pueden desencadenar eventos de estrés replicativos que involucran la pérdida de viabilidad y la integridad genómica.

### *3.1.3 Mi aporte al entendimiento de la replicación de ADN lesionado*

En particular nuestro laboratorio se concentra en comprender distintos aspectos regulatorios de procesos de tolerancia al daño genómico y sus implicaciones en la estabilidad genómica de células sometidas a la luz UV, estrés genotóxico al que los organismos vivos están crónicamente expuestos. En particular, en este trabajo de tesis focalizamos nuestro estudio en el entendimiento de mecanismos de síntesis de ADN por translesión (TLS).

En este trabajo de tesis demostramos que el inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas, p21, es un regulador negativo de TLS. En una primera etapa identificamos la necesidad de remover a p21 para evitar la acumulación de marcadores de estrés replicativo y de inestabilidad genómica luego de la exposición a luz UVC. En una segunda etapa demostramos una asociación molecular entre la regulación negativa de p21 después de irradiación UV y la eficiente activación del mecanismo de TLS. Concluimos que la regulación negativa de p21 después de irradiación UV es necesaria para proteger la estabilidad genómica dependiente de TLS en células en replicación activa.

Antes de presentar el detalle de los resultados obtenidos será importante detallar los conocimientos actuales sobre los mecanismos hasta aquí mencionados.

## *3.2 Replicación del ADN en organismos superiores*

---

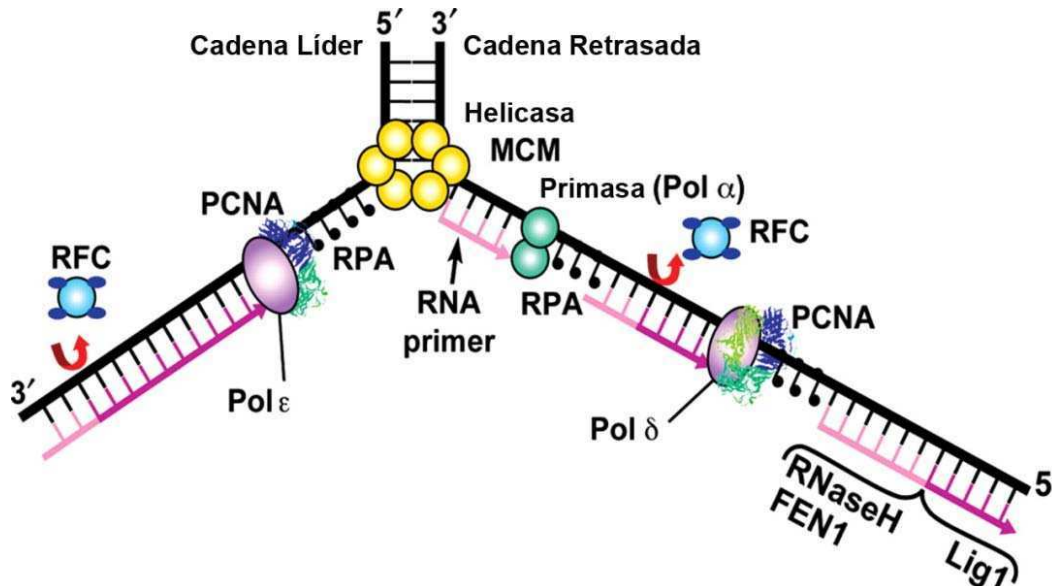
La duplicación del ADN comienza en sitios conocidos como orígenes de replicación. En organismos superiores, estos orígenes se encuentran agrupados, formando zonas (clusters) de iniciación, los cuales son activados (disparados) a diferentes tiempos durante la fase S (3, 4). Esto permite mantener un tiempo de replicación determinado ya que la duración de la fase S es determinante para un correcto progreso a través del ciclo celular. Cada origen de replicación debe ser licenciado y disparado por mecanismos que no se van a discutir en esta tesis (para una reseña ver Jones RM & Petermann E (2012) *Biochem J* 443(1):13-26)(5). Una vez disparados los orígenes se forma la horquilla de replicación donde el ADN molde y naciente son rodeados por un complejo proteico, replisoma, que se describirá a continuación. El replisoma está formado por la helicasa MCM/CDC45

que desenrolla el ADN exponiendo ADN simple cadena que actúa como molde de copiado y los factores de elongación de la replicación que incluyen a las polimerasas de ADN y a proteínas accesorias que aumentan su velocidad de copiado o procesividad. Dichas proteínas son la plataforma deslizante PCNA (del inglés, Proliferating Cell Nuclear Antigen), indispensable para el cargado de las polimerasas e la cromatina y para asegurar una replicación altamente procesiva y el factor RFC (del inglés, Replication Factor C), necesario para abrir y cargar el anillo trimerico PCNA sobre el ADN(6). Se suman además otros complejos proteicos que promueven la estabilidad de la horquilla (para más información sobre estas proteínas revisar Masai et al. (7)).

Las horquillas de replicación son estructuras complejas que aseguran la duplicación semiconservativa del ADN. La acción de las polimerasas está precedida y acoplada a la apertura de la doble hélice por parte de las helicasas que presentan a la maquinaria de replicación dos hebras moldes. La elongación se produce a partir del extremo 3'-OH libre, por lo que el sentido de incorporación de los nucleótidos es siempre 3'-5'. Debido a la naturaleza química del ADN en una de las cadenas los nucleótidos son presentados en dirección 5'-3', generándose una replicación semi-discontinua (Figura 3.1). La hebra que es presentada al replisoma en sentido 3'-5' mantiene una elongación continua y coincide con el sentido de replicación de las polimerasas replicativas, en este caso llevado a cabo por la polimerasa  $\epsilon$ , es llamada **cadena o hebra líder**. La segunda hebra es presentada en dirección 5'-3' por lo que la elongación se produce en manera más complejas mediante la formación de fragmentos discontinuos en dirección 3'-5', conocidos como fragmentos de Okazaki, esta hebra es llamada **cadena o hebra retrasada**, y los fragmentos son sintetizados por la polimerasa  $\delta$ . (8, 9). Debido a que cada fragmento de Okazaki debe iniciar di novo el proceso de replicación es necesaria la acción de la primasa Pol  $\alpha$  y la ligación de los fragmentos de Okazaki retrasados por parte de Lig1. En todos los casos, el ADN a simple cadena expuesto es protegido por la proteína de unión a simple cadena RPA que es desplazada por los complejos replicativos a medida que la replicación avanza. A su vez las nucleasas RNAsaH y FEN1 se encargan de remover los cebadores de RNA insertados por la Pol  $\alpha$ , mientras que FEN1 procesa los extremos 5' de los fragmentos de Okazaki para que Lig1 pueda unirlos



Este complejo modelo de replicación busca asegurar una replicación continua evitando el retraso innecesario de horquillas activas que podrían llevar al desacoplamiento de la maquinaria de replicación con consecuencias deletéreas para la célula como se discutirá más adelante.



**Figura 3.1:** Proteínas que forman parte de una típica horquilla de replicación: (i) proteínas MCM (del inglés Mini-Chromosome Maintenance), seis subunidades. Son las helicinas encargadas de abrir la doble hélice de ADN para iniciar la replicación; (ii) proteínas de unión a ADN simple cadena (RPA) cuya función es proteger las regiones de ADN simple cadena de la acción de las nucleasas; (iii) primasa (complejo de entre una polimerasa de ARN y Pol  $\alpha$ ) encargada de sintetizar los cebadores de ARN y pequeños fragmentos de ADN para iniciar los fragmentos de Okazaki; (iv) Pol  $\delta$ , la ADN polimerasa responsable de sintetizar la mayor fracción de los fragmentos de Okazaki; (v) Pol  $\epsilon$ , la ADN polimerasa responsable de la síntesis de la cadena líder; (vi) PCNA, la plataforma deslizante para las polimerasas replicativas, encargada de la procesividad de las polimerasas y la coordinación del proceso de maduración de los fragmentos de Okazaki; (vii) RFC, es el complejo encargado de unir a PCNA a la doble hélice de ADN; (viii) nucleasas, que incluyen RNaseH, DNA2 y FEN1, encargadas de remover los cebadores de ADN; (ix) ADN Lig1, responsable de unir los fragmentos de Okazaki procesados en una hebra de ADN continua. Las líneas negras representan el templado de ADN, las líneas violetas representan los fragmentos de ADN recientemente sintetizados mientras que las líneas rosas corresponden a los cebadores de ARN. Modificado de Zheng et al (2011) *J Mol Cell Biol*3(1): 23-30.

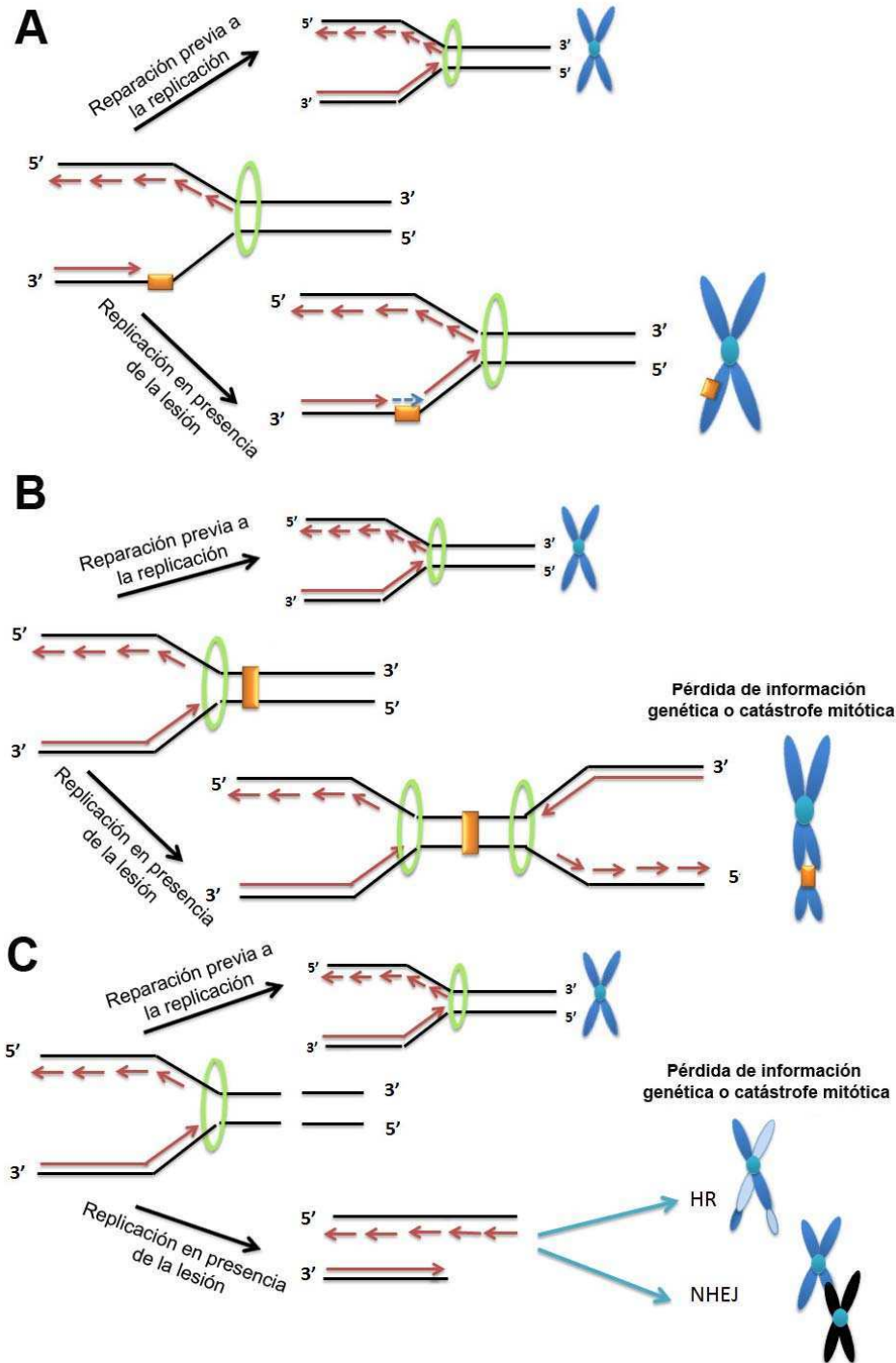
### 3.2.1 Barreras replicativas

Una horquilla en replicación activa sintetiza varios miles de pares de bases antes de desacoplarse del replisoma en sitios de terminación. Durante este trayecto las horquillas pueden encontrarse con barreras replicativas las cuales constituyen obstáculos que afectan específicamente la progresión de las polimerasas replicativas. Esos obstáculos pueden causar el desacople entre el

complejo de helicasas y polimerasas. En dichas condiciones, las polimerasas replicativas quedan atascadas frente al obstáculo mientras que la helicasa continua desenrollando la doble hélice. Dicho desacoplamiento de la helicasa y la polimerasa causa un aumento del tramo de ADN en cadena simple(10, 11). Si dicha situación no es controlada la tensión generada en la horquilla puede causar roturas del ADN y/o remoción inadecuada del replisoma (ver detalla más adelante).

Las barreras replicativas más comúnmente encontradas por las horquillas incluyen:**complejos de ADN-Proteínas que pueden frenar el avance del replisoma**. Si bien en general se espera que el replisoma no deba pausar su acción frente a complejos pre formados, existe evidencia de la existencia de proteínas asociadas al ADN que causan pausas transitorias en zonas cercanas a orígenes de replicación y telómeros(12-14), o en zonas del ADN en transcripción activa, siendo particularmente importante la zona que transcriben el RNA correspondiente a proteínas ribosomales o RNA de transferencia(15-17),**estructuras secundarias del ADN**, como por ejemplo repeticiones de secuencias en tándem, sitios G-cuádruplex del ADN, apareamientos intercatenarios por repetición de secuencias, entre otros(18); **daño al ADN**, lesiones que pueden ser de origen endógeno (como resultado del propio metabolismo celular, radicales libres, etc) o de origen exógeno. Estas últimas pueden dividirse en tres tipos: **(i)** alteraciones restringidas a una de las hebras de ADN (normalmente modificaciones sobre las bases nitrogenadas ,como por ejemplo la irradiación UV o MMS (metil-metaulfonato); **(ii)** entrecruzamientos (*cross-link*) entre las dos hebras de ADN, cómo por ejemplo el cisplatino, **(iii)** ruptura de la doble cadena de ADN, como por ejemplo la Camptotecina (CPT-inhibidor de la topoisomerasa II) o la irradiación ionizante (Figura 3.2).

Cada una de esas lesiones impone barreras diferenciales a la replicación. Las lesiones de tipo ii y iii deben ser reparadas antes de continuar o finalizar el proceso de replicación. Es imposible usarlas como molde replicativo. Las lesiones de tipo i, sin embargo son diferentes en cuando a que si es posible usarlas como molde replicativo si se activa el mecanismo auxiliar de la replicación, TLS, como se discutirá en la sección 3.3.



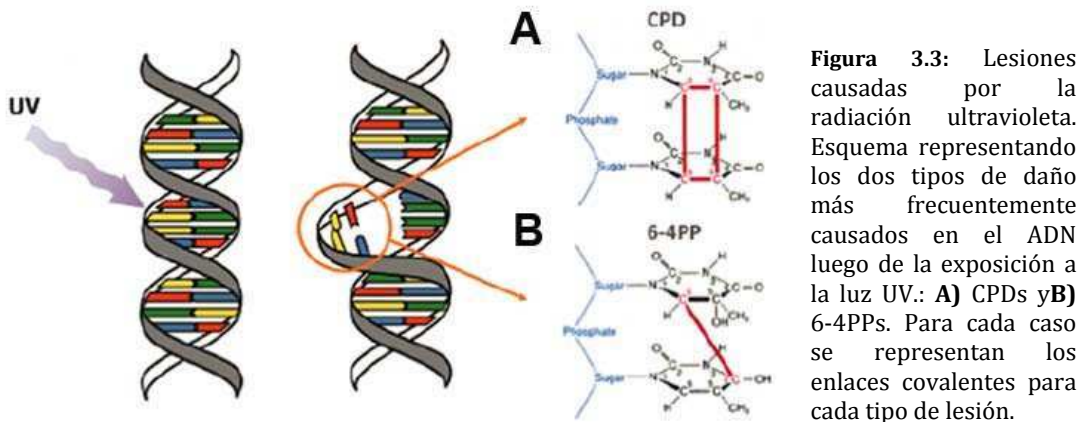
**Figura 3.2.:** Representación esquemática de las distintas Barreras Replicativas (BR) que una horquilla puede encontrar. **A)** Lesión sobre una de las hebras de ADN (lesiones generadas por ejemplo por luz UV) **Reparación previa a la replicación:** Representación gráfica de una horquilla que no se encuentra con el daño gracias a la acción de los mecanismos de reparación sin alteración de la estructura del ADN o de la integridad genómica. **Replicación en presencia de la lesión** Las polimerasas replicativas no pueden avanzar sobre la lesión, generando ADN simple cadena lo que podría llevar a un atascamiento irreversible, pero gracias a los mecanismos auxiliares como la TLS, se produce la síntesis sobre la lesión pudiendo reanudar con la replicación normal, aunque manteniendo la lesión como se ve en el gráfico representativo de un cromosoma **B)** Lesión intercatenaria, en este caso la lesión genera una unión entre las hebras de ADN obstaculizando la acción de la helicasa. **Reparación previa a la replicación:** Representación gráfica de una horquilla que no

se encontró con la lesión por acción de los mecanismos de reparación, como en A). **Replicación en presencia de la lesión:** la presencia de un entrecruzamiento entre las hebras de ADN imposibilita el desenrollamiento de la doble hélice pudiendo desencadenar la aparición de aberraciones cromosómicas cuando se condensa el ADN, comprometiéndolo la integridad genómica o peor aún la viabilidad celular por catástrofe mitótica. **C) Daño a la doble cadena de ADN. Reparación previa a la replicación:** Representación gráfica de una horquilla que no se encontró con la lesión por acción de los mecanismos de reparación, como en A). **Replicación en presencia de la lesión:** Horquilla activa que se enfrenta a una ruptura en la doble hélice de ADN. Un corte en la doble cadena (CDC) de ADN no reparado puede ocasionar el desacople de la maquinaria de replicación promoviendo dos posibles mecanismos para el procesamiento de ese CDC. Por un lado la Recombinación Homóloga (HR), que intenta reparar ese CDC de manera libre de error, utilizando las como molde las zona no dañada correspondiente a la cromatide hermana, de esta manera se obtiene un intercambio de información entre cromatides (como lo representa el gráfico del cromosoma bicolor). Otra opción puede ser la acción del mecanismo de unión de extremos No homólogos, NHEJ, (del inglés Non Homologous End Joining), y como lo especifica su nombre une extremos libres no homólogos, siendo su acción altamente mutagenica como lo demuestra el gráfico del cromosoma fusionado a otro cromosoma por acción de NHEJ.

### *3.2.3 Las lesiones causadas por luz UVC*

La irradiación UV es una fuente de estrés genotóxico continuo al que muchas células de nuestro organismo son sometidas. Esto suscita gran interés en grupos de investigación que estudian mecanismos moleculares de generación de mutaciones. Además, la irradiación UV es una fuente casi pura de lesiones correspondientes a barreras de tipo i). Esto diferencia al UV de otras fuentes de estrés genotóxico que en general producen la acumulación simultánea de distintas barreras replicativas (i, ii y iii). Como las distintas barreras deberían desencadenar distintos mecanismos de respuesta celular, el análisis de respuestas globales dificulta la interpretación de resultados. Por el contrario, la irradiación UV causa casi exclusivamente la acumulación de enlaces covalentes entre bases adyacentes (barreras de tipo i) lo que simplifica la interpretación de resultados. Las lesiones más frecuentes causadas por UV son denominadas CPDs, (ciclobutane piridine dimers) y las menos frecuentes se conocen como 64P-P (6,4-photoproducts, o 6,4 pyrimidine-pyrimidones). Estas últimas generan deformaciones pronunciadas del ADN (ver figura 3.3A) y son por lo tanto eficientemente reconocidas por los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (NER) que remueven dichas lesiones en aproximadamente 6 horas (19). Por el otro lado los CPDs causan deformaciones sutiles del ADN (ver figura 3.3B) que no son reconocidas con eficiencia por el mecanismo NER, De hecho, después de 48 horas todavía se observa un remanente de aproximadamente el 50% de las lesiones por lo que la probabilidad del encuentro de horquillas de replicación activas con CPDs. En una

célula genómicamente estable se espera que el encuentro de una horquilla de replicación con un CPD (y también con un 64PP) cause la activación del mecanismo auxiliar de la replicación TLS, el cuál debería prevenir el atascamiento de la replicación. Las implicaciones de la activación de TLS sobre la sobrevida y la mutagnésis después de UV serán discutidas en la sección siguiente.



### 3.3 Síntesis de ADN por Translesión (TLS): replicar ahora reparar después

La síntesis de ADN por translesión o TLS es un mecanismo auxiliar de la fase S que permite el copiado de regiones dañadas de ADN. Las polimerasas replicativas (Pol  $\delta$  y Pol  $\epsilon$ ) poseen sitios activos extremadamente específicos, incapaces de acomodar las modificaciones introducidas en las bases cuando el ADN es dañado. En dichas instancias, las polimerasas especializadas pueden reemplazar a las replicativas ya que poseen un sitio activo más laxo que les permite acomodar las bases distorsionadas como los aductos causados por luz UV (20, 21). Las polimerasas especializadas se caracterizan por una procesividad reducida en comparación con las polimerasas de replicación, ya que mantienen menor cantidad de contactos con el ADN (20, 22) y pueden ser menos fieles en el copiado de ADN, debido a la falta de actividad de lectura de prueba 3'-5' (20, 23, 24). El hecho de que tengan poca fidelidad de copiado sugiere que estas polimerasas son propensas a introducir errores, por lo que su actividad debe ser rigurosamente controlada.

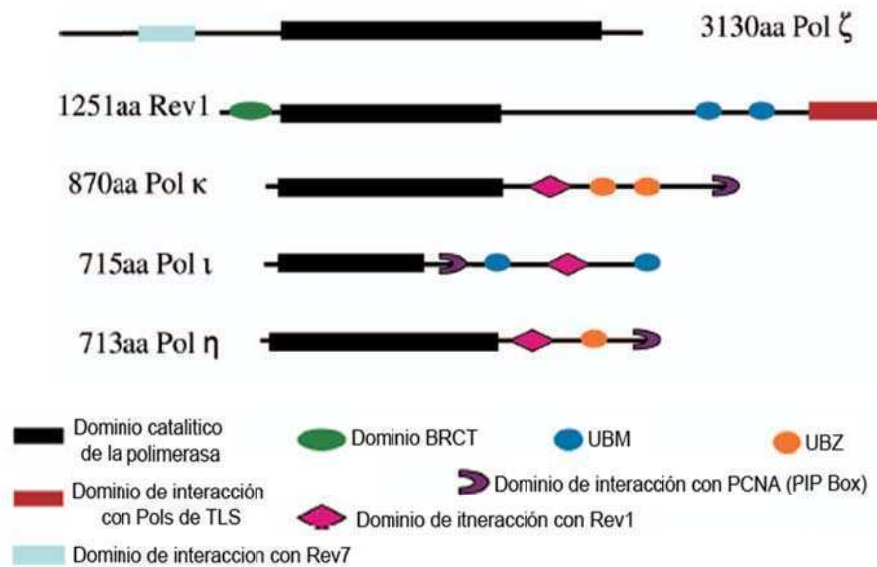
En el caso de las lesiones causadas por luz UV, las polimerasas replicativas no puede acomodar en su sitio activo las timinas distorsionadas por el enlace

covalente, por lo que la horquilla en progresión se frena ante este tipo de lesión. Es aquí cuando las polimerasas especializadas capaces de utilizar las bases dañadas como molde replicativo se vuelven esenciales para promover la progresión de horquillas de replicación.(20, 23) Estas polimerasas especializadas se conocen también como permisivas o de TLS debido a su bien caracterizada acción en la TLS activada por luz UV. Particularmente importante es la Polimerasa  $\eta$ .(Pol  $\eta$ ), que evoluciono para promover la síntesis de ADN casi libre de errores cuando utiliza como templado a los CPD (25-27). Esta polimerasa coloca con gran eficiencia y poca probabilidad de error las dos adeninas opuestas al dímero de timinas. Las polimerasas especializadas son muchas y pueden acomodar distintos moldes de ADN pudiendo ser poco o muy mutagénicas dependiendo del tipo de lesión y de la polimerasa involucrada en el proceso de TLS en cuestión.

Las polimerasas involucradas en la TLS que resulta de la irradiación UV se agrupan dentro de una familia conocida como familia Y de polimerasas (que incluye Pol  $\eta$  , Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$  y REV1). La polimerasa extensora  $\zeta$  también participa en el proceso de TLS causado por luz UV. Esta última pertenece a la familia B (la misma familia de las polimerasas replicativas  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\alpha$ ) y posee alta procesividad pero es en general mutagénica(28).

### *3.3.1 Polimerasas especializadas o de translesión (TLS)*

Las polimerasas especializadas o de TLS están presentes en bacterias, eucariotas unicelulares y en metazoos. Todas las polimerasas de la familia Y poseen dominios catalíticos conservados en su mayoría cercanos a la región N-terminal (Figura 3.4). La región C-terminal de la proteína no es conservada entre las polimerasas de esta familia y es, responsable de interacciones proteína-proteína, de interacciones con factores que median su localización celular y su actividad en horquillas de replicación detenidas. Todas estas polimerasas difieren de las polimerasas replicativas por la relativamente baja procesividad y fidelidad en el copiado de ADN, como consecuencia de la falta de actividad exonucleasa de lectura de prueba 3'-5'. Todos los miembros de la familia Y de polimerasas son atraídas a la plataforma deslizante PCNA, que como se verá más adelante sufre modificaciones post-traduccionales en respuesta al daño al ADN.



**Figura 3.4:** Esquema representativo de las polimerasas especializadas o de TLS. Pertenecientes a la familia B de polimerasas (Pol ζ) y la familia Y (Pol η, Pol ι, Pol κ y Rev1). Representación de sus dominios de catalíticos y de interacción, esenciales para su localización. Adaptado de Waters Lauren S. et al; 2009 Microbiol Mol Biol Rev. 2009 March; 73(1): 134–154.

Como se mencionó anteriormente, estas polimerasas de TLS deben interactuar con PCNA para poder cumplir con su función. Esto lo pueden hacer a través de dos formas: mediante su dominio de unión a PCNA (PIP box) y a través de los dominios de unión a ubiquitina (UBM o UBZ) que les permite interactuar con la forma modificada de PCNA, PCNA-ub. Modificación que ocurre en respuesta a la irradiación UV. Como veremos a continuación todas las polimerasas de la familia Y involucradas en la respuesta a UV, comparten estas características, con excepción de Rev1, que posee dominios alternativos para cumplir esta función, diferentes al PIP box, que incluyen un dominio BRCT y dominios de unión a otras polimerasas de TLS.

### i. Pol η

Pol η es probablemente la polimerasa de TLS mejor caracterizada ya que su eliminación causa una enfermedad denominada *Xeroderma Pigmentosum Variant* (XP-V). Los pacientes con esta enfermedad son proclives al desarrollo de cáncer de piel y son muy sensibles a la luz solar (29, 30).

Pol  $\eta$  es la polimerasa más importante para el proceso de síntesis de ADN por translesión a través de CPDs, ya que es la única polimerasa de TLS capaz de sintetizar a través de este aducto con extrema precisión y fidelidad *in vitro* (31), y es responsable de reanudar la replicación frente a horquillas atascadas *in vivo* (32, 33). En ausencia de Pol  $\eta$ , las células evidencian un aumento en la tasa de mutagénesis y carcinogénesis inducida por la luz UV (34). Se sospecha que el incremento en la mutagénesis resulta de un incremento en el reclutamiento de otras polimerasas TLS a CPDs. Debido a que dichas polimerasas no son las que evolucionaron para realizar la síntesis en oposición a CPDs, los eventos de TLS dependientes de otras polimerasas de la familia Y deberían ser más mutagénicos en ausencia de Pol  $\eta$ . Por ejemplo se reportó que en células de ratones la polimerasa que actúa si Pol  $\eta$  no está es Pol  $\iota$  (35). Por otro lado estudios recientes demuestran que la acción de las polimerasas especializadas no se restringe a la replicación de ADN lesionado sino que participarían en la replicación no perturbada de ADN. Dichos estudios han revelado una función de Pol  $\eta$  sobre el mantenimiento de los sitios comunes de fragilidad conocidos como *Common Fragile Sites* (CFS). Esta función estaría asociada a su capacidad de replicar sobre templados alterados morfológicamente, una característica de los CFS, lo que la hace indispensable sobre la progresión de la replicación en condiciones normales (36, 37).

## ii. Pol $\iota$

Pol  $\iota$  es un parálogo de Pol  $\eta$ , *in vitro* Pol  $\iota$  puede insertar nucleótidos en oposición a varios tipos de bases dañadas, pero es incapaz de completar la síntesis de ADN ya que no puede extender a partir del primer nucleótido insertado (38). Existen otras polimerasas de TLS capaces de extender a partir de la primera base insertada por una polimerasa de TLS. Dichas polimerasas se conocen como "extensoras" y se cree que Pol  $\iota$  podría trabajar en conjunto con al menos otra polimerasa (extensora) para llevar a cabo la TLS sobre diferentes tipos de lesiones (39).

La principal evidencia que sostiene la participación de Pol  $\iota$  en el proceso de TLS se obtuvo durante un análisis de localización, la cual es idéntica a la de Pol  $\eta$ . Ambas polimerasas especializadas se caracterizan por una distribución panuclear



difusa en el núcleo que cambia abrupta y rápidamente después de irradiación UV, lo que causa la agregación de ambas polimerasas en agregados asociados a factorías de replicación que colocalizan con focos de PCNA y de síntesis de ADN(40). La organización focal de las polimerasas  $\eta/\iota$  depende de sus sitio de unión a PCNA, ya que mutaciones en este dominio impiden el reclutamiento focal de ambas polimerasas in vivo (41). La localización de Pol  $\iota$  a focos depende también de la presencia de Pol  $\eta$  ya que en células XP-V (deficientes en Pol  $\eta$ ) el porcentaje de focos de Pol  $\iota$  es menor en comparación con una célula normal(40).

### iii. Pol $\kappa$

In vitro Pol  $\kappa$  es capaz de sintetizar a través de aductos de benzo(a)pireno-guanina, originados por el humo del tabaco, de manera muy precisa y eficiente (42). Además se sabe que la expresión de Pol  $\kappa$  aumenta ante la exposición de la célula a hidrocarburos policíclicos (43) lo que concuerda con su capacidad de replicar a través de los aductos de Benzo(a)pireno. La organización focal de Pol  $\kappa$  también fue observada después de irradiación UV(44). Sin embargo la localización de Pol  $\kappa$  difiere de las demás polimerasas de TLS, aunque es exclusivamente nuclear y se recluta a factorías de replicación después de inducción de lesiones al ADN, la fracción de células con focos de Pol  $\kappa$  es mucho menor que lo observado para Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$  y PCNA(44). Tampoco se observa una colocalización absoluta de Pol  $\kappa$  con las demás polimerasas y PCNA(44) lo que sugiere funciones no totalmente sobrepuestas. En este sentido es importante destacar que células deficientes en Pol  $\kappa$  son sensibles a la exposición con luz UV (45). Aunque hasta el momento no hay evidencias claras de la acción de Pol  $\kappa$  en el traspaso de CPDs u otras lesiones, dichas observaciones sugieren que Pol  $\eta$  y Pol  $\kappa$  podrían ser importantes para distintos eventos de TLS después de irradiación UV.

### iv. Rev1

Rev1 es una polimerasa estructuralmente diferente a las demás polimerasas de la familia Y, que tiene un rol central en la respuesta celular a UV habiendo sido identificada como proteína esencial para activar eventos de TLS en eucariotas inferiores y superiores (46). Rev1 posee una actividad catalítica única, in vitro funciona como una c-transferasa, incorporando citosinas frente a cualquier tipo de lesión (47-49). La contribución de la actividad catalítica de Rev1 in vivo se

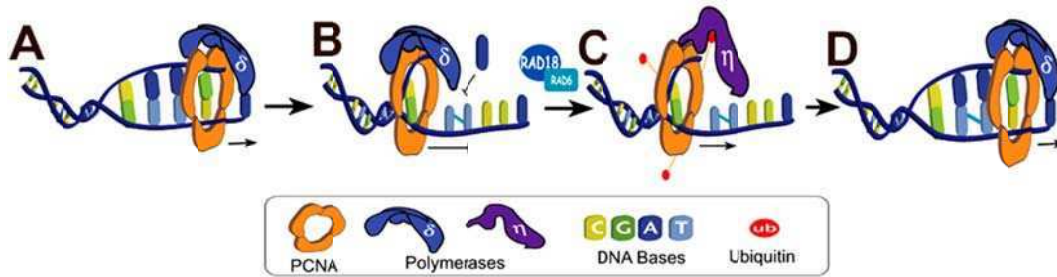
encuentra todavía en estudio. Para varios tipos de lesiones, como las inducidas por luz UV (fotoproductos), la contribución a TLS de Rev1 parecería no involucrar su actividad catalítica y dependería en mayor medida de su dominio N-terminal que comprende la región del BRCT, región requerida para su interacción con PCNA(50, 51).(52) El dominio C-terminal de Rev1, es además importante para su localización intracelular y contiene el sitio de interacción con otras polimerasas de TLS, que incluyen a Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$  (51, 53-56) y Rev7, la subunidad accesoria de Pol  $\zeta$  (51, 57, 58). El dominio C-terminal de Rev1 puede además contribuir a la interacción con PCNA (59). En conjunto, estos datos parecerían indicar que la actividad catalítica de Rev1 es prescindible para la TLS pero sus dominios de interacción con otras proteínas son esenciales para dicha función. Esto sugiere que Rev1 puede tener una función estructural o de nucleación de factores necesarios para TLS en horquillas que encontraron una lesión. Recientemente se ha propuesto que la función de Rev1 podría relacionarse con la facilitación del intercambio de polimerasas replicativas por especializadas en horquillas atascadas en una lesión (60).

### *3.3.2 Ubiquitinación de PCNA: Modelo de TLS acoplado a la horquilla*

El modelo de TLS acoplado a la horquilla de replicación propone que cuando la polimerasa replicativa de alta procesividad encuentra un daño en el ADN a través del cual no puede sintetizar se produce un intercambio de polimerasas *in situ*, donde la polimerasa replicativa es reemplazada por una polimerasa de TLS que puede adaptar su sitio activo a la lesión. Luego, por un mecanismo pobremente definido la polimerasa de TLS dejaría su lugar a la polimerasa replicativa que reasumiría la replicación con alta procesividad (Figura 3.5).

Si tomamos a Pol  $\eta$  como ejemplo de TLS, esta polimerasa esta siempre disponible dispersa en el núcleo, pero ¿cómo es dirigida a las horquillas detenidas en presencia de lesiones en el ADN? Se demostró utilizando células humanas, que PCNA, la plataforma deslizante necesaria para la procesividad de las polimerasas eucariotas, es monoubiquitinada en respuestas a irradiación UV u otros agentes que alteran la progresión de las horquillas replicativas (61). Esta monoubiquitinación es llevada a cabo por la E3 ligasa Rad6-Rad18 que es

reclutada a horquillas detenidas, por la exposición de ADN simple cadena, ubiquitinando a PCNA en el residuo lisina 48 (62). Esta podría ser explicar el intercambio de polimerasas que ocurre en la horquilla detenida, en donde la interacción de la polimerasa de TLS es favorecida por la mono-ubiquitinación de PCNA, La mono-ubiquitinación favorece la interacción de las polimerasas de TLS con PCNA, las cuales además de poseer dominios de unión de PCNA tienen dominios de unión a ubiquitina (63, 64).



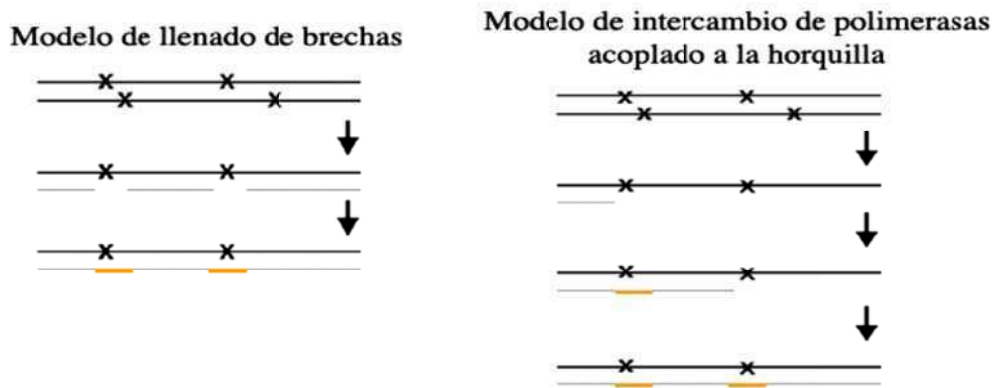
**Figura 3.5:** Esquema del modelo de intercambio de polimerasa acoplado a una horquilla. **A)** Durante la replicación del ADN la cadena naciente es sintetizada por polimerasas replicativas (pol  $\delta$ ) unidas al factor de procesividad PCNA. **B)** Frente a una lesión generada por irradiación UV, la unión de bases adyacentes frena la horquilla. **C)** El complejo E3 ligasa Rad18-Rad6 ubiquitina a PCNA lo que promueve el reclutamiento de polimerasas especializadas que usan el ADN lesionado como molde (se muestra Pol  $\eta$ ) **D)** A través de un nuevo intercambio de polimerasas Pol  $\delta$  retoma la replicación sobre templados de ADN no dañado.

### 3.3.3 Modelo de TLS por llenado de brechas (GAP filling)

Si bien está aceptado que la TLS involucra un intercambio de polimerasas replicativas por especializadas, la temporalidad del evento de TLS es objeto de algunas controversias ya que no es fácil dilucidar si el proceso de TLS auxilia la replicación in situ o si tiene lugar como evento post-replicativo retrasado con respecto al avance de la horquilla de replicación. El primer modelo involucra un intercambio de polimerasas en la horquilla de replicación (modelo acoplado a la horquilla) y el segundo requiere discontinuidad en la síntesis dependiente de las polimerasas replicativas, lo que implica una reorganización de la horquilla de replicación en posición 3' (rio abajo, de manera similar a como se sintetizan los fragmentos de Okazaki en la cadena retrasada) con respecto a la lesión. Esto es lo que genera una brecha o "gap" que posteriormente será llenada por un proceso de TLS (Figura 2.6). En este caso la finalidad del mecanismo de TLS no radicaría en

evitar el colapso de horquillas atascadas, sino en garantizar la culminación de la síntesis total de ADN antes de la finalización de la fase S o inclusive antes de la entrada en mitosis. Existen múltiples evidencias que el modelo de llenado de brechas podría ser biológicamente relevante, como por ejemplo experimentos realizados en levaduras que demuestran que la viabilidad celular no se reduce si la expresión de las polimerasas especializadas se restringe a la fase G2/M lo que sugiere que al menos en ese contexto se podría limitar la actividad de TLS a un contexto postreplicativo(65).

Es importante además destacar que el modelo de llenado de brechas no es excluyente con el modelo de TLS acoplado a la horquilla y es posible que ambos tipos de mecanismos puedan actuar en diferentes circunstancias y ser gatillados por distintos eventos moleculares. De hecho, usando células de pollo DT40 se ha propuesto que la mono-ubiquitinación de PCNA es relevante solo para el mecanismo de llenado de brechas mientras que Rev1 sería central para la TLS acoplada a la replicación de ADN (60).



**Figura 3.6:** Diagrama esquemático comparando el modelo de llenado de brechas o “gap filling” con el modelo de intercambio de polimerasas acoplado a la horquilla de replicación. Por cuestiones de simplicidad solo se representa la replicación de una de las cadenas (Modificado de Lehmann y Fuchs. DNA REPAIR 5 (2006) 1495–1498).

Más allá de los detalles asociados a su activación, es importante concluir que la TLS es un proceso que ha evolucionado para evitar el bloqueo permanente de una horquilla frente a una lesión. La irreversibilidad de dicho bloqueo podría causar la destrucción de horquillas de replicación y la pérdida de viabilidad o el aumento de la inestabilidad genómica como consecuencia de un mayor estrés replicativo, como se discutirá a continuación.

### 3.4.1 *Atascamiento irreversible de horquillas: colapso de horquillas*

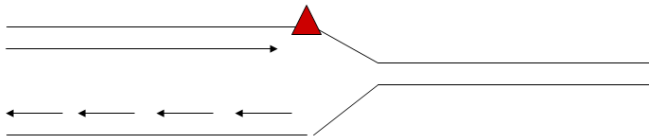
Las barreras replicativas originadas por la acción de la irradiación UVC son lesiones en una cadena simple de ADN (tipo i Figura 3.2 A). Si el proceso de TLS no se activa, puede producirse una pausa momentánea (atascamiento) o un desacople entre el complejo replicativo y las helicasas, causando eventualmente una pausa permanente o colapso de la horquilla de replicación. Aunque puedan parecer similares, los términos atascamiento y colapso de horquillas de replicación son ampliamente utilizados en el campo de replicación de ADN lesionado para diferenciar entre estas dos situaciones cuyas consecuencias son fisiológicamente diferentes.

El *atascamiento* de una horquilla de replicación supone un obstáculo en el movimiento del replisoma. Se calcula que la velocidad de replicación de una horquilla en células eucariotas es de alrededor de 50 pares de bases por segundo. La incógnita reside en cuanto tiene que desviarse de este valor para considerarse atascada, aunque si se ha observado que las horquillas pueden detenerse por varios minutos(66). Es esperable que una horquilla replicativa deba lidiar con la aparición de barreras replicativas de manera frecuente durante la duplicación del ADN, teniendo en cuenta la cantidad de lesiones endógenas que se producen como consecuencia del metabolismo celular, ocasionando que la velocidad de replicación disminuya en manera frecuente. Sin embargo las horquillas que disminuyen su velocidad o se atascan frente a estas lesiones pueden reasumir normalmente la replicación del ADN gracias a la acción de mecanismos que promueven la replicación sobre ADN lesionado, así como también los mecanismos de chequeo como se mencionó anteriormente en la introducción.

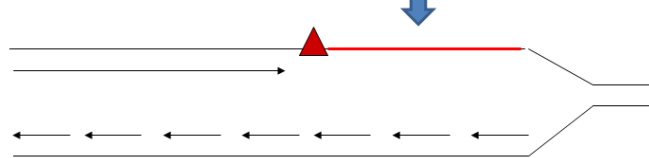
A diferencia de lo que se conoce como atascamiento de horquilla, el *colapso* de una horquilla requiere un desacoplamiento de la maquinaria de replicación, generándose asimetría y tensiones en la horquilla replicativa por un continuo desenrollamiento de la doble hélice de ADN por parte de las helicasas, sin continuidad de síntesis (Figura 3.7 C) (67). La tensión generada por el desacople de la maquinaria de replicación así como el procesamiento de estas estructuras pueden llevar a la formación de cortes en la doble cadena de ADN (ver Figura 3.7).

(68, 69). Esto a su vez, podría causar pérdida de información genética incompletamente replicada o pérdida de viabilidad si los eventos de colapso son suficientes en una misma célula o se pierde información esencial para la duplicación de ADN o su correcta distribución entre células hijas. Consecuentemente, un colapso replicativo es un evento que pone en juego la viabilidad celular y la pérdida de integridad genómica.

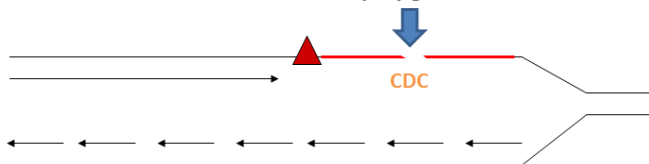
A. Una de las hebras en la horquilla de replicación encuentra la lesión



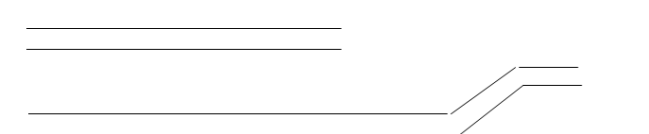
B. Asimetría y tensión



C. Rotura del ADN en una cadena simple y generación de CDCs



D. Reordenamiento de la horquilla colapsada generada en C.



**Figura 3.7:** Atascamiento de horquillas versus colapso de horquillas: **A)** Una horquilla en replicación activa se encuentra con una lesión generada en una de las hebras de ADN. **B)** Si la horquilla no puede sintetizar a través de la lesión se produce un desacople entre los complejos de polimerasas y helicasas, aumentando la aparición de ADN simple cadena (atascamiento). **C)** Eventualmente si la horquilla replicativa no reanuda la síntesis de ADN, el desacople es mayor generándose más ADN simple cadena, lo que lleva a la aparición de cortes a la doble cadena de ADN (CDC) (colapso). **D)** la horquilla colapsada resulta de un reordenamiento del CDC generado en C) generando pérdida de fragmentos de ADN si no se resuelve.

### 3.2.3 Estrés replicativo

Se entiende como estrés replicativo a aquél estímulo que genera una disminución en la velocidad de progresión de horquillas replicativas activas, ocasionando atascamientos transitorios e inclusive colapso de horquillas (70). Los factores que causan estrés replicativo son aquellos que alteran la estructura del ADN e interfieren con la maquinaria replicativa, entre los que se encuentran las barreras replicativas discutidas en la sección anterior. El estrés replicativo también puede evidenciarse en regiones del ADN que son intrínsecamente difíciles de replicar como consecuencia de las estructuras secundarias que las hebras de

ADN pueden adoptar haciendo más difícil el desenrollamiento de la doble hélice durante el ingreso de la maquinaria de replicación.

Entre las consecuencias del estrés replicativo se destaca la acumulación de lesiones secundarias en el ADN (como por ejemplo la mostrada en Figura 3.7 C), no causadas en manera directa por el agente estresor sino en manera asociada al encuentro de la maquinaria de replicación con la lesión primaria. Esto puede llevar a una pérdida de integridad genómica asociadas a eventos recombinogénicos (como ejemplificada en la Figura 3.7.D). La prevención de un incremento innecesario de estrés replicativo dependen de distintos procesos que evitan el atascamiento y el colapso de horquillas de replicación como por ejemplo, la activación de eventos de TLS (previenen atascamientos)(71, 72).

### *3.2.4 Marcadores de estrés replicativo*

Una medida directa de estrés replicativo es un cambio en la velocidad global de síntesis de ADN que resulta de acumulación de eventos de atascamiento y colapso replicativo. Esto puede ser evidenciado mediante un análisis de citometría de flujo o, más claramente, mediante un estudio de pulsos de incorporación de análogos de timidina revelables por inmunodetección. Además existen marcadores que indican cambios en los complejos proteicos asociados al ADN y revelan cambios estructurales que sufren las hebras de ADN por la inducción de estrés replicativo (evidenciados por incrementada fosforilación de la histona H2AX) y la acumulación de lesiones secundarias de tipo CDC (evidenciados por la reorganización de la proteína 53BP1 en focos subnucleares).

#### **i. Gamma H2AX ( $\gamma$ H2AX)**

Las histonas que forman parte del nucleosoma juegan un papel central en la definición de la estructura de la cromatina, por lo que modificaciones covalentes de estas histonas pueden desencadenar una amplia variedad de respuestas biológicas. Una de estas modificaciones es la fosforilación de la variante de la histona pequeña H2A, la histona H2AX en la serina 139 ( $\gamma$ H2AX) en respuesta a modificaciones en la estructura del ADN. En un principio se asoció esta modificación a la formación de cortes en la doble cadena de ADN (CDC) y como un

factor que propicia el reclutamiento de factores involucrados en la resolución de los CDC (73, 74). Actualmente hay varias evidencias que indican que la fosforilación de la histona H2AX no es exclusiva de los CDC, sino que se asocia a varios procesos que involucran la remodelación de la cromatina(75), desde los rearrreglos cromatínicos que ocurren durante la meiosis (76, 77), rearrreglos de las inmunoglobulinas(78), hasta la acumulación de daño inducido por luz UV(79, 80).

La organización subnuclear de la forma fosforilada de la histona H2AX puede variar en manera dependiente al tipo de lesión que gatilla su fosforilación. Se reporta la acumulación de agregados nucleares en forma de focos discretos asociados a la formación de CDC. De hecho, fueron reportados después de la irradiación ionizante, que se sabe que genera este tipo de lesión. Dichos focos de  $\gamma$ H2AX pueden ser cuantificados utilizando un microscopio de fluorescencia de manera sencilla. Existe evidencia de que el número de focos observados es proporcional al número de cortes en el ADN y es independiente de la fase del ciclo celular (81, 82).

Por otro lado se reporta un aumento de la intensidad relativa de  $\gamma$ H2AX en manera homogénea en todo el núcleo estresado (aumento panuclear) que sugiere una alteración generalizada del estado de la cromatina que causa un aumento homogéneo de la fracción fosforilada de H2AX. Este tipo de respuesta es generada por la irradiación por luz ultravioleta y está íntimamente asociada a la progresión a través de la fase S (81, 83).

## **ii. 53BP1**

53BP1 (del inglés *p53 binding protein 1*) fue inicialmente identificada como una proteína de unión a p53 con la función de aumentar su actividad transcripcional (84, 85). En respuesta a estrés genotóxico 53BP1 se redistribuye rápidamente de una localización difusa en el núcleo a focos nucleares discretos, lo que sugiere su participación en la respuesta celular al daño inducido al ADN (86-88). El dominio C-terminal de 53BP1 contiene dos dominios BRCT (del inglés *carboxyl-terminal domain of the Breast Cancer Gene 1*), dominios que forman parte de proteínas implicadas en varios aspectos de la regulación del ciclo celular, recombinación y reparación del ADN(89, 90). Estudios recientes han demostrado que 53BP1 es fosforilada en respuesta a la radiación ionizante (RI) y que colocaliza con  $\gamma$ H2AX



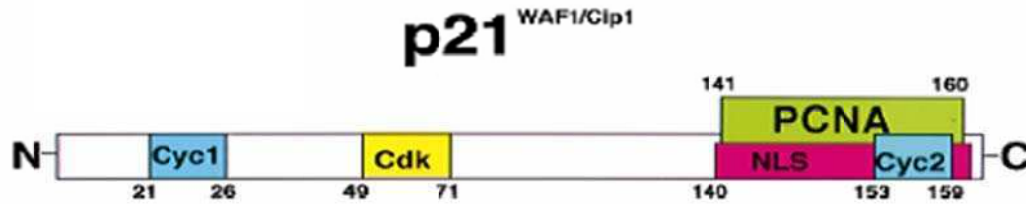
en los focos inducidos en sitios de acumulación de CDC (22, 86). Por otro lado ratones deficientes en esta proteína demostraron alta sensibilidad a la RI, lo que sugiere una actividad fundamental en la respuesta a dicho daño genómico(91). Por último, más allá de su implicancia en la respuesta celular al daño genómico, esta proteína ha sido asociada directamente con la formación de cortes en la doble cadena de ADN por varios grupos que identificaron su reclutamiento solo en respuesta a agentes que generan cortes en la doble hélice como la RI, a diferencia de la radiación por luz ultravioleta o agentes que bloquean la replicación transitoriamente que generan otro tipo de lesiones (87). La asociación directa de 53BP1 con la aparición CDC también se reforzó por la emergente evidencia de fuerte localización entre los focos de 53BP1 y aquellos formados por proteínas involucradas en la resolución de los CDC como BRCA1, Rad51, NSB1, entre otras (28, 86, 92).

### *3.4 p21 Cip1/Waf1*

---

La proteína p21<sup>Cip1/Waf1</sup> (de aquí en más llamada p21) participa en la mayoría de los procesos reversibles e irreversibles de arresto del ciclo celular y contribuye en los mecanismos de diferenciación celular terminal y senescencia replicativa. p21 logra su actividad mediante interacción directa con sus sustratos. Las interacciones más estudiadas son las establecidas con las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y la plataforma deslizante PCNA (93).

Dos dominios de p21 son los responsables de sus funciones biológicas: el dominio N- terminal (aa1-82) y el C terminal (aa140-160). Mediante su dominio N-terminal CDKs y ciclinas, y con su dominio C-terminal interacciona con el anillo replicativo PCNA (Figura 3.8). Inicialmente se pensó que p21 formaba un complejo cuaternario que contenía ciclinas/CDKs, PCNA y p21(94). Más recientemente diferentes publicaciones sugirieron que los complejos que contienen CDK2 y PCNA son independientes (95, 96). Una conclusión que se obtiene de los estudios anteriormente mencionados es que se necesitan cantidades estequiométricas de p21 para inactivar complejos ciclinas/CDKs y PCNA. Debido a esto, la abundancia de p21 se convierte en una variable crítica que determina su capacidad inhibitoria in vivo.



**Figura 3.8** Representación gráfica de una molécula de p21 mostrando la localización de sus dominios de interacción con ciclinas, CDKs y PCNA (los segmentos aminoácidos de cada dominio se encuentran detallados) . Se representa además la señal de localización nuclear o NLS. (Modificado de Dotto, P. *Biochimica et Biophysica Acta* 1471, 2000)

### 3.4.1 p21, PCNA y proteínas de unión a PCNA

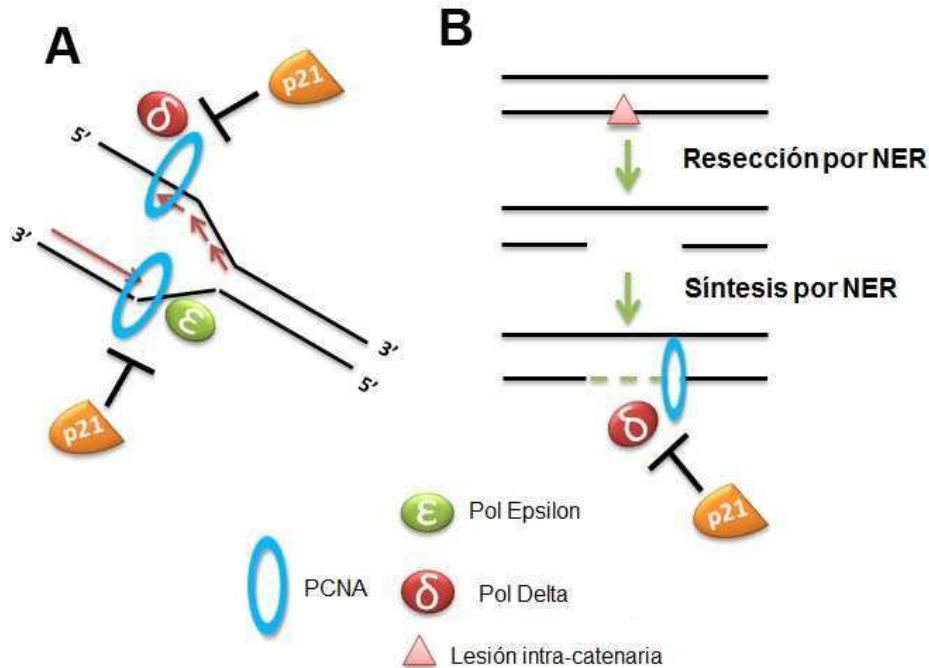
Como fue señalado con anterioridad, otro potencial blanco de p21 es PCNA. . PCNA forma un anillo de interacción con el ADN, necesario para aumentar la procesividad de su síntesis. Esto lo logra mediante su capacidad de reclutar proteínas esenciales para la fase de elongación del proceso de replicación del ADN, como ya fue introducido anteriormente (referirse a la sección de replicación)

El sitio de unión a PCNA se conoce como PIP box (PCNA interacting region) y p21 posee un sitio que permite una muy fuerte interacción de p21 y PCNA. Esta interacción no interfiere con la unión de PCNA al ADN sino que puede competir con otras proteínas que poseen PIP boxes por la unión a PCNA. Debido a esta característica intrínseca de p21 por mucho tiempo se asumió que p21 bloqueaba la replicación tanto por su efecto inhibitorio de CDKs como por un efecto inhibitorio directo de la síntesis de ADN mediante su interacción con PCNA. Sin embargo, actualmente existe mucha controversia acerca de si p21 es capaz de bloquear directamente la replicación del ADN mediante su interacción con PCNA. Estudios *in vitro* utilizando relaciones elevadas de p21:PCNA (hasta de 100:1) han demostrado que p21 puede bloquear la síntesis de ADN si y solo si p21 alcanza niveles muy altos, potencialmente no alcanzables en situaciones fisiológicas(97-99). Por otro lado, estudios *in vivo* arrojan resultados contradictorios respecto a si las relaciones p21:PCNA alcanzadas son suficientes para bloquear la síntesis. Mientras algunos estudios sugieren que p21 puede bloquear la replicación en células vivas(100, 101), muchos otros reportan un efecto bajo o nulo en la síntesis de ADN dependiente de PCNA (102-105). En particular, nuestro grupo reportó que la expresión de un mutante estable de p21 que alcanza buenos niveles de expresión solo puede bloquear la progresión del ciclo celular a través de su

dominio de unión a CDK pero no a través de su unión a PCNA(106, 107). La consideración principal que surge de estas observaciones es que la relación fisiológica p21: PCNA que se alcance es crítica para la capacidad de p21 de bloquear la replicación del ADN. PCNA es una proteína muy abundante, especialmente durante la fase S, lo que sugiere incluso los más altos niveles fisiológicos de p21 que puedan alcanzarse serían insuficientes para bloquear de manera significativa la replicación.

Por otra parte, dado que PCNA no solo participa activamente en los procesos de replicación de ADN sino también en procesos de reparación de ADN como NER. Durante la reparación por NER, el complejo PCNA/pol  $\delta$  es el encargado de la etapa de re-síntesis del ADN que reemplaza la región de ADN dañada y previamente removida. Varios grupos han sugerido que p21 podría interferir en estos procesos (Figura 3.9 A y B). Al igual que con la replicación del ADN, hay evidencia *in vitro* que sugiere que p21 podría tener un efecto inhibitorio en el proceso de reparación conocido como reparación por escisión de nucleótidos (NER)(108-111). Sin embargo la evidencia *in vivo* de un efecto inhibitorio de p21 sobre NER es aún menos sólida que la obtenida para la replicación (109, 112, 113). Además, nuestros datos indican que altos niveles de sobreexpresión de p21 no bloquean la síntesis de ADN dependiente de NER(107) por lo que es posible que los niveles fisiológicos de p21 tampoco alcancen para bloquear NER.

En conclusión, si bien el dominio de unión a PCNA de p21 puede bloquear la acción de las polimerasas replicativas *in vitro*, su acción *in vivo* puede ser ineficiente e irrelevante en situaciones fisiológicas reales por lo que el rol de la interacción de p21 con PCNA sería, hasta aquí, desconocido.



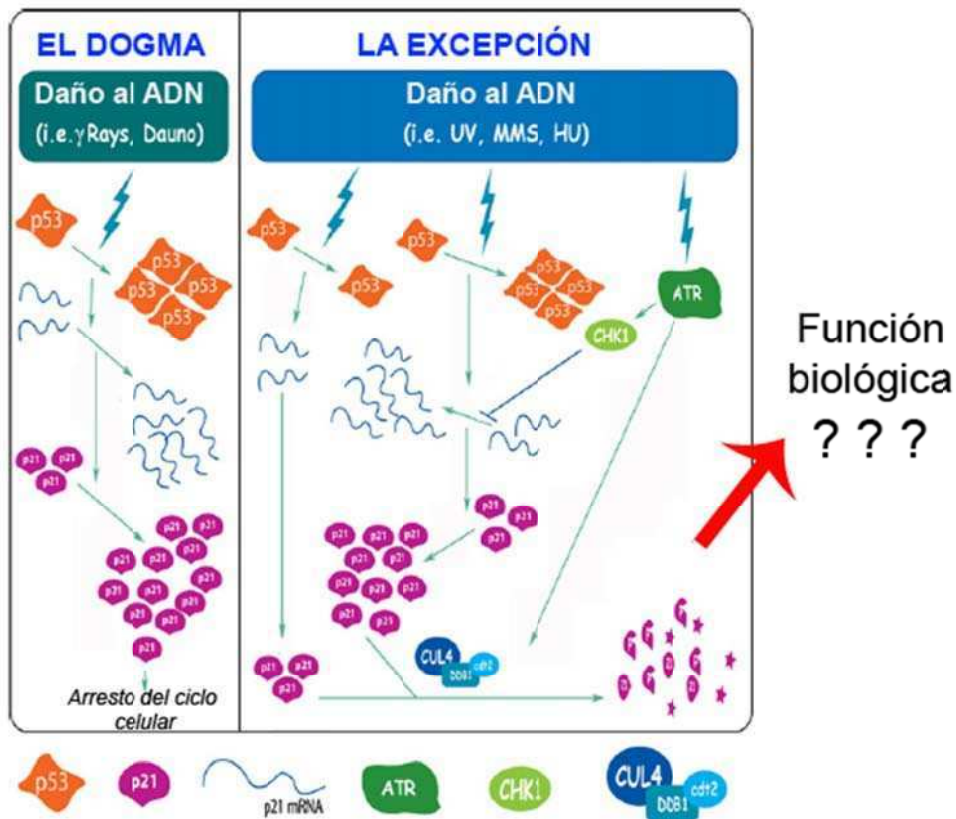
**Figura 3.9:** Esquemas representativos de las funciones atribuidas a p21 en replicación normal y reparación por NER. **A)** p21 bloquea la replicación normal interfiriendo con el cargado de las polimerasas replicativas. **B)** p21 interfiere con el proceso de NER por bloqueo en el cargado de la polimerasa replicativa encargada de sintetizar la sección de ADN removida para reparar la lesión. En ambos casos esta evidencia resulta de experimentos in vitro, discrepando con los resultados obtenidos in vivo donde no se ve que altere ninguno de estos procesos.

### 3.4.2 Degradación de p21 en respuesta a ADN dañado: la excepción a la regla

Es universalmente aceptado que los niveles de p21 aumentan en respuesta al estrés genotóxicos, incluyendo por ejemplo a agentes como la irradiación  $\gamma$ , daunorubicina, entre otros(101). Este aumento en la expresión de p21 inhibe la activación de las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs), lo que genera un bloqueo en la proliferación celular. Esto responde a la necesidad de la célula de generar una ventana temporal en donde se lleve a cabo la reparación del ADN, para evitar la propagación de mutaciones, lo que generaría inestabilidad genómica, y así promover la supervivencia celular(114).

Datos sorprendentes, e inicialmente difíciles de comprender, fueron reportados durante los últimos años, por un gran número de grupos de investigación que reportan evidencia de excepciones a la inducción de p21 luego de la exposición a agentes genotóxicos tanto a nivel de RNAm como a nivel de proteína total (96, 106, 115-118). Esto es lo que ocurre en respuesta a la

irradiación con luz UV: los niveles de p21 bajan por debajo de los niveles basales y se tornan indetectables(106, 112, 117, 119-121). p21 no es inducido luego de UV, sino que, por el contrario, es activamente degradado(122)(Figura 3.10). Esta observación es conceptualmente importante no solo porque sugiere una obvia excepción al dogma de p21 como respuesta generalizada al estrés genotóxico, sino porque sugiere la existencia de nuevos mecanismos que regulan y son regulados por p21. De hecho, evidencias recientemente reportadas indican que la fracción de p21 asociada a PCNA es selectivamente degradado después de irradiación UV, mientras que otras proteínas que también se unen a PCNA no lo son. Dicho estudio demuestra que el sitio de unión a PCNA (PIP box) de p21 dirige a p21 a degradación gatillada por el complejo E3 ligasa CRL4<sup>CDT2</sup>, en respuesta a irradiación UV(123).



**Figura 3.10:** La excepción a la regla: degradación de p21 en respuesta a irradiación UV. **EL DOGMA** representa la concepción clásica de la inducción de p53 frente a la exposición a estrés genotóxico (rayos gamma, daunorubicina) promoviendo el aumento de su principal target transcripcional, p21, generando un arresto del ciclo celular. **LA EXCEPCIÓN**, representa la concepción más reciente de la respuesta celular frente a otros tipos de daño (UV, MMS, HU) que pueden o no activar a p53, pero sin acumulación de p21, sino por el contrario los niveles de p21 disminuyen por debajo de los niveles basales. Esta degradación podría ser funcional y es la pregunta que esta tesis intenta responder.Cuál es la función biológica de remover a p21 frente a la aparición de ADN dañado.

Para nosotros era intrigante evaluar porque los niveles basales de p21, los cuáles aparentemente carecen de funcionalidad (teniendo en cuenta que las polimerasas replicativas funcionan evidentemente bien en presencia de dichos niveles ya que las células proliferan con normalidad), deberían ser removidos en manera activa después de irradiación UV. Hipotetizamos que esto podría sugerir la existencia de un proceso inducido por la irradiación UV que es sensible a bajos niveles de p21. Este presupuesto me llevó a buscar identificar mecanismos biológicos que puedan estar favorecidos por la degradación selectiva de p21, los cuáles podrían estar asociados a la utilización de ADN lesionado como molde replicativo.

## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Cultivo celular

Este trabajo de tesis se realizó completamente con células humanas, tanto líneas celulares originadas de tumores, como líneas obtenidas por transformación viral o por introducción del gen de la telomerasa. En todos los casos, las células fueron mantenidas en cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, siempre a bajo número de pasaje y sometidas a chequeo frecuente para detección de micoplasma. Como medio de cultivo se utilizó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) alta glucosa (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Natocor), estreptomicina y penicilina (Sigma).

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

- ✓ **U2OS:** Es una línea celular originada de un osteosarcoma humano. Fue obtenida de ATCC (American Type Culture Collection), número de catálogo HTB-96. Es una línea es ampliamente utilizada en los campos de ciclo celular y reparación de ADN, incluso a pesar de su contenido cromosómico aberrante. Esto se debe a que mantiene activos la mayoría de los genes necesarios para el control del ciclo celular además de los mecanismos encargados de la reparación genómica. Por otro lado, las células presentan núcleos grandes y bien definidos lo que facilita la obtención de imágenes y análisis de la localización subcelular de proteínas nucleares mediante el uso de microscopía confocal.
- ✓ **HCT116:** Esta línea celular deriva de un carcinoma colorectal. Fue obtenida del laboratorio del Doctor B. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA). Tienen expresión de p53 normal. Presentan una mutación en el exón 13 del gen Ras. De esta línea se derivaron mediante recombinación homóloga líneas nulas (knock out) para diferentes genes, como es el caso de las HCT p21<sup>-/-</sup> descritas a continuación.
- ✓ **HCT116 p21<sup>-/-</sup> :** Esta línea celular derivada de la línea parental HCT116 fue generada en el laboratorio del Doctor B. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) mediante recombinación homóloga.

- ✓ **HeLa:** Esta línea celular deriva de un adenocarcinoma cervical humano de una mujer de 31 años de edad (Henrietta Lacks). Son ampliamente usadas en el campo, por su fácil crecimiento, y fácil manipulación.

## 4.2 Agentes genotóxicos

---

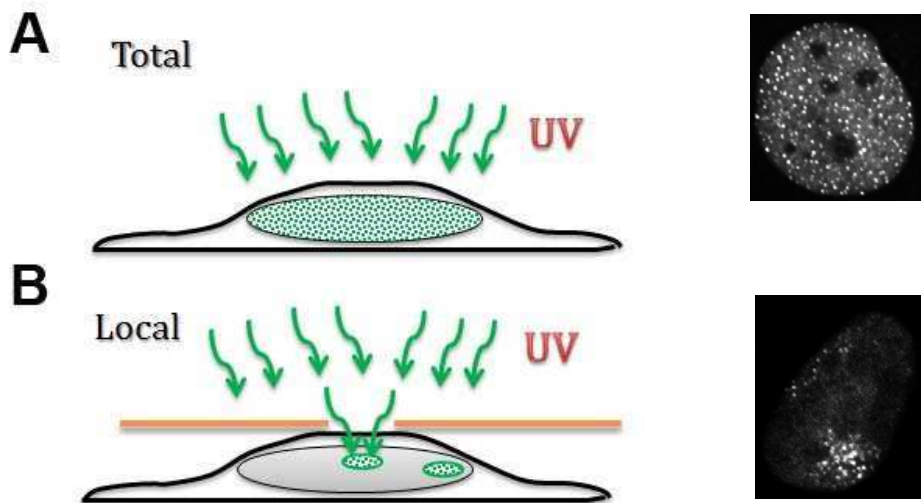
### ✓ **Radiación ultravioleta**

La radiación ultravioleta se define como la porción del espectro electromagnético comprendido entre los rayos X y la luz visible. El espectro UV se subdivide en Ultravioleta Extremo, hasta 200nm de longitud de onda y Ultravioleta Cercano, hasta 380 nm aproximadamente. A su vez, La radiación ultravioleta cercana se divide en UVA (320-380nm), UVB (280-320nm) y UVC (220-280 nm). La luz UV es altamente genotóxica siendo la radiación UVC, de mayor energía, la que posee más poder mutagénico. El tipo de lesión más frecuentemente provocada por la radiación ultravioleta sobre el ADN es la formación de dímeros entre pirimidinas adyacentes, las cuales, dependiendo del tipo de enlace covalente que se forme entre ambas bases, se denominan dímeros de pirimidinas en anillos de ciclo-butano (CPD, corresponden al 80% de las lesiones) o (6-4) pirimidina-pirimidona fotoproductos (6-4 PP, corresponden a casi la totalidad de las lesiones restantes), lesiones que ya fueron descritas en la introducción (ver Figura 2.3).

En los experimentos en lo que se indujo daño al ADN por luz UV, el protocolo fue realizado según lo descrito a continuación. Se tomaron las placas de cultivo y se removió el medio, luego se realizó un lavado con PBS el cual fue totalmente extraído y luego se procedió a la irradiación en una cámara de UV equipada con tubos de 254nm acoplada a un dosímetro (UVP CL-1000 Ultraviolet Crosslinker) o utilizando una lámpara de XX-15S UV de UVP. Luego se agregó medio de cultivo fresco suplementado con 10% SFB y las muestras se incubaron durante distintos tiempos de acuerdo al esquema experimental. Para las irradiaciones totales, se utilizaron dosis desde 3 a 50 J/m<sup>2</sup> de acuerdo a los distintos experimentos planteados (Figura 3.1 A), mientras que para las irradiaciones focales, se utilizaron filtros de policarbonato con múltiples poros de



5  $\mu\text{m}$  cada uno (Millipore # TMTP01300) utilizándose dosis mucho mayores. Estos filtros fueron colocados directamente en contacto con las células para luego ser irradiadas con dosis de  $120 \text{ J/m}^2$  (Figura 4.1 B), equivalente a mucho menor dosis ya que el filtro bloquea la mayor cantidad de UV dejando pasar solamente la luz UV en la zonas donde están los poros (124).



**Figura 4.1:** Distintos tipos de irradiación UV. **A)** Irradiación total, la célula es irradiada en toda su superficie luego de haberle removido el medio de cultivo y lavado con PBS. **B)** Irradiación local mediante el uso de filtros de polycarbonato con poros de  $5 \mu\text{m}$  distribuidos homogéneamente por donde pasan los rayos de luz UV como lo muestra el esquema. La célula es entonces irradiada localmente en zonas definidas y se pueden determinar estas zonas utilizando anticuerpos antidaño.

Para la irradiación local con filtro, se les remueve el medio a las células y se lavan con PBS 1X una vez, antes de retirar el PBS se coloca el filtro y se remueve el excedente de PBS tratando de que el filtro quede pegado exactamente a la superficie del cubreobjetos donde se encuentran las células. Luego se irradian con dosis altas de luz UV y se remueve el filtro incorporando medio fresco de cultivo de manera que el filtro se despegue lo más suavemente posible evitando que se despeguen las células del cubreobjeto.

### 4.3 Transfección

---

Los reactivos de transfección utilizados fueron Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y JetPrime (Polyplus Scientific) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

#### ✓ **Protocolo transfección y co-transfección de ADN plasmídico**

La mayoría de los experimentos se realizaron en placas de MW de 24 o MW 6. Por pocillo de MW de 24 se plaquean sobre cubreobjetos previamente esterilizados aproximadamente 50.000 células. A las 24 horas se transfectan con la concentración necesaria de el o los plásmidos, se cambia el medio a las 4-6 hs por medio fresco con 10% SFB y se incuban por 24 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se procesan las muestras de acuerdo al diseño experimental requerido. Para la detección de las proteínas transfectadas normalmente se utilizan plásmidos unidos a una proteína fluorescente GFP, GFP-PCNA o fGFP. Cualquiera de estos plásmidos se co-transfectan con los plásmidos de interés permitiendo una detección más rápida mediante la visualización de las células fluorescentes, teniendo en cuenta que el porcentaje de co-transfección (es decir que ingresen los dos plásmidos a la célula) es del 80% aproximadamente.

### 4.4 Plásmidos utilizados

---

En este trabajo de tesis se utilizaron o modificaron los siguientes vectores de expresión: p21, sp21<sup>ΔC</sup>, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> y p21<sup>ΔC</sup> (CS2-p21, CS2MT-p21(CDK-), CS2MT-p21(CDK-PCNA-) y CS2-p21(CDK-)) que fueron generados previamente en nuestro laboratorio(106, 107); GFP-Pol η y GFP-pol κ fueron gentilmente cedidos por el Dr. A. Lehmann (125) y GFP-pol ι y GFP-Rev1 fueron donados por el Dr. R. Woodgate y el Dr. Friedberg respectivamente. El plásmido codificante para GFP-PCNA fue provisto por la Dra. Cristina Cardoso (126, 127).

## 4.5 Mutagénesis dirigida

Para generar las mutaciones puntuales en los vectores de expresión de p21 sobre los dominios de unión a CDK y PCNA, los vectores fueron sometidos a una mutagénesis dirigida utilizando el kit de quick-site-change de stratagene, según las indicaciones de los fabricantes. Los primers utilizados para la mutagénesis dirigida fueron los siguientes:

- **Para la mutación sobre el sitio de unión a CDK**

Sentido: ctgcatccaggaggcccgtagcggaaggaactccgctttgtcaccga

Antisentido: tcggtgacaaaggcggagttccttcgctcacgggcctcctggatgcag

Esta mutación cambia los aminoácidos W49 a R, F51 a S y D52 a A, aboliendo la capacidad de este sitio de unirse a CDK.

- **Para la mutación sobre el sitio de unión a PCNA**

Sentido: cggcggcagaccagcgcgacagctgcctaccactcacaacgccggctg

Antisentido: cagccggcgtttggagtggtaggcagctgtcgcgctggtctgccgccg

Esta mutación cambia los aminoácidos M147 a A, D149 a A y F150 a A. Ambas mutaciones fueron descriptas previamente (125).

## 4.6 Análisis de proteínas

### 4.6.1 Preparación de extractos totales e inmunoprecipitación en fracción soluble

Los extractos totales fueron preparados por lisis directa de las células en buffer Laemmli (60mM Tris-HCL [pH: 6.8], 5% Glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT, 0.3 mM Azul de Bromofenol). Luego fueron desnaturalizados a 99°C durante 5 minutos y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de diferentes concentraciones de acuerdo al peso molecular de las proteínas analizadas y luego se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa, las cuales se utilizaron para el análisis mediante Western Blot.

Para determinar si las mutaciones puntuales realizadas a los vectores de expresión de p21 efectivamente abolían la interacción de p21/CDK2 y p21/PCNA se realizaron inmunoprecipitaciones en la fracción soluble, donde se encuentran normalmente los complejos de p21/CDKs (95). Los lisados fueron obtenidos utilizando los siguientes buffers: HEPES 25mM, 100mM NaCl, 10% glycerol, 2.5mM NaF, 1mM EDTA, Triton 0.5%, 0.5mM ortovanadato de Na, 1mM DTT 0.1mM PMSF e inhibidores de proteasas. Estos extractos fueron centrifugados y posteriormente sometidos a una inmunoprecipitación con dos anticuerpos anti-p21(C19-Santa Cruz y AB1-EMD Millipore). La diferencia de estos anticuerpos radica en el sitio de reconocimiento, el primero reconoce el C-terminal de la proteína de p21, por ende se une al sitio de unión de PCNA, mientras que el segundo reconoce la zona del N-terminal de la proteína donde se encuentra el sitio de unión a CDKs. Luego se realizaron los western blots con los anticuerpos detallados a continuación, para el revelado se utilizó la detección mediante ECL (Amersham GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones de fábrica.

**Anticuerpos primarios utilizados para los western blots:**

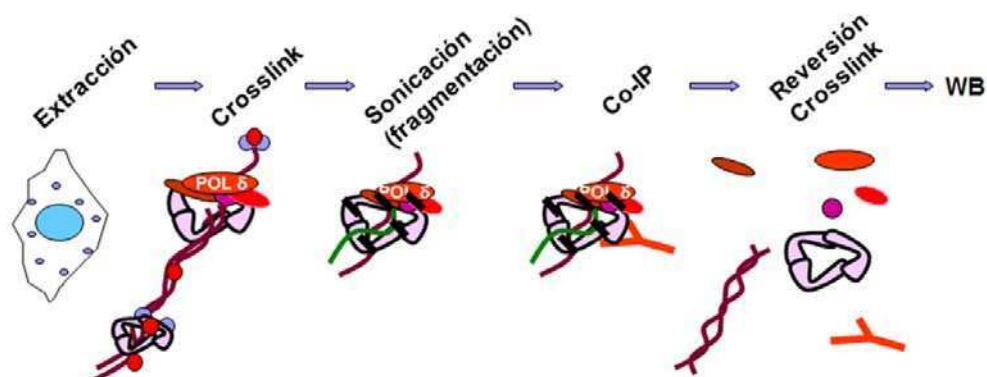
- Anti-p21 (C-19): anticuerpo monoclonal hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-PCNA (PC-10): Anticuerpo monoclonal hecho en ratón (nro. de catálogo: sc-56, Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-CDK2: Santa Cruz Biotechnology
- Anti-p21 (AB1): anticuerpo monoclonal hecho en ratón (Nro. de catálogo OP64-100UG, EMD Millipore)
- Anti-Pol  $\eta$  (H-300): Anticuerpo policlonal hecho en conejo (nro. de catálogo: sc-5592, SantaCruz Biotechnology).
- Anti-Actina: Anticuerpo policlonal hecho en conejo (nro. de catálogo: A 2066, Sigma-Aldrich).
- Anti-Ku70: Anticuerpo monoclonal hecho en conejo (nro. De catálogo sc-5309, Santa Cruz Biotechnology)

**Anticuerpos secundarios utilizados:**

- Anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (nro. de catálogo: A 4416, Sigma-Aldrich).
- Anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (nro. de catálogo: A 6154, Sigma-Aldrich).
- Anti IgG de cabra conjugado a peroxidasa (nro. de catálogo: A 5420, Sigma-Aldrich)

*4.6.2 Inmunoprecipitación cromatinica*

Este protocolo fue desarrollado con la finalidad de inmunoprecipitar proteínas que interaccionan o que están en estrecha proximidad dentro del entorno de un fragmento cromatínico. La lógica subyacente a este protocolo consiste en que previamente a la inmunoprecipitación, se realiza un entrecruzamiento entre las proteínas y el ADN mediante tratamiento con formol, seguido de un paso de fragmentación energética del ADN. Luego con un anticuerpo específico que precipita la proteína de interés que estará acoplada a un fragmento de ADN y a las demás proteínas con las que se encontraba interaccionando o que estaban en estrecha proximidad al momento del entrecruzamiento. Luego se revierte el entrecruzamiento y, mediante Western Blot, se puede determinar qué grupo de proteínas (y en qué estequiometría) formaba parte de los complejos cromatínicos en los experimentos realizados (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Esquema del protocolo de inmunoprecipitación cromatinica. Se observa como el entrecruzamiento producido por formol 1% (crosslink) mantiene unidas a las proteínas y el ADN. La sonicación promueve la ruptura del ADN en pequeños fragmentos. Estos son inmunoprecipitados con el anticuerpo de interés de manera tal que las proteínas que se encuentren muy cercanas en la cromatina co-inmunoprecipiten. Luego se revierte el entrecruzamiento y se analizan las muestras por Western Blot.

Este protocolo ha sido adaptado a partir del ensayo de Bi et al (128). Brevemente, células U2OS previamente transfectadas son irradiadas con 40 J/m<sup>2</sup> e incubadas durante 1-2 horas. Luego, se realiza una extracción inicial suave con buffer CSK (250 mM sacarosa, 25 mM KCl, 10 mM HEPES [pH 8.0], 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) en hielo durante 12 minutos. Inmediatamente, se realiza el entrecruzamiento con una solución de formol 1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se interrumpe la reacción de entrecruzamiento con el agregado de Glicina durante 5 minutos en hielo. Luego de un lavado con abundante PBS, se lisan las células con buffer IP (10 mM Tris-HCL [pH 7.5], 25 mM FNa, 20 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato de Sodio. 0.1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados son sometidos a sonicación y posteriormente, clarificados por centrifugación a 13.000rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se somete a inmunoprecipitación durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti PCNA (PC-10 AC, SantaCruz Biotechnology). Al día siguiente, se lavan las muestras, se agrega buffer Laemli y se realiza la reversión del entrecruzamiento durante 30 minutos a 99°C. Luego se corren los extractos en SDS PAGE y se revelan las proteínas de interés mediante Western Blot.

## *4.7 Análisis del ciclo celular*

---

### *4.7.1 Citometría de flujo*

Para realizar el análisis de los perfiles del ciclo celular por contenido de ADN en poblaciones celulares, se utilizó el análisis por citometría de flujo. Esta técnica permite analizar detalladamente el perfil de ciclo de una población celular mediante la determinación de la cantidad relativa de ADN que se tiñe con el colorante intercalante de ADN yoduro de propidio. Este colorante se une estequiometricamente a la cantidad de ADN presente en cada etapa del ciclo celular, teniendo una cantidad relativa a 2n en la fase G1 y 4n en la fase G2/M, mientras que durante la fase S la cantidad de ADN va aumentando de 2n a 4n a medida que éste se duplica. Es esta característica lo que nos permite diferenciar las distintas etapas del ciclo celular y evidenciar cualquier alteración del mismo.

Las células fueron sometidas a tripsinización, recuperadas de las placas de cultivo y fijadas en tubos falcon de 15 ml sobre vortex mediante agregado gradual de etanol absoluto a -20°C. Luego las células se centrifugaron, se descartó el etanol y se resuspendieron en PBS conteniendo RNasa I (50mg/ml) y Yoduro de Propidio (PI) (25mg/ml, Sigma). En el caso de la detección de células transfectadas el análisis se hizo a dos colores utilizando la fluorescencia de la etiqueta GFP y sobre ésta población se midió el contenido de ADN, seleccionando las células positivas para ambas fluorescencias (verdes (GFP)+ rojas (IP)). El contenido de ADN por célula se determinó mediante un Citometro de flujo FACScalibur de Becton Dickinson con posterior análisis mediante el programa Summit software (DAKO Cytomation) y los perfiles de ciclo celular fueron graficados utilizando el programa FlowJo (Tree Star Inc.).

#### *4.7.2 Incorporación de análogos de bases*

Una alternativa a la citometría de flujo para estudiar el perfil de ciclo celular de una población celular, es la incorporación de análogos de bases, más conocidos como análogos de timina como la bromodeoxiuridina (BrdU-SIGMA) y el ethynyl-deoxiuridina (EdU-Invitrogen). Ambos análogos se incorporan al ADN cuando este se replica. Esta técnica, si bien resulta menos informativa que la citometria de flujo, permite determinar con alta certeza las células que se encuentran dentro y fuera de la fase S. El uso de microscopia para determinar las células dentro y fuera de la fase S, permite además discriminar entre los diferentes fenotipos que la célula adopta a medida que transita por la fase replicativa. Para el estudio, las células fueron incubadas con estos análogos en una concentración 10µM, en un rango de 5 a 15 minutos, dependiendo el experimento a realizar, previo al paso de fijación. En este caso es importante destacar el paso de desnaturalización que permite exponer los epitopes de los análogos para su posterior detección por inmunohistoquímica. La desnaturalización se realizó en HCL 1.5N durante 4 minutos, y luego se prosiguió con el protocolo de inmunohistoquímica que se detallara en la sección siguiente. La detección de BrdU se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Amersham BU-1). En el caso del EdU, la diferencia es que este análogo, dada las características con las que fue manufacturado, no requiere de un paso de desnaturalización previa, ya que la detección se realiza a través de una reacción química por lo que su

detección es más sencilla y se evita el paso de desnaturalización (Click-iT®Edu kit#C10338).

#### *4.7.3 Índice de proliferación por bloqueo de citocinesis*

El ensayo CBPI (del inglés Cytokinesis block proliferation index), permite determinar el tiempo que una célula tarda en dividirse, cuantificando la cantidad de células que llegaron a dividir su núcleo frente a las que no. El protocolo es el siguiente: las células se transfectan, como ya se detalló en secciones anteriores, y a las 24hs se replaquean a baja densidad y posteriormente son irradiadas. Luego de 6 horas de haber sido irradiadas se les coloca en el medio una droga, citocalasina B (Cyto B SIGMA) en una concentración de 6µg/ml. Esta droga bloquea la polimerización de los filamentos de actina por lo que impide que se divida la membrana plasmática, pero si permite la división nuclear, es decir bloquea la citocinesis pero no la cariocinesis. De esta manera lo que se obtiene son células binucleadas dentro de una misma membrana plasmática, si estas llegaron a dividir el material nuclear, o de lo contrario células mononucleadas si no pudieron dividir el núcleo. 24 horas más tarde las células son fijadas con PFA/sacarosa 2% y sometidas a la detección por inmunomarcación de las membranas plasmáticas mediante el uso de faloidina conjugada a Alexa 547 (Invitrogen) y tinción nuclear con DAPI. Posteriormente se realiza el análisis mediante microscopía de fluorescencia y se determina sobre la población transfectada (en este caso se utilizó GFP-PCNA como marcador de transfección) la cantidad de células binucleadas. Esta cuantificación indica que porcentaje de las células transfectadas, en el tiempo transcurrido del análisis, pudieron llegar a dividir su material genético y posteriormente dividir el núcleo.

#### *4.8 Inmunomarcación y análisis de proteínas por microscopía*

---

Una parte importante de este trabajo de tesis está basado en experimentos de localización de proteínas dentro del núcleo celular. Si bien algunas de las proteínas estudiadas poseen fluorescencia propia debido a que se encuentran



fusionadas a una etiqueta de GFP (fluorescente), la detección de proteínas endógenas se logró mediante inmunomarcación o inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

#### *4.8.1 Reclutamiento de polimerasas de TLS a zonas de ADN dañado*

El análisis del reclutamiento de polimerasas a estructuras focales (foci) asociadas a daño genómico, se considera un marcador molecular de TLS. Para su estudio se utilizaron polimerasas de TLS fusionadas a GFP, GFP-Pol  $\eta$ , GFP-Pol  $\iota$ , GFP-Pol  $\kappa$  y GFP-Rev1 el protocolo utilizado fue descrito previamente por Soria et al (Soria G, Speroni J, Podhajcer OL, Prives C, & Gottifredi V (2008)). Brevemente, se plaquean 4,5-5,5 x 10<sup>4</sup> células en cubreobjetos redondos de 10 mm de diámetro dentro de pocillos individuales en placas multipocillo de 24. Una vez aquí, las células son transfectadas, irradiadas o sometidas al tratamiento de interés. Luego, las células son fijadas con PFA2% sacarosa2% durante 20 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con 0.1% Triton X-100 en PBS durante 15 minutos a 4°C. Luego de lavar varias veces con PBS, se tiñen los núcleos con Hoescht 33258 (1 $\mu$ g/ml, Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se montan los cubreobjetos con Mowiol-488(Calbiochem).

#### *4.8.2 Inmunohistoquímica*

El protocolo general se repite para el análisis de proteínas fluorescentes, se plaquean las células en cubreobjetos de 10mm dentro de pocillos individuales en placas de multipocillos de 24. Una vez adheridas las células pueden ser transfectadas o sometidas a irradiación UV o al tratamiento de interés. Las células son fijadas dentro de los pocillos con PFA/Sacarosa 2% por 15 minutos o con metanol absoluto por 20 minutos a -20°C seguido de un paso de extracción rápida con acetona fría por 30 segundos a temperatura ambiente. Luego de la fijación, ya sea por PFA/sacarosa o metanol/acetona, se realiza un paso de permeabilización con 0.1%Triton X-100 en PBS durante 15 minutos y luego se procede al bloqueo con suero de burro 2.5% a 4°C durante toda la noche. La incubación con el anticuerpo primario que detecta la proteína de interés se realiza colocando el cubreobjetos invertido sobre 25  $\mu$ l de la dilución del anticuerpo sobre un retazo de

parafilm. Luego de una hora de incubación con el anticuerpo primario se realizan 2 lavados con PBS tween 0.05% de 15 minutos cada uno, este paso se realiza volviendo a colocar el cubreobjetos dentro del pocillo. La incubación con los anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluoróforos se realiza de la misma manera que el anticuerpo primario, sobre un retazo de parafilm. Luego de una hora de incubación se procede a lavar nuevamente los vidrios con PBS tween 0.05%. Como último paso se tiñe el núcleo con Hoechst No33258 (SIGMA) durante 15 minutos en PBS tween 0.05%, y se procede al montaje de los vidrios sobre un portaobjetos, mediante el uso de Mowiol-488(Calbiochem). En el caso de los anticuerpos que detectan antígenos en cadena simple de ADN (como BrdU y CPD) previo a la incubación con anticuerpo primario se realiza un paso de desnaturalización de la doble hebra mediante un tratamiento con HCL 1.5N durante 4 minutos para BrdU y NaOH 0.07M también por 4 minutos para CPD.

Los anticuerpos primarios utilizados para las inmunohitoquímicas fueron: anti-BrdU (Amersham BU-1), anti-p21 AB1(Oncogene Research Products), Anti-p21 C19( Santa Cruz), Anti- $\gamma$ H2AX (Upstate), Anti-53BP1 (Santa Cruz) y anti-CPD o dimeros de pirimidinas en anillos de ciclobutano (MBL international corporation). Los anticuerpos secundarios fueron: anti raton y conejo conjugados a Cy2 y Cy3 (Jackson Inmuno Reasearch) y anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Invitrogen).

#### *4.8.3 Cuantificación de $\gamma$ H2AX*

Para medir la intensidad promedio de  $\gamma$ H2AX en una muestra, se tomaron fotografías de distintos campos de manera aleatoria, siendo estos campos positivos para  $\gamma$ H2AX, p21 y DAPI, con un microscopio confocal Zeiss Axioplan. Las imágenes fueron obtenidas siempre manteniendo el mismo tiempo de exposición, los mismos parámetros y fueron procesadas de la misma manera dentro de cada experimento. Esto permite la comparación entre cada situación experimental, ya que las intensidades, que es lo que se intenta cuantificar, pueden variar con los distintos tratamientos, pudiendo perderse esta información si se alteran los parámetros de obtención de imágenes. Luego de la obtención de imágenes, estas son procesadas de igual manera utilizando el programa Image J. La determinación de intensidad de  $\gamma$ H2AX ya sea focal o panuclear, se realiza sobre los núcleos

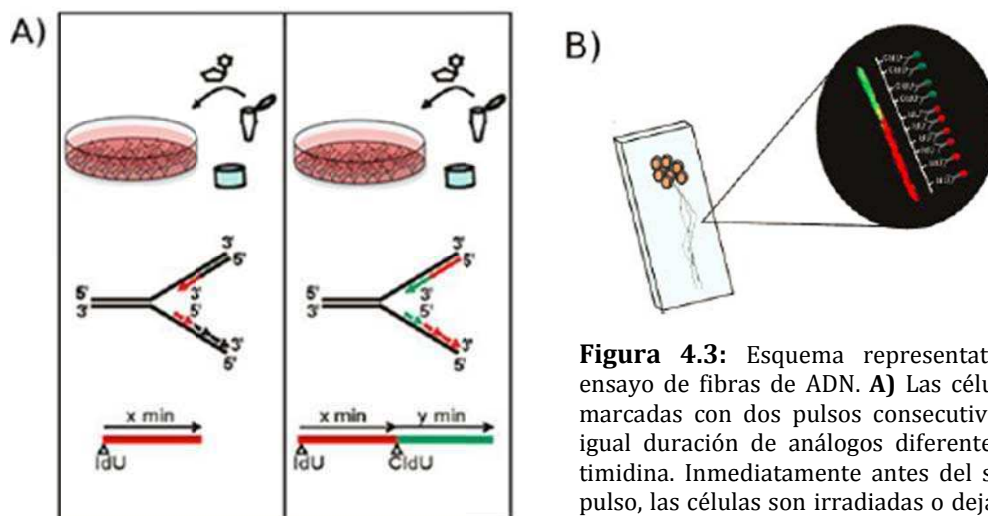
positivos para p21, es decir la población transfectada, utilizando la herramienta “messure tool” del programa Image J, calculándose el promedio de intensidad.

#### *4.8.4 Estirado e inmunotinción de fibras de ADN*

Este protocolo ha sido adaptado a partir del publicado por de Haro et al (129). Brevemente, se plaquean  $1,8 \times 10^5$  células U2OS en placas de 35 mm. Al día siguiente son transfectadas con siRNA o siRNA/Plásmido y luego de 48 horas se comienza con el procesamiento. Las células en estado de crecimiento exponencial son marcadas con un pulso de 20  $\mu\text{M}$  de clorodeoxiuridina (CldU) durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavan las células 2 veces con PBS y se irradian las placas con 20  $\text{J}/\text{m}^2$  de UVC o son dejadas sin tratar. Luego se realiza un pulso con 200  $\mu\text{M}$  de iododeoxiuridina (IdU) durante 20 minutos. Posteriormente las células son tripsinizadas, lavadas con PBS y resuspendidas a concentración final de 1250 cel/  $\mu\text{l}$ . Para obtener el ADN las células son lisadas sobre un portaobjetos limpio y desengrasado con un buffer compuesto por 0.5% SDS, 200mM Tris-HCL (pH 7.4) and 50mM EDTA durante 5 minutos. Luego se procede con el estiramiento de las fibras de ADN obtenidas mediante la inclinación de los portaobjetos a 45° de manera que la gota de ADN corriera lentamente hacia el extremo opuesto del vidrio (Figura 4.3). Luego de 10 minutos de secado a temperatura ambiente, las muestras se fijan en una solución de Metanol/ Ácido acético 3:1 durante 5 minutos y los portaobjetos se almacenan a 4°C en Etanol 70% hasta el momento de la inmunotinción.

Con el fin de realizar la inmunomarcación, las fibras de ADN son desnaturalizadas en HCL 2,5 N durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavan los portaobjetos con PBS y se realiza un bloqueo en PBS 5% BSA (Bovine Serum Albumin) por 15 minutos a 37°C. Luego se incuban los portaobjetos de manera secuencial con los siguientes anticuerpos: anti-BrdU hecho en ratón (nro. de catálogo: 347580, Becton Dickinson), detecta IdU; anticuerpo secundario anti IgG de ratón combinado con Cy<sup>TM</sup> 3 (nro. de catálogo: 715-165-150, Jackson ImmunoResearch); anti-BrdU hecho en rata (nro. de catálogo: OBT0030, Accurate Chemicals), detecta CldU; anticuerpo secundario anti IgG de rata combinado a Alexa-488 (nro. de catálogo: A 21208, Molecular Probes, Invitrogen). Como medio

de montaje se utiliza Mowiol 488 (Calbiochem). Luego se obtienen imágenes con un microscopio confocal Zeiss Axioplan y las fibras de ADN son analizadas con el software LSM Image Browser.



tripsinizan y son lisadas sobre un portaobjetos, el cual es inclinado a 45° aproximadamente para permitir el estiramiento de las moléculas de ADN.

#### 4.8.5 Microscopia de fluorescencia y confocal

Para la obtención de imágenes en color y la cuantificación de células positivas para ciertas proteínas por inmunomarcación, se utilizó un microscopio de fluorescencia Axio Imager A2 de Zeiss, con una cámara acoplada AxioCam MRc5. El posterior análisis de las imágenes se realizó con el programa de distribución libre Image J.

Por otro lado para el análisis de proteínas de mayor dificultad de detección y con una necesidad de definición mayor, se utilizó microscopia confocal. Para esto se utilizó el microscopio frontal confocal LSM Axioplan Pascal o Zeiss. Para la excitación de los fluoróforos verdes como GFP, Cy2 y FitC, se utilizaron láseres de argón con pico de emisión a 488nm. Para la excitación de fluoróforos rojos como Cy3, se utilizaron láseres de helio/neón con picos de emisión a 543nm. Las imágenes fueron obtenidas normalmente a una resolución de 1024 x 1024 píxeles o mayor con una profundidad de 8 bits. El análisis general y la edición de las imágenes se realizó con el programa incorporado a la plataforma de Zeiss, llamado "LSM Image Browser".

## *4.9 Determinación de viabilidad e inestabilidad genómica*

---

### *4.9.1 Viabilidad celular y ensayo de formación de colonias*

Para evaluar la sobrevivencia celular, células U2OS fueron transfectadas con los plásmidos de interés y a las 24 horas replaqueadas a baja densidad. Una vez adheridas las células al cubreobjetos (24hs) las células fueron irradiadas con bajas dosis de UV y 72hs más tarde fueron fijadas con PFA/sacarosa 2%. La cuantificación se realizó con un microscopio de fluorescencia y se determinó sobre la población transfectada (en este caso se utilizó fGFP como marcador de transfección) la viabilidad de las células de acuerdo a su estructura nuclear. Determinando como viables aquellas células cuyo núcleo estaba intacto y mantenía una estructura normal, y no viables a aquellas células cuyo núcleo había perdido integridad y estructura, siendo estas características de fácil detección. La cuantificación se realizó sobre 300 núcleos transfectados en tres experimentos independientes.

Para el ensayo de formación de colonias células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos de interés y replaqueadas a baja densidad (250 células por placa) a placas de 60mm en duplicados. Al día siguiente las células fueron irradiadas a bajas dosis de UV e incubadas por 8 a 10 días en incubadora manteniendo las condiciones fisiológicas para permitir la formación de colonias. Este ensayo es más informativo que el anterior ya que permite también analizar la capacidad proliferativa de la célula, ya que aquellas que puedan formar una colonia visible al final del experimento son aquellas que no perdieron capacidad proliferativa, mientras que las que no pueden estar arrestadas o no sobrevivir luego del tratamiento con UV. Una vez pasados los 10 días se fijan las colonias con cristal-violeta, un compuesto que tiñe las colonias y las fija para su fácil cuantificación. Se cuantifican las colonias de 50 células o más en cada condición por duplicado.

#### *4.9.2 Análisis de formación de micronúcleos (MN)*

La base de este análisis es determinar la formación de MN, una medida de inestabilidad genómica, frecuentemente asociada a la pérdida de fragmentos de ADN e inclusive de cromosomas enteros, normalmente por fallas en los mecanismos de reparación del ADN. El protocolo es el siguiente: las células son trasfectadas en pocillos de 12, replaqueadas a baja densidad en pocillos de 24 sobre cubreobjetos e irradiadas 24hs mas tarde. 24hs después de la irradiación se coloca Cyto B, que como se introdujo anteriormente genera células binucleadas dentro de una misma membrana plasmática. El uso de esta droga permite un análisis más preciso de la formación de micronucleos ya que estos van a estar rodeados por la membrana plasmática adyacentes a los núcleos que le dieron origen. 40 horas después de haber incorporado la Cyto B las células, primero son tratadas con una solución hipotónica KCl 0.0075M (SIGMA) para permitir la expansión de las células, por aproximadamente 1 minuto, luego se fijan con PFA/sacarosa 2%. En estos experimentos se utilizó tanto GFP-PCNA como fGFP como marcador de transfección, siempre obteniendo los mismos resultados y DAPI para teñir los núcleos. Para la detección de MN formados en células en replicación activa luego de la irradiación, se incorporó EdU inmediatamente después de la exposición a luz UV durante 1 hora, y luego se prosiguió con el mismo protocolo. La detección de EdU se realizó luego de la fijación siguiendo los pasos detallados por los fabricantes (Click-iT®EdU kit (C10338 Invitrogen). Se determinó la frecuencia de MN sobre la población transflectada y sobre la población transflectada en replicación activa respectivamente, en 3 experimentos independientes.

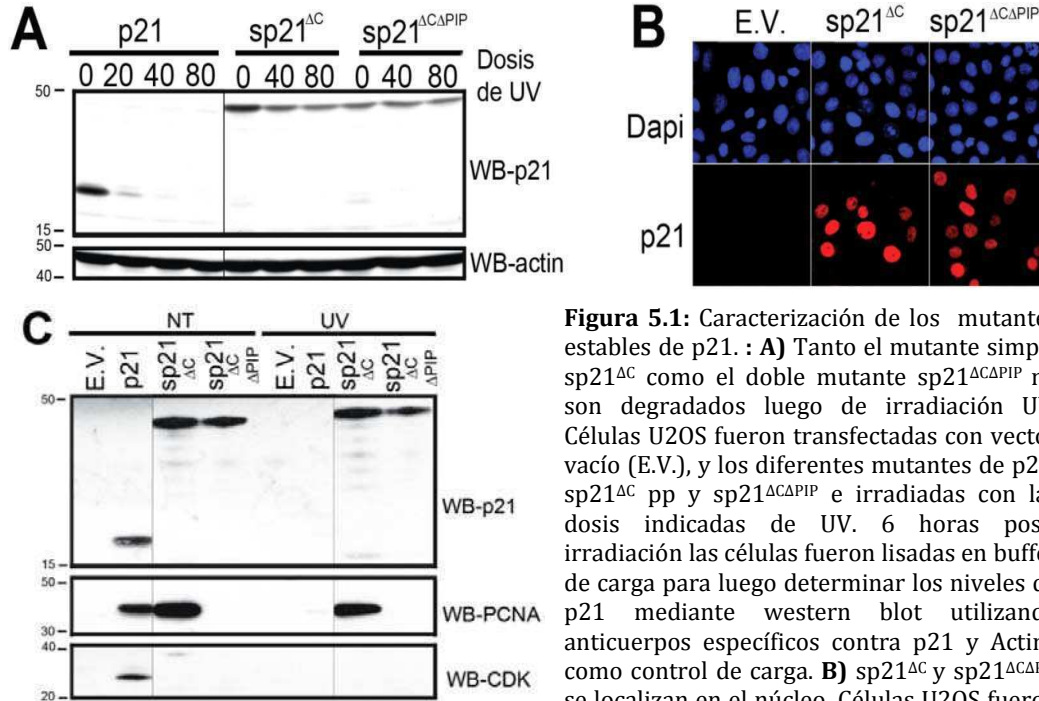
## 5 Resultados

### *5.1 Estabilización de p21 como herramienta de trabajo*

La degradación de p21 luego de irradiación UV ya fue reportada anteriormente por nuestro grupo de trabajo y por otros(114) Como discutido en la sección previa este resultado es sorprendente ya que, en general, se espera que los niveles de p21 aumenten después de un estímulo genotóxico. Además los valores basales de p21 en ausencia de estrés son considerados residuales y sin función identificada, por lo que un “esfuerzo” celular por llevar los niveles de expresión a un valor menor que el residual era injustificable, al menos considerando las funciones biológicas aceptadas hasta la fecha. Sabiendo que ningún “esfuerzo” celular carece de sentido y en general se asocia a la activación de funciones relevantes para el funcionamiento celular, nos pareció relevante establecer el valor biológico de la regulación negativa de p21 después de irradiación UV. Perseguimos por lo tanto la hipótesis que p21 se degrada para liberar un proceso activado durante la respuesta celular al UV. Supusimos que la utilización de un p21 no degradable serviría para bloquear persistentemente el proceso en cuestión lo que facilitaría su identificación. Para esto utilizamos las construcciones de p21 fusionadas a la etiqueta de 6 epítopes de Myc en la región N-terminal de la proteína. Como se detalló en la sección de materiales y métodos, esta etiqueta impide su degradación a través del bloqueo de la ubiquitilación de p21(113, 130). Además las evidencias discutidas en la introducción sugerían que el proceso en cuestión es el de TLS, el cual tiene lugar específicamente en fase replicativa (fase S). Dado que la estabilización constitutiva de p21 generaría un arresto del ciclo celular en la fase G1 inhibiendo la formación de los complejos Cyclinas/CDKs (95)se inhibió dicha capacidad mediante la generación de mutaciones puntuales que rompen la interacción p21/CDK. Dichas mutaciones fueron extensa y previamente caracterizadas (Gulbis et al) y están descriptas en detalle en la sección de Materiales y Métodos)

### 5.1.1 Caracterización de las construcciones estables de p21

En primer lugar se caracterizó el mutante estable de p21 generado, de aquí en adelante llamado sp21<sup>ΔC</sup>. A diferencia de p21, el mutante sp21<sup>ΔC</sup> demostró una alta resistencia a la degradación inducida por irradiación UV (Figura 5.1A). Por otro lado, debido a que p21 localiza en s= stable y ΔC= sin capacidad de unión a CDKs el núcleo, se evaluó si el mutante sp21<sup>ΔC</sup> mantiene la capacidad de acumularse en el núcleo (Figura 5.1B) observando una localización similar al p21 silvestre (p21wt). Además se corroboró que no se uniera a CDK2 (Figura 5.1C) evaluándose en paralelo su efecto sobre el ciclo celular. Se observó que a pesar de su marcada estabilidad sp21<sup>ΔC</sup> no afecta la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular ni el número de células transitando la fase S (Figura 5.2 A, B y C). Como la estabilización de p21 (sp21) causa la acumulación en la fase G1 del ciclo celular (106) estos datos sugieren que la disrupción de la interacción de p21 con CDKs es suficiente para evitar el bloqueo del ciclo celular dependiente de p21.



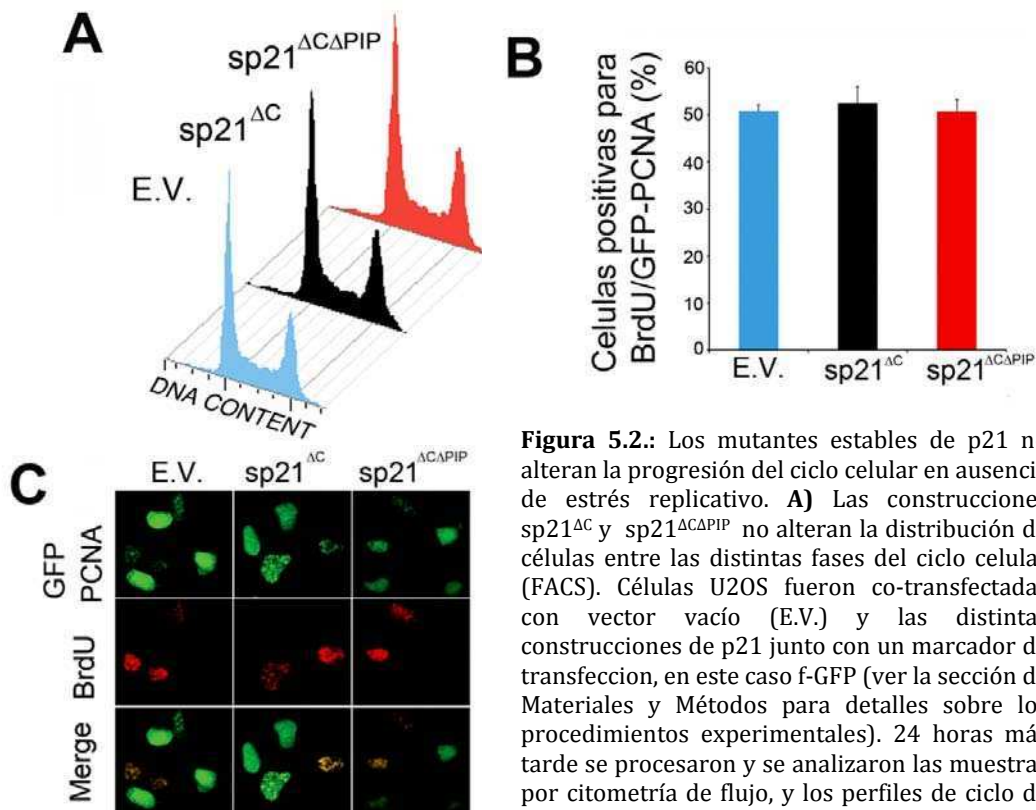
**Figura 5.1:** Caracterización de los mutantes estables de p21. : **A)** Tanto el mutante simple sp21<sup>ΔC</sup> como el doble mutante sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> no son degradados luego de irradiación UV. Células U2OS fueron transfectadas con vector vacío (E.V.), y los diferentes mutantes de p21, sp21<sup>ΔC</sup> pp y sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> e irradiadas con las dosis indicadas de UV. 6 horas post-irradiación las células fueron lisadas en buffer de carga para luego determinar los niveles de p21 mediante western blot utilizando anticuerpos específicos contra p21 y Actina como control de carga. **B)** sp21<sup>ΔC</sup> y sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> se localizan en el núcleo. Células U2OS fueron

transfectadas con las construcciones de p21 indicadas y 24hs más tarde fijadas con PFA. La detección de las variantes de p21 por inmunofluorescencia, se realizó utilizando anticuerpos específicos para p21, visualizando núcleos mediante tinción con Hoesht. **C)** La construcción sp21<sup>ΔC</sup> no se une a CDK, mientras que el doble mutante sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> no se une ni a CDK ni a PCNA. Células U2OS fueron transfectadas como en A), irradiadas con UV (40 J/m<sup>2</sup>) y levantadas 6 horas más tarde



en un buffer de baja astringencia (el protocolo se encuentra detallado en la sección de MyM). Los complejos PCNA/p21 y CDK/p21 se inmunoprecipitaron utilizando anticuerpos para p21 (C-19 Santa Cruz Biotechnology).

También se generó un mutante doble, de ahora en más llamado  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ , que no puede unirse a PCNA a través del PIP box (PCNA Interacting Protein) ni tampoco a los complejos CDK ( $s$ = stable,  $\Delta C$ = sin capacidad de unión a CDKs y  $\Delta PIP$ = sin capacidad de unirse a PCNA). Esto se logró mediante mutaciones puntuales en este PIP box que ya fueron descriptas previamente(106, 131) en adición a las mutaciones previas en el sitio de unión a CDK. Como era de esperar el doble mutante generado,  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ , también fue estable (Figura 5.1A), se localizó en el núcleo (Figura 5.1B) y perdió la capacidad de unirse a CDK2 y a PCNA (Figura 5.1C). Además la disrupción de la interacción entre p21 y PCNA no altera la progresión del ciclo celular en ensayos de citometría de flujo (Figura 5.2 A) ni el porcentaje de células en replicación activa, medido por la incorporación de un análogo de timina, BrdU, que se incorpora a medida que la célula duplica su ADN. (Figura 5.2 By C).



**Figura 5.2.:** Los mutantes estables de p21 no alteran la progresión del ciclo celular en ausencia de estrés replicativo. **A)** Las construcciones  $sp21^{\Delta C}$  y  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$  no alteran la distribución de células entre las distintas fases del ciclo celular (FACS). Células U2OS fueron co-transfectadas con vector vacío (E.V.) y las distintas construcciones de p21 junto con un marcador de transfección, en este caso f-GFP (ver la sección de Materiales y Métodos para detalles sobre los procedimientos experimentales). 24 horas más tarde se procesaron y se analizaron las muestras por citometría de flujo, y los perfiles de ciclo de la población transfectada. La población transfectada (células positivas para f-GFP) se seleccionó utilizando el programa Cell Quest Pro de BD. Las construcciones  $sp21^{\Delta C}$  y  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$  no

alteran la progresión de la fase S. Resultados similares fueron obtenidos utilizando GFP-PCNA como marcador de transfección. **B)** Celulas U2OS fueron transfectadas como en A) pero en este caso se utilizó a GFP-PCNA como marcador de transfección. 24hs más tarde se realizó una incorporación con BrdU de 15 minutos previo a la fijación con Metanol-Acetona (ver sección de Materiales y Métodos). La proporción de células positivas para BrdU sobre la población transfectada se cuantificó en 200 núcleos para 3 experimentos independientes. Resultados similares se obtuvieron utilizando f-GFP como marcador de transfección **C)** Imágenes representativas del experimento realizado en **B)**.

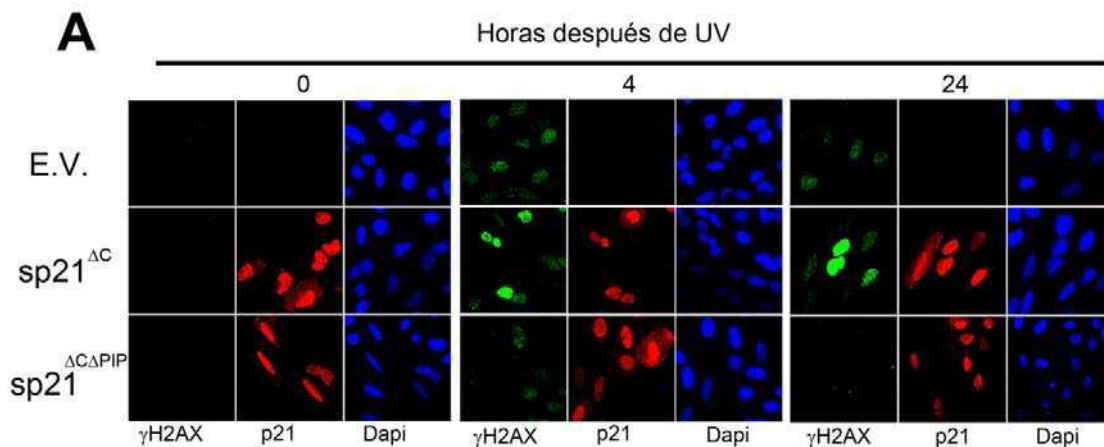
*Estos resultados indican que la estabilización de p21 y las mutaciones incorporadas en esta construcción, no alteran la distribución normal de p21 y más importante aún no alteran la progresión del ciclo celular ni la transición por fase S en ausencia de estrés.*

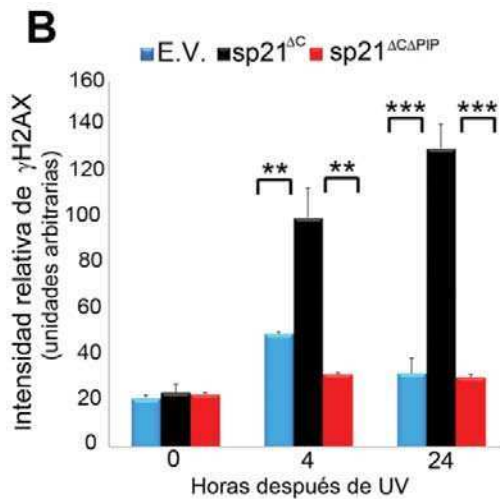
## *5.2 La estabilización de p21 luego de irradiación UV induce un aumento en marcadores de estrés replicativos*

Muchos de los agentes genotóxicos que aumentan los niveles de p21 como la irradiación gamma también inducen una salida del ciclo celular, promoviendo el bloqueo de células en fases no replicativas (G1 o G2/M). Por el otro lado la irradiación UV causa la reducción en los niveles de p21 (asociados a un incremento en su proteólisis (106, 132) y no altera fuertemente el ciclo celular (Figura 5.2A) por lo que razonamos que la degradación de p21 podría estar relacionada con la necesidad de mantenimiento de procesos de replicación activa después de la irradiación UV. Para evaluar este presupuesto decidimos monitorear como primera medida el efecto de la estabilización de p21 sobre la acumulación de marcadores de estrés replicativo en respuesta a la irradiación UV. Los marcadores seleccionados para este análisis son ampliamente aceptados como marcadores de la inducción de estrés replicativo (133). El primero es la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) que tiene lugar en zonas del ADN cercanas a lesiones (75, 134) y el segundo es la organización de la proteína 53BP1 en agregados (focos) nucleares asociados a cortes de la doble hélice (87).

### 5.2.1 La estabilización de p21 incrementa la fosforilación de H2AX

La fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) fue asociada directamente con estrés replicativo, ya que aumenta con el colapso de horquillas replicativas o modificaciones estructurales en la cromatina y también cuando las horquillas colapsadas desencadena la aparición de cortes en la doble cadena (CDC), (81, 133); La fosforilación de H2AX puede monitorearse por técnicas de Western blot y por inmunofluorescencia siendo este último análisis más rico porque permite evaluar si el incremento de  $\gamma$ H2AX es focal (indicador de corte en la doble cadena) o pan nuclear (indicando estrés replicativo global) (81). Por esto, para el análisis decidimos medir la intensidad de este marcador a través de inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra la forma modificada de H2AX,  $\gamma$ H2AX, sobre la población de células transfectadas (en sección de Materiales y Métodos se reporta un protocolo detallado de los procedimientos de obtención de imágenes y posterior análisis de intensidad). Los resultados evidenciaron que la expresión del mutante  $sp21^{\Delta C}$  pero no el  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ , generó un gran aumento en la intensidad relativa de  $\gamma$ H2AX luego de irradiación UV (Figura 5.3 A y B- nótese un aumento en la intensidad panuclear de  $\gamma$ H2AX en los paneles de  $sp21^{\Delta C}$ ).



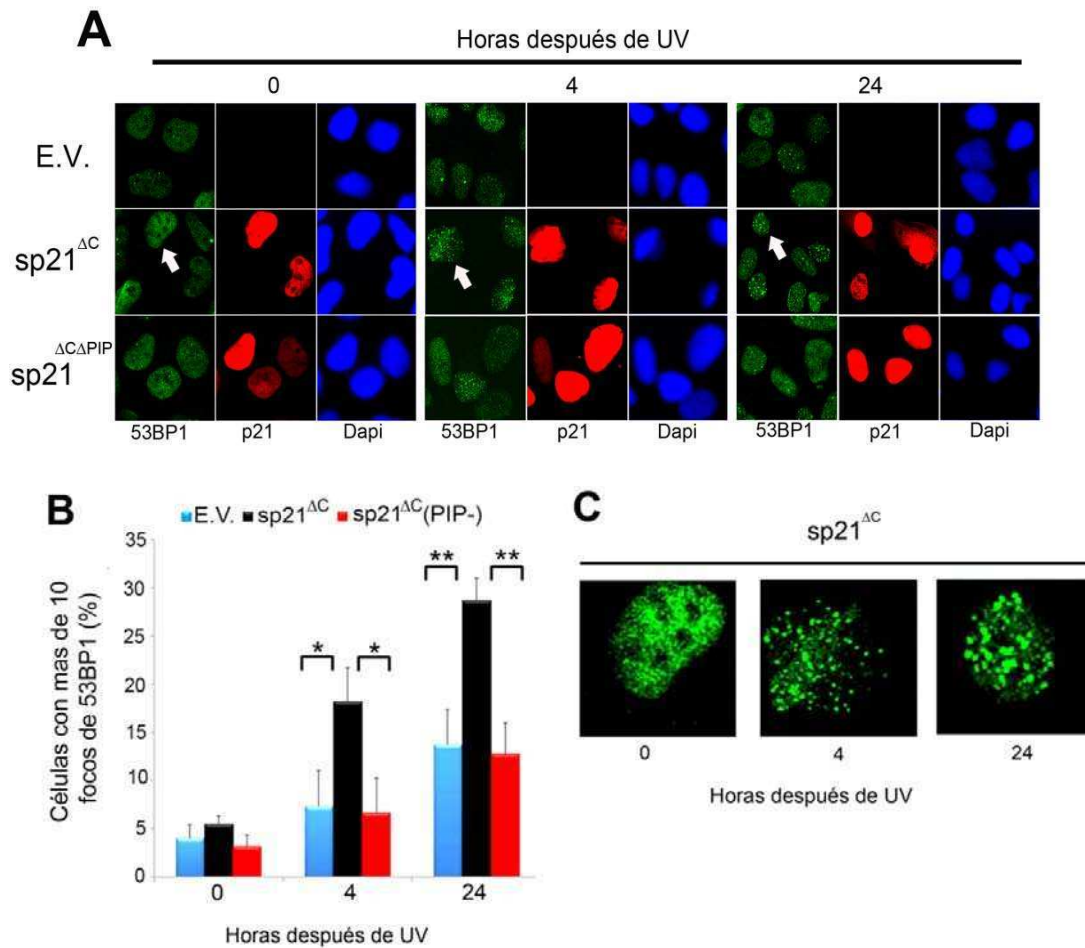


**Figura 5.3:** La interacción persistente de p21 con PCNA luego de irradiación UV genera aumento en la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX). **A)** Células U2OS fueron transfectadas con vector vacío (E.V.) y las distintas construcciones de p21, 24 hs más tarde fueron irradiadas con luz UV (5 J/m<sup>2</sup>), y fijadas con PFA a los tiempos indicados. Luego las muestras fueron sometidas a una doble inmunotinción para detectar las poblaciones transfectadas y sobre éstas la intensidad relativa de  $\gamma$ H2AX, utilizando anticuerpos específicos para p21 y  $\gamma$ H2AX respectivamente (ver sección Materiales y Métodos). **B)** Cuantificación del experimento realizado en A). Ver sección de Materiales

yMétodos donde se explica en detalle el protocolo de cuantificación de la intensidad de  $\gamma$ H2AX. Las significancias estadísticas entre cada mutante en cada condición experimental se realizó mediante una prueba estadística de Kruskal-Wallis, específica para valores sin distribución normal. Se grafican los siguientes valores: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS -no significativo, p>0.05

### 5.2.2 La estabilización de p21 induce la formación de focos de 53BP1

El aumento en la fosforilación de H2AX ( $\gamma$ H2AX), específicamente asociado a una interacción persistente entre p21 y PCNA luego de irradiación UV, era un claro indicio de que la degradación de p21 podía prevenir excesivo estrés replicativo asociado a la acumulación de daño al ADN. En consecuencia quisimos evaluar si el estrés replicativo que resulta de la persistencia de complejos p21/PCNA después de la irradiación UV, podía causar la acumulación de cortes en la doble cadena (CDC), lo que no podía ser evaluado con claridad monitoreando  $\gamma$ H2AX ya que como mencione antes la acumulación pan nuclear de  $\gamma$ H2AX puede enmascarar la organización focal de este marcador en zonas de cortes en la doble cadena. Por esto decidimos monitorear el reclutamiento focal de 53BP1, una proteína cuya organización focal se asocia directamente con la aparición de CDC(87). Observamos que el mutante sp21<sup>AC</sup>, pero no sp21<sup>ACΔPIP</sup>, generó un evidente incremento en la acumulación de células con más de 10 focos para 53BP1 (Figura 5.4 A, B y C). Estos resultados indican que la estabilización de p21, más precisamente la unión persistente de p21 y PCNA luego de irradiación UV, induce la acumulación de CDC.



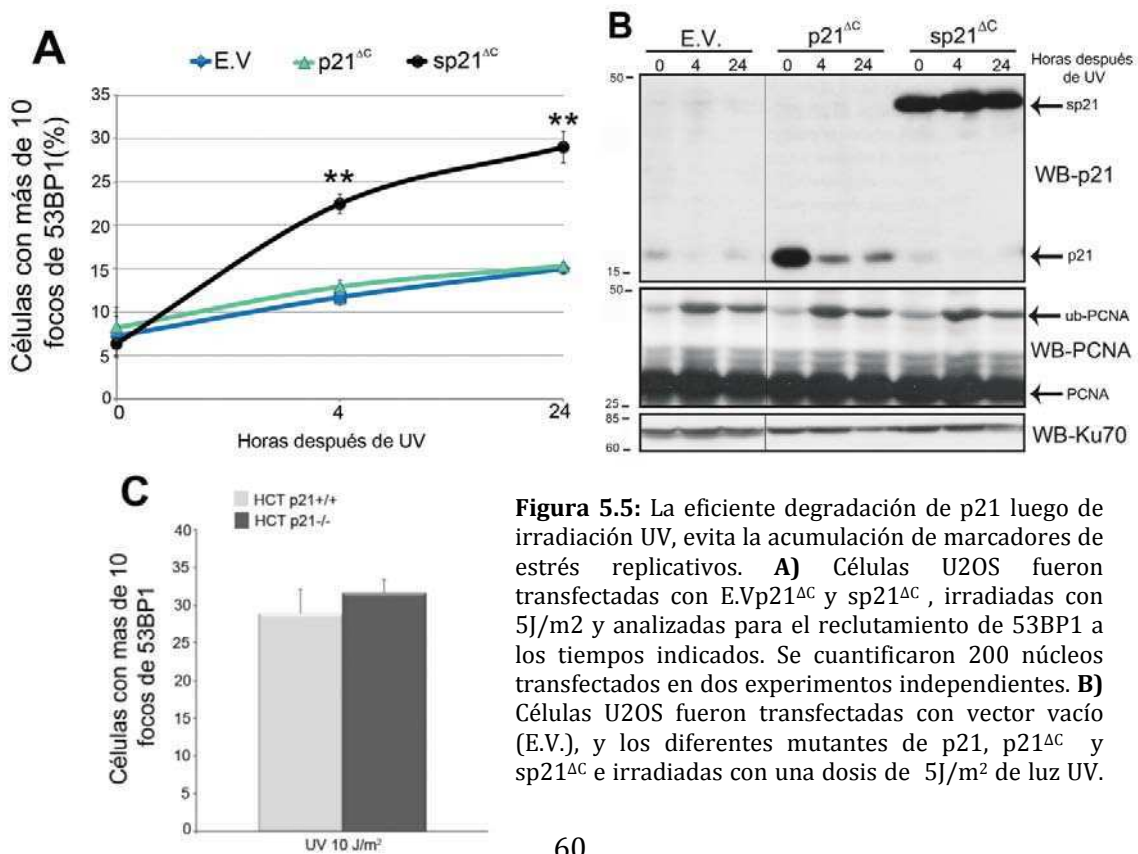
**Figura 5.4:** La eficiente degradación de p21 o la pérdida de interacción entre p21 y PCNA evita la formación de daño a doble cadena en el ADN. **A)** Células U2OS fueron transfectadas con vector vacío (E.V.) y las distintas construcciones de p21, 24 hs más tarde fueron irradiadas con luz UV (5 J/m<sup>2</sup>), y fijadas con PFA a los tiempos indicados. Luego las muestras fueron sometidas a una doble inmunotinción para detectar las poblaciones transfectadas y sobre éstas el reclutamiento a focos de la proteína 53BP1, utilizando anticuerpos específicos para p21 y 53BP1 respectivamente (ver sección MyM para un protocolo detallado). **B)** Se calculó el porcentaje de células con 10 o más focos de 53BP1 analizando 200 células transfectadas para cada condición, en tres experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.05. **C)** Imágenes magnificadas del panel de 53BP1 correspondientes a las células indicadas por una flecha en la de la figura 4A)

*En conjunto estos resultados nos indican que la persistente interacción de p21 y PCNA luego de la exposición a luz UV genera la acumulación de marcadores de estrés replicativo, evidenciado tanto por la inducción de  $\gamma$ H2AX como por la aparición de focos de 53BP1*

### 5.3 La pérdida de interacción entre p21 y PCNA luego de irradiación UV previene la acumulación de marcadores de estrés replicativos

Para descartar efectos no específicos relacionados con la sobreexpresión de p21, realizamos el mismo experimento pero sobreexpresando un mutante de p21 degradable p21<sup>ΔC</sup>, que como mencione en la sección de Materiales y Métodos, no altera la progresión del ciclo celular ya que tiene mutado el sitio de unión a CDK. Notablemente la expresión de este mutante degradable, p21<sup>ΔC</sup> (Figura 5.5 B) no generó cambios en la organización focal de 53BP1 en comparación con las muestras control (Figura 5.5A), demostrando que los fenotipos observados son consecuencia de la estabilización de p21 y no de su sobreexpresión.

También analizamos el reclutamiento a focos de 53BP1 en células HCT116 p21<sup>+/+</sup> y p21<sup>-/-</sup>. Esta línea celular como se introdujo en la sección de Materiales y Métodos, es una línea celular isogénica de la cual se generó una línea knock out (nula) para p21 mediante recombinación homóloga. Cuando comparamos en ambas líneas el reclutamiento a focos de 53BP1 luego de irradiación UV (10j/m<sup>2</sup>), no observamos diferencias en el reclutamiento de esta proteína (Figura 5.5C).



**Figura 5.5:** La eficiente degradación de p21 luego de irradiación UV, evita la acumulación de marcadores de estrés replicativos. **A)** Células U2OS fueron transfectadas con E.Vp21<sup>ΔC</sup> y sp21<sup>ΔC</sup>, irradiadas con 5J/m<sup>2</sup> y analizadas para el reclutamiento de 53BP1 a los tiempos indicados. Se cuantificaron 200 núcleos transfectados en dos experimentos independientes. **B)** Células U2OS fueron transfectadas con vector vacío (E.V.), y los diferentes mutantes de p21, p21<sup>ΔC</sup> y sp21<sup>ΔC</sup> e irradiadas con una dosis de 5J/m<sup>2</sup> de luz UV.

4 y 24 horas post-irradiación se lisaron las células en buffer de carga para luego determinar los niveles de p21, PCNA y PCNA-ub y Ku70 como control de carga. **C)** Células HCT p21+/+ y p21-/- fueron irradiadas con 10j/m<sup>2</sup> y analizadas para la formación de focos de 53BP1. Se muestra en la figura la cantidad de células positivas para la formación de focos de 53BP1 4hs después de UV. 200 núcleos fueron contabilizados en 2 experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.05.

*Estos resultados indican de manera contundente que la eficiente degradación de p21 evita la acumulación de marcadores de estrés replicativo luego de irradiación UV*

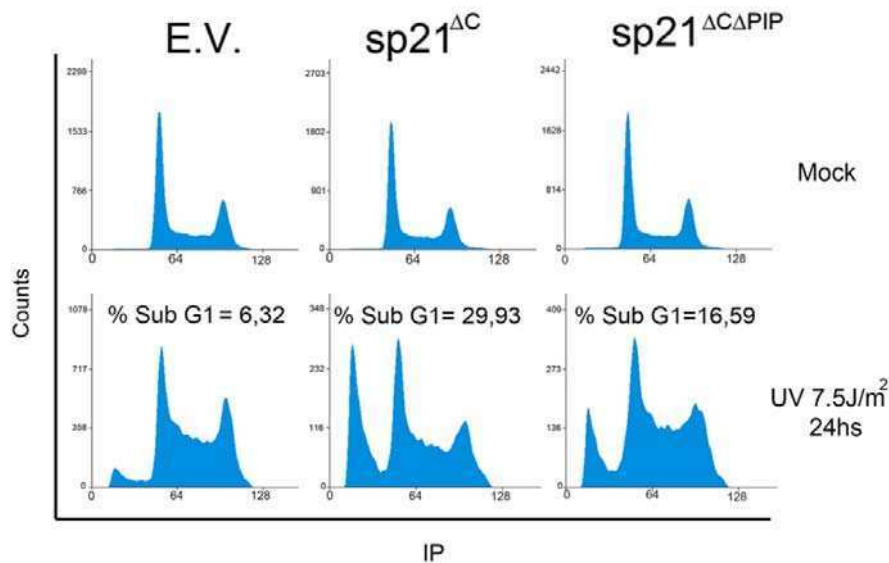
#### *5.4 La estabilización de p21 luego de irradiación UV induce muerte celular.*

Analizando todos los resultados hasta aquí discutidos, la degradación de p21 inducida por luz UV promueve la liberación de PCNA de complejos asociados a p21 reduciendo el estrés replicativo. Fue particularmente intrigante observar un fuerte incremento en la intensidad panuclear de  $\gamma$ H2AX en células que expresan sp21<sup>ΔC</sup> (Figura 5.3 A). Este fenotipo fue previamente asociado a células que están entrando en apoptosis mientras se encuentran transitando la fase S (apoptosis en fase S)(133). Por este motivo quisimos evaluar la viabilidad celular en estas condiciones.

##### *5.4.1 La interacción persistente de p21 y PCNA después de irradiación UV causa un aumento de la fracción SubG1 en un perfil de ciclo celular.*

Dado que existía evidencia previa de pérdida de viabilidad en células que expresan el estable de p21, sp21<sup>ΔC</sup>(107), quisimos confirmar si dicha observación era válida en las condiciones experimentales usadas en este trabajo. Además incorporamos al ensayo el mutante doble de p21, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>. Para esto utilizamos la técnica de citometría de flujo que nos permite evaluar la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo celular mediante la cuantificación del contenido de ADN. Se considera que las células con un contenido de ADN inferior al diploide (hipodiploide) corresponden a células que están degradando su

ADN y que son, por lo tanto, no viables y, posiblemente apoptóticas. Aprovechando el sistema de ventanas (gates) seleccionamos aquellas células transfectadas con un marcador de transfección fusionado a GFP, en este caso f-GFP, por lo que el análisis se focaliza en células con expresión de p21 aumentada por la transfección de cada uno de los mutantes estudiados. Como reportado previamente por nuestro grupo, observamos un aumento de la muerte celular en las células que expresan sp21<sup>ΔC</sup> (Figura 5.6), en comparación con el control, pero al evaluar el efecto del mutante que pierde el sitio de unión a PCNA, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>, vimos que si bien se detectaba un aumento en la muerte celular, ésta no era tan pronunciada como la observada en presencia de sp21<sup>ΔC</sup> (Figura 5.6).



**Figura 5.6:** La interacción sostenida entre p21 y PCNA luego de irradiación UV induce muerte celular. Células U2OS fueron co-transfectadas con las construcciones de p21 indicadas y E.V., y GFP-PCNA como marcador de transfección. 48hs después de la transfección las células fueron irradiadas o no con las dosis de UV indicadas y fijadas según el protocolo para citometría 24 hs más tarde. Previo al análisis por citometría de flujo se tiñó el ADN con yoduro de propidio y se obtuvieron los perfiles celulares de las muestras. Se determinó la fracción Sub G1 (no viable) como aquella que tenía menor contenido de ADN que la fase G1 (2n).

#### 5.4.2 La interacción persistente entre p21 y PCNA desencadena un aumento en la muerte celular luego de irradiación UV

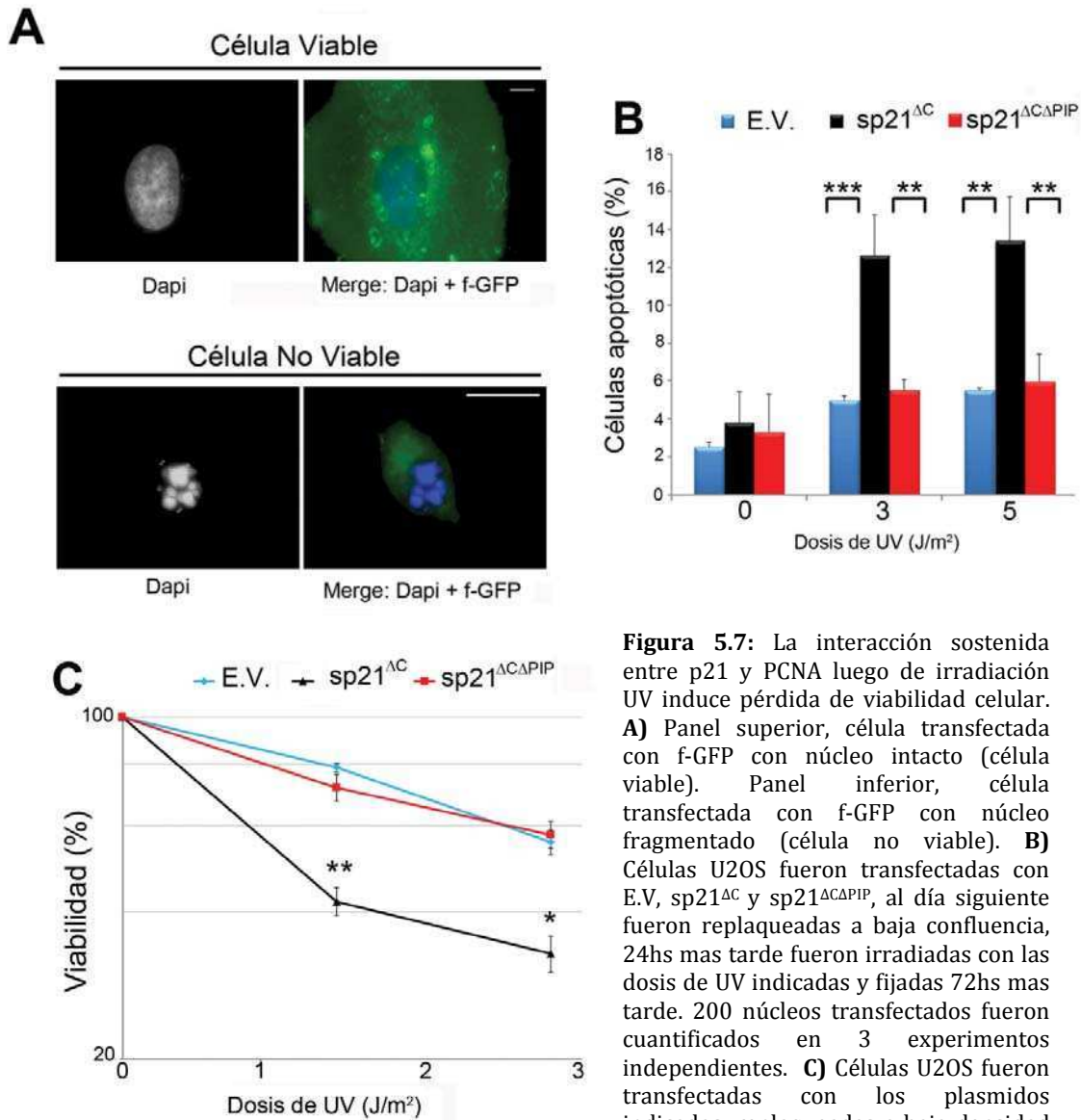
Para asegurarnos de que efectivamente la estabilización de p21, más precisamente la interacción sostenida de p21 con PCNA luego de irradiación UV, causaba la pérdida de viabilidad se realizaron dos experimentos complementarios



que evalúan parámetros asociados a muerte celular o pérdida de viabilidad. Además, el resultado obtenido en el análisis de citometría de flujo para  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$  propicio la búsqueda de otros abordajes experimentales que permitieran determinar si existe un definitivo incremento en la letalidad de células irradiadas con luz UV en donde se fuerza una persistente interacción entre p21 y PCNA.

Se realizó una cuantificación de viabilidad en células transfectadas monitoreando la integridad nuclear siguiendo protocolos previamente descritos que asocian la disgregación nuclear mostrada en la Figura 5.7A, panel inferior con células destinadas a la muerte celular; mientras que los núcleos con estructuras intactas se asocian a viabilidad celular (Figura 5.7A panel superior)(135). Este análisis se realizó a tiempos similares a los utilizados en los experimentos de citometría de flujo (72 horas) observándose un resultado cualitativamente diferente ya que el mutante  $sp21^{\Delta C}$  pero no el mutante  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$  causa un incremento en la muerte celular de acuerdo a este ensayo (Figura 5.7B). Debido a que la fragmentación nuclear se asocia más íntimamente a la apoptosis que la acumulación de células con contenido de ADN subG1(135) concluimos que la persistente interacción entre p21 y PCNA causa un incremento en la letalidad celular que es cuantitativamente mayor y, posiblemente, mecanísticamente diferente a la que puede causar el mutante  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ .

Un esquema experimental complementario es el de analizar no solo la viabilidad sino también la capacidad proliferativa, realizando un ensayo de colonias. La gran desventaja de este ensayo es que se hace imposible focalizarnos en las células transfectadas, situación desventajosa en nuestro esquema experimental donde la eficiencia de transfección es aproximadamente del 40%. Sin embargo, este ensayo puede ser muy informativo ya que, al cuantificar las colonias que se forman después de 10 días se evalúa si las células que superaron el estrés replicativo mantuvieron su potencial proliferativo. También en este ensayo se observó que el mutante estable  $sp21^{\Delta C}$  pero no el  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$  disminuyó su potencial proliferativo (Figura 4.7 C).



**Figura 5.7:** La interacción sostenida entre p21 y PCNA luego de irradiación UV induce pérdida de viabilidad celular.

**A)** Panel superior, célula transfectada con f-GFP con núcleo intacto (célula viable). Panel inferior, célula transfectada con f-GFP con núcleo fragmentado (célula no viable). **B)** Células U2OS fueron transfectadas con E.V, sp21<sup>ΔC</sup> y sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>, al día siguiente fueron replaqueadas a baja confluencia, 24hs mas tarde fueron irradiadas con las dosis de UV indicadas y fijadas 72hs mas tarde. 200 núcleos transfectados fueron cuantificados en 3 experimentos independientes. **C)** Células U2OS fueron transfectadas con los plasmidos indicados, replaqueadas a baja densidad (250 células por placa de 100mm),

irradiadas 24hs después con 1.5 y 3 J/m<sup>2</sup>, y fijadas 8 días más tarde. Se cuantificaron colonias de más de 50 células por duplicado en dos experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS -no significativo, p>0.05.

*Por lo tanto, la interacción persistente de p21 con PCNA luego de la exposición a irradiación UV, promueve la acumulación de daño al ADN y desencadena pérdida de viabilidad.*

---

## *5.5 La falta de degradación de p21 luego de irradiación UV induce aumento en la inestabilidad genómica asociada a fase S*

---

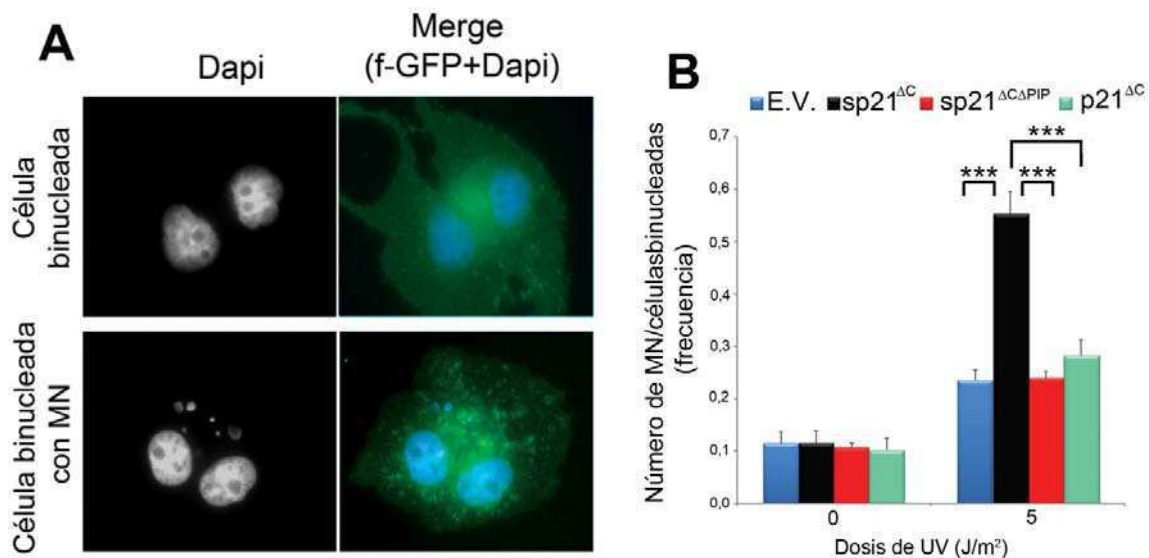
Hasta aquí nuestros resultados indican que la degradación de p21 luego de irradiación UV previene el estrés replicativo, probablemente evitando la acumulación de ADN dañado y la pérdida de viabilidad. Otro parámetro afectado por el estrés replicativo es el incremento en marcadores de inestabilidad genómica (70). Por lo tanto decidimos evaluar el efecto de la persistente interacción entre p21 y PCNA sobre la inestabilidad genómica asociada a la irradiación UV.

### *5.5.1 La interacción persistente entre PCNA y p21 induce inestabilidad genómica luego de irradiación UV*

Para abordar el estudio de inestabilidad genómica después de UV, se seleccionó un ensayo de sencilla interpretación y relativamente rápida ejecución como es el de formación de micronucleos (MN). Dicho marcador de inestabilidad genómica fue previamente asociado a incrementos de estrés replicativo (5, 135). En la sección de Materiales y Métodos se describe en detalle el método de cuantificación de MN. Brevemente, estas estructuras perinucleares resultan de la formación de CDC que liberan fragmentos grandes de ADN que son rodeados por membrana nuclear (135). Los fragmentos de ADN que forman parte de un micronúcleo son variables y pueden extenderse inclusive a partes mayoritarias de cromosomas o de cromosomas enteros. Este ensayo puede abordarse de dos maneras distintas. La primera consiste en el monitoreo de MN en una población asincrónica, donde la inestabilidad genómica puede ser desencadenada durante cualquier fase del ciclo celular. La segunda restringe el análisis a células que replican el ADN y que comienzan el proceso de división celular. De hecho, el protocolo consiste en atrapar células en división durante la última etapa de la mitosis, la citocinesis, mediante la utilización de citocalasina B. Utilizando dicho protocolo combinado, el análisis se lleva a cabo sobre células binucleadas, las cuales completaron la kariocinesis pero no pueden realizar la citocinesis por causa del tratamiento con citocalasina B. De esta manera, realizando un agregado de

citocalasina B después de UV, se restringe al análisis a células que duplicaron el ADN después de la irradiación UV.

Observamos un gran aumento en la formación de MN luego de irradiación UV solo en aquellas células que expresaban el mutante estable  $sp21^{\Delta C}$ . Evaluamos la frecuencia de MN, es decir la cantidad de MN observados sobre el total de células binucleadas analizadas, y solo el mutante estable  $sp21^{\Delta C}$  que mantiene su interacción con PCNA genero un aumento en la inestabilidad genómica (Figura 5.8A y B). Incluimos también el mutante degradable  $p21^{\Delta C}$ , que mantiene la capacidad de unirse a PCNA pero se degrada después de UV, y observamos que no afectaba negativamente la formación de MN asociados a inestabilidad genómica (Figura 5.8B).



**Figura 5.8:** La sostenida interacción de p21 con PCNA luego de irradiación UV aumenta la inestabilidad genómica. Células U2OS fueron transfectadas con GFP-PCNA o f-GFP junto con las construcciones de p21 indicadas. Las células fueron replaqueadas sobre cubre objetos a baja densidad, irradiadas y 24hs mas tarde se les coloco citocalasina B por 40hs. Luego de la fijación se cuantificaron las células transfectadas con o sin MN. **A)** Imágenes representativas de una célula transfectada, binucleada (panel superior) y una célula transfectada binucleada con múltiples MN (panel inferior). **B)** Se calculó la frecuencia de MN: número de MN sobre el total de células binucleadas contabilizadas. Se cuantificaron 300 células binucleadas en 3 experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , sin asterisco = NS –no significativo,  $p > 0.05$ .

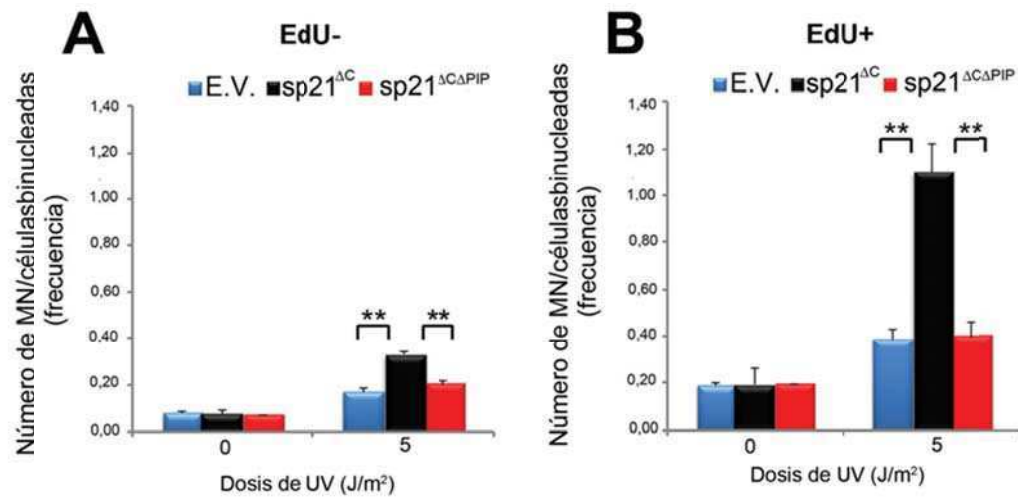
*Por tanto, la persistente interacción de p21 con PCNA genera un aumento en la inestabilidad genómica que resulta de la irradiación UV.*

### 5.5.2 La estabilización de p21 induce inestabilidad genómica asociada a fase S luego de irradiación UV

Si bien la aproximación utilizada en el experimento descrito en la sección anterior permite asociar los MN a errores replicativos es imposible descartar la posibilidad que al menos una fracción de los mismos se hayan formado en fases del ciclo celular previas a la correspondiente a la replicación de ADN lesionado. Quisimos entonces acotar nuestro análisis a células que se encuentran replicando su material genético, ya que los marcadores de estrés estudiados ( $\gamma$ H2AX y 53BP1) indicaban una fuerte asociación entre errores durante la replicación de ADN lesionado y la inestabilidad genómica. Esto sugería que los MN observados podrían generarse en células que habían replicado su ADN luego de haber sido expuestas a irradiación UV.

Para abordar este interrogante, modificamos el procedimiento experimental utilizado para cuantificar MNs. Combinamos el experimento previamente descrito con una marcación de la fase replicativa mediada por la incorporación de EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine). El EdU, como se introdujo en profundidad en la sección de Materiales y Métodos, es un análogo de timina que se incorpora al ADN a medida que éste se duplica, y puede ser detectado fácilmente mediante el uso de anticuerpos específicos. Este análogo se incorporó al ensayo inmediatamente luego de exponer a las células a la luz UV por una hora, con el objetivo de detectar todas las células que inician o transcurren la fase S luego de haberse producido el daño.

Observamos afectivamente que la mayor frecuencia de MN provenía de células que sintetizaban activamente su ADN al momento de ser expuestas al daño (Figura 5.9A y B). Más aún, aquellas que expresaban el mutante estable de p21, sp21<sup>ΔC</sup>, fueron las únicas que evidenciaron mayor inducción de inestabilidad genómica asociada a fase S luego de irradiación UV (Figura 5.9B). Por otro lado, observamos que el mutante doble de p21, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>, tuvo efectos similares al control (E.V) sobre la inestabilidad genómica, indicando que el aumento en la inestabilidad genómica observada es consecuencia de la interacción persistente entre p21 y PCNA luego de irradiación UV.



**Figura 5.9:** La estabilización de p21 induce inestabilidad genómica asociada a fase S luego de irradiación UV. Células U2OS fueron transfectadas con GFP-PCNA junto con las construcciones de p21 indicadas. Las células fueron replaqueadas sobre cubre objetos a baja densidad, irradiadas, marcadas con EdU durante una hora y 24hs mas tarde se les coloco citocalasina B por 40hs. Luego de la fijación se cuantificaron las células transfectadas con o sin MN. **A)** Se cuantificaron las células transfectadas negativas para EdU sobre 300 células binucleadas en dos experimentos independientes. Se calculó la frecuencia. **B)** Se cuantificaron las células transfectadas positivas para EdU sobre 300 células binucleadas en dos experimentos independientes. Se calculó la frecuencia. Las significancias de lasdiferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , sin asterisco = NS –no significativo,  $p > 0.05$ .

*Por lo tanto las células en replicación activa, son altamente sensibles a la interacción persistente entre p21 y PCNA luego de irradiación UV, evidenciado por la mayor inducción de MN asociados a la fase replicativa.*

## 5.6 La estabilización de p21 afecta negativamente el proceso de TLS

Hasta aquí los resultados indicaban que la estabilización de p21 luego de irradiación UV podría estar afectando un proceso asociado a la fase replicativa, y necesario para replicar ADN lesionado. ¿Cuál podría ser dicho proceso? y ¿cómo p21 podría actuar bloqueando o reprimiendo su actividad? Antecedentes previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que p21 inhibe la ubiquitinación de PCNA y el reclutamiento de una polimerasa especializada de la familia de polimerasas de TLS, llamada Pol  $\eta$ , a factorías de replicación luego de irradiación UV(106, 107). Ambos fenotipos están asociados directamente con la activación de

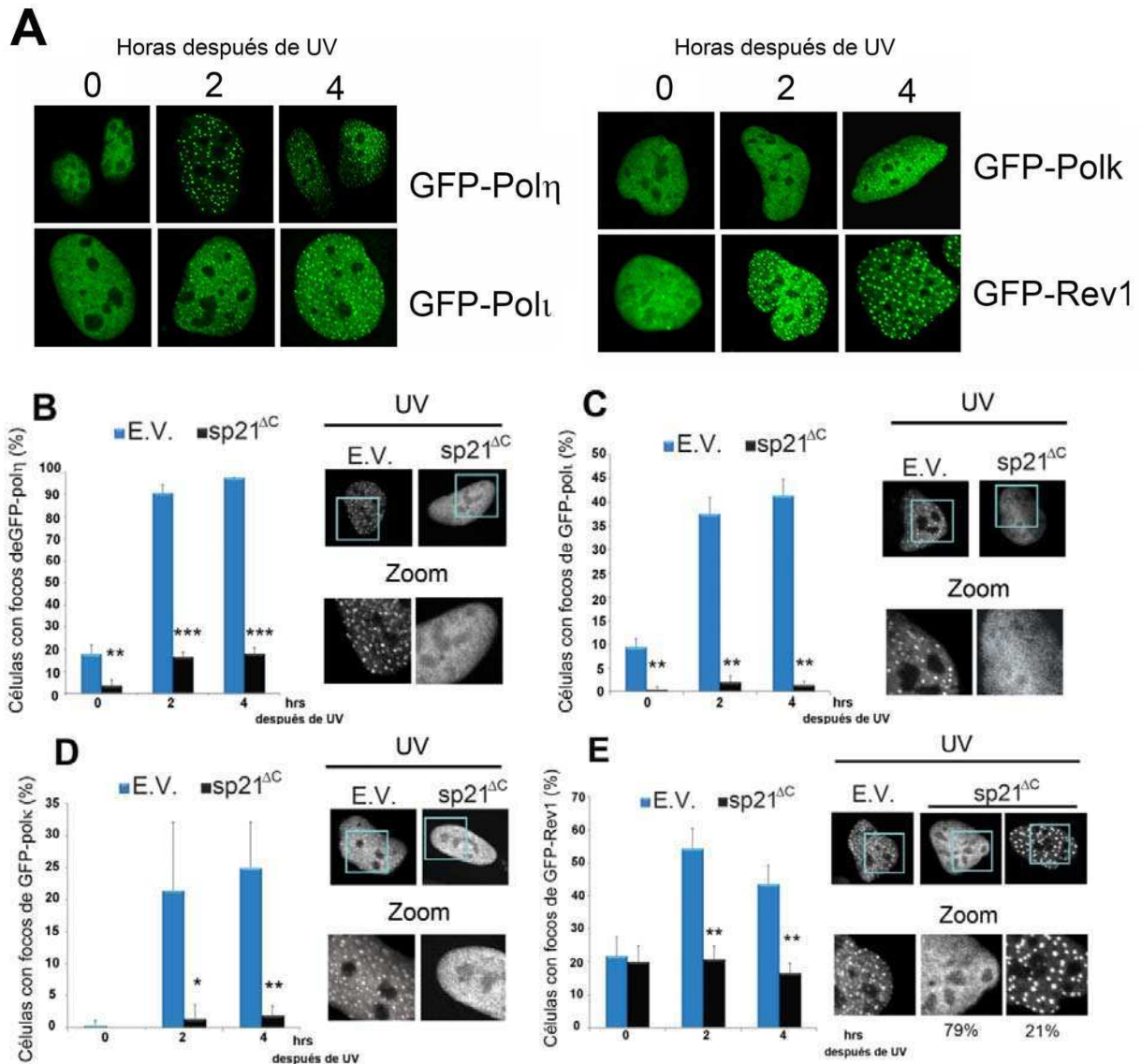
un mecanismo auxiliar de la duplicación del ADN, la síntesis por translesion TLS, (del inglés Translesion DNA Synthesis). Este proceso es un mecanismo asociado a la replicación de ADN (para más detalle referirse a la sección de Introducción), y es necesario para replicar ADN lesionado. La TLS funciona mediante el uso de polimerasas especializadas que gracias a sus sitios activos laxos, son capaces de utilizar bases dañadas como templado replicativo, propiciando la continuidad de la replicación. Biológicamente la TLS es necesaria para evitar el colapso de horquillas activas y sus posibles consecuencias deletéreas, que se desencadenarían ante la aparición de lesiones en el ADN que las polimerasas replicativas son incapaces de replicar.

Para abordar este interrogante decidimos analizar el comportamiento de todas las polimerasas de TLS frente a la estabilización de p21 luego de irradiación UV. El hecho de extender el análisis a todas las polimerasas especializadas y no solo a Pol  $\eta$  nos permite determinar si p21 afecta al proceso de TLS de manera global, ya que en ausencia de una polimerasa de TLS otras pols de la familia Y pueden compensar su acción(136, 137). Por lo que una inhibición selectiva de Pol  $\eta$  por parte de p21, tendría consecuencias totalmente distintas, asociadas probablemente a un aumento en la mutagénesis por la participación de otras polimerasas de TLS mas mutagénicas , que si la inhibición de p21 fuera sobre la TLS en forma global, en donde esperaríamos que todas las polimerasas especializadas fueran afectadas por igual.

### *5.6.1 La estabilización de p21 impide el reclutamiento focal de todas las polimerasas de TLS luego de irradiación UV*

Para abordar el análisis sobre el comportamiento de todas las polimerasas especializadas frente a la estabilización de p21, utilizamos 4 polimerasas de la familia Y, fusionadas a una etiqueta de GFP, lo que nos permitió un mejor procesamiento y análisis de los resultados. En primer lugar evaluamos el comportamiento de GFP-Pol  $\eta$ , GFP-Pol  $\kappa$ , GFP-Pol  $\iota$  y GFP-Rev1 (Figura 5.10A) en respuesta al daño inducido por irradiación UV y confirmamos que todas se reorganizaban en factorías de replicación. Luego analizamos el reclutamiento de estas polimerasas estabilizando a p21 luego de irradiación UV. Observamos que el

mutante  $sp21^{\Delta C}$ , inhibía el reclutamiento de todas las polimerasas de TLS (Figura 5.10B,C,D,E), en comparación al reclutamiento observado cuando se expresaba el vector vacío (E.V.). Durante el análisis también observamos que si bien existía una gran disminución en el porcentaje de células con focos de GFP-Rev1 después de irradiación UV en presencia del mutante estable de p21,  $sp21^{\Delta C}$ , una fracción de células (21%) mantenía constante el reclutamiento focal de esta polimerasa (Figura 5.10E).



**Figura 5.10:** La estabilización de p21 inhibe el reclutamiento de todas las polimerasas de TLS luego de irradiación UV. **A)** Imágenes representativas del reclutamiento de las polimerasas de TLS unidas a una proteína fluorescente (GFP) antes y después de UV (40J/m<sup>2</sup>). Para todos los casos se transfectaron células U2OS con las polimerasas indicadas unidas a GFP junto con el E.V. y  $sp21^{\Delta C}$ , 24hs más tarde fueron irradiadas con (40J/m<sup>2</sup>) y fijadas a 0-2 y 4hs después de UV. **B)** Se determinó el reclutamiento focal de GFP-pol $\eta$  en 200 núcleos transfectados en 3 experimentos independientes. Se realizó el mismo análisis para GFP-pol $\iota$  (**C**), GFP-pol $\kappa$  (**D**) y GFP-Rev1 (**E**). Los



paneles a la derecha de cada gráfico son núcleos representativos (y una fracción aumentada en los paneles inferiores) de las células con E.V. y sp21<sup>ΔC</sup>, luego de irradiación UV. En el caso de la distribución focal de Rev1, hay una fracción (21%) de células con focos que se mantiene en presencia de sp21<sup>ΔC</sup>, luego de irradiación UV. Las significancias de las diferencias entre el E.V. y el sp21<sup>ΔC</sup> en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.05.

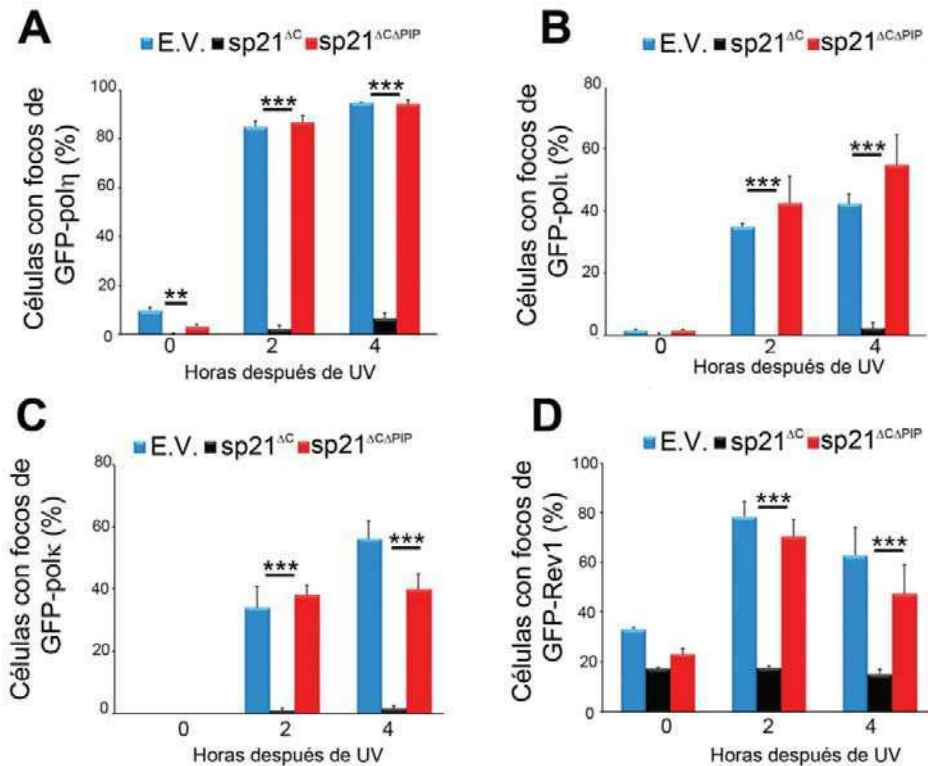
De estos resultados surgieron dos interrogantes: por un lado determinar si efectivamente el bloqueo observado en el reclutamiento focal de las polimerasas de TLS luego de irradiación UV era dependiente del dominio de unión a PCNA, por lo que incluimos en el análisis posterior al doble mutante, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>; y por otro lado evaluar en detalle el comportamiento de GFP-Rev1 en presencia del mutante estable de p21, sp21<sup>ΔC</sup>, ya que fue la única polimerasa que mantuvo un porcentaje constante de células con focos en presencia de p21.

*Este experimento no permitió demostrar que la estabilización de p21 afecta negativamente el reclutamiento focal de las polimerasas especializadas en respuesta a luz UV.*

### *5.6.2 p21 a través de su dominio de unión a PCNA inhibe el reclutamiento focal de todas las polimerasas de TLS luego de irradiación UV*

Para evaluar si la interacción de p21 y PCNA luego de irradiación UV era necesaria para inducir el bloqueo sobre el reclutamiento focal de las polimerasas de TLS incluimos en el análisis el mutante doble de p21, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>. Observamos efectivamente que en presencia de sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>, donde p21 perdió la capacidad de unirse a PCNA, el reclutamiento focal de GFP-Pol η fue similar al observado en la situación control, donde se expresa el vector vacío (E.V.) (Figura 5.11A), y se diferenció del bloqueo observado en presencia de sp21<sup>ΔC</sup>. Lo mismo se observó cuando analizamos la reorganización focal de GFP-Pol κ, GFP-Pol ι y GFP-Rev1 en presencia de sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> luego de irradiación UV (Figura 5.11B, C y D). La pérdida de interacción entre p21 y PCNA restituyó los valores normales de reorganización focal de estas polimerasas, mientras que la interacción sostenida de p21 y PCNA,

sp21<sup>ΔC</sup>, reprimió la formación de complejos focales de las polimerasas de TLS en respuesta a irradiación UV.



**Figura 5.11:** p21 a través de su dominio a PCNA bloquea el reclutamiento a factorías de replicación de todas las polimerasas de TLS en respuesta a irradiación UV. Para todos los casos células Hela fueron co-transfectadas con las construcciones de p21 indicadas y cada polimerasa unida a GFP. 24 horas más tarde fueron irradiadas (40J/m<sup>2</sup>) y fijadas a 0-2 y 4hs después de UV. **A)** Se determinó el reclutamiento focal de GFP-pol $\eta$  en 200 núcleos transfectados en 3 experimentos independientes. Se realizó el mismo análisis para GFP-polt (**B**), GFP-polk (**C**) y GFP-Rev1 (**D**). Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.05.

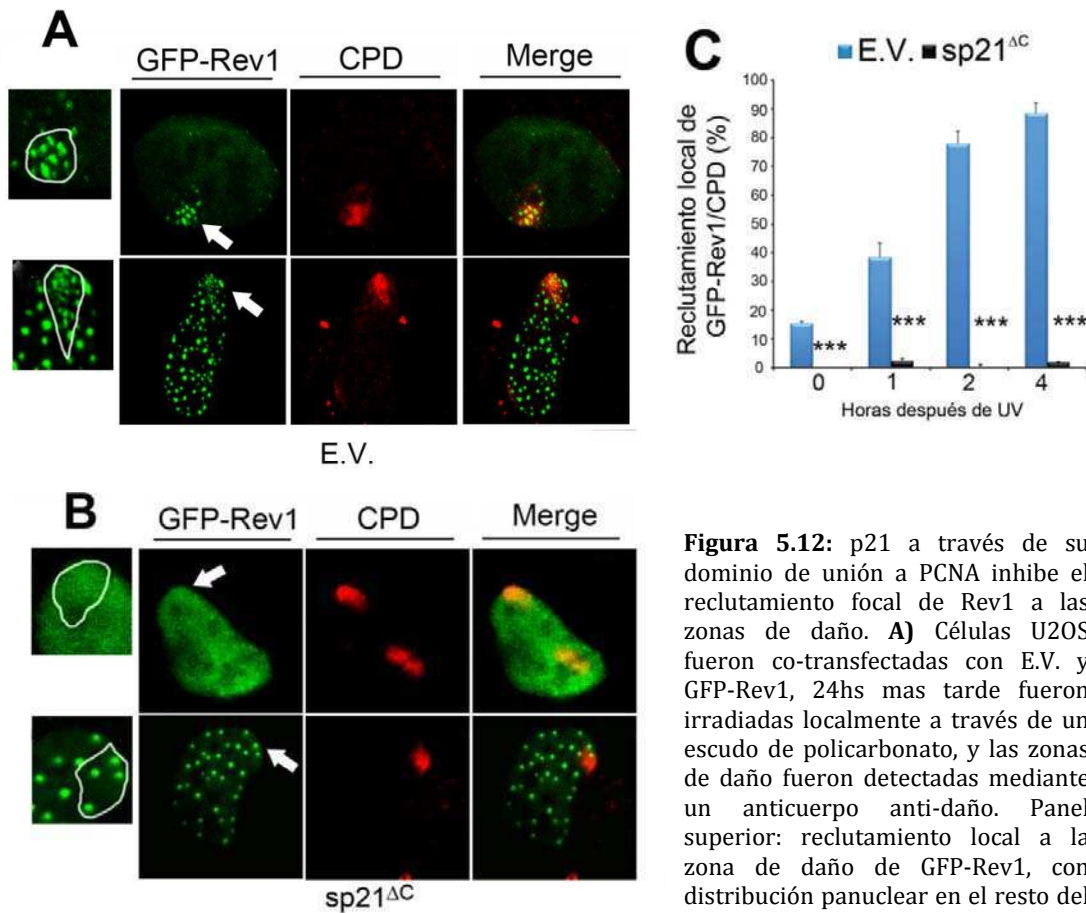
Previamente se observó que la expresión sp21<sup>ΔC</sup> genero una disminución significativa en el porcentaje de células con focos de GFP-Rev1 luego de irradiación UV, (Figura 10E) aunque se mantuvo una fracción constante de células con reclutamiento focal (21%), tanto antes como después del daño. Teniendo en cuenta que el dominio necesario para generar el bloqueo en el reclutamiento focal, es el dominio de unión a PCNA, por lo demostrado en la figura anterior (Figura 4.11 A, B, C y D), decidimos analizar utilizando el mutante estable de p21, sp21<sup>ΔC</sup>, si efectivamente p21 bloqueaba la formación de focos generados por la presencia de lesiones en el ADN.

Para abordar este interrogante utilizamos la técnica de irradiación local sobre un cultivo celular. Esta técnica se basa en el uso de un filtro de policarbonato con poros de aproximadamente  $5\mu\text{m}$  en su superficie. Esta pequeña película de policarbonato actúa como un escudo dejando pasar la luz UV solo por las zonas discretas delimitadas por los poros (138). Como resultado se obtiene una irradiación localizada, en donde solo algunas zonas del núcleo son irradiadas. Estas zonas pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos anti-daño que reconocen los dímeros de timina (CPD), una de las lesiones que se generan en respuesta a la luz UV.

Observamos que en las células control (E.V.), los focos de GFP-Rev1 luego de irradiación UV se formaron siempre en la zona irradiada (detectada por el anticuerpo anti-daño) sin importar cuál fuera la organización focal fuera de la zona del daño (resto del núcleo no irradiado), que mantenía una distribución panuclear (difusa) en el 80% de los núcleos cuantificados (Figura 5.12A, panel superior) o focal en el 20% de los núcleos analizados (Figura 5.12A, el panel inferior). De manera contundente la organización focal de GFP-Rev1 fue siempre nula en la zona de daño en presencia de  $\text{sp21}^{\Delta\text{C}}$ , sin importar cuál fuera la distribución de GFP-Rev1 fuera de la zona dañada (Figura 5.12B, panel superior e inferior y C). La ausencia de focos de GFP-Rev1 en las zonas de daño confirmaba el bloqueo de p21 sobre la inducción en la organización focal de esta polimerasa en respuesta a irradiación UV.

GFP-Rev1, como se introdujo en detalle en la Introducción, es una polimerasa de la familia Y que a diferencia de las demás polimerasas de esta misma familia, no posee un sitio de unión a PCNA (PIP box)(28). GFP-Rev1 posee un dominio BRCT en la región N-terminal de la proteína (52, 54) que sirve para la interacción con PCNA e inclusive con la hebra de ADN(28). Además esta polimerasa puede unirse a otras pols a través de un sitio de agregación en su C-terminal que se une a otras polimerasas especializadas. Estas características hacen que la formación de focos de GFP-Rev1 pueda estar mediada por otros dominios independientes al PIP Box. De cualquier manera lo que pudimos demostrar es que p21 a través de su sitio de unión a PCNA bloquea el reclutamiento a las zonas de

daño de GFP-Rev1, lo que concluye con nuestra evaluación sobre el comportamiento de todas las polimerasas en respuesta a irradiación UV.



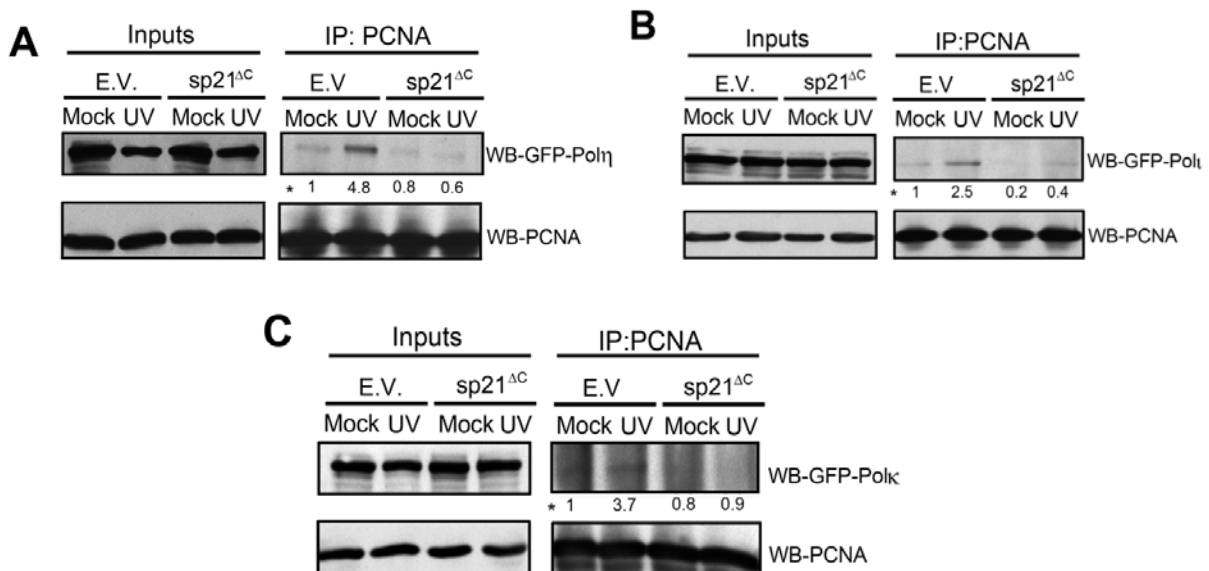
**Figura 5.12:** p21 a través de su dominio de unión a PCNA inhibe el reclutamiento focal de Rev1 a las zonas de daño. **A)** Células U2OS fueron co-transfectadas con E.V. y GFP-Rev1, 24hs mas tarde fueron irradiadas localmente a través de un escudo de policarbonato, y las zonas de daño fueron detectadas mediante un anticuerpo anti-daño. Panel superior: reclutamiento local a la zona de daño de GFP-Rev1, con distribución panuclear en el resto del núcleo. Panel inferior: Reclutamiento

local de GFP-Rev1 a la zona de daño, con una distribución focal en el resto del núcleo. **B)** Células U2OS fueron co-transfectadas con sp21 $\Delta$ C, y GFP-Rev1 y se siguió el mismo protocolo anterior. Panel superior: distribución panuclear de GFP-Rev1, sin reclutamiento local a la zona de daño. Panel inferior: distribución focal de GFP-Rev1, sin reclutamiento local a la zona de daño. **C)** Se cuantificaron 200 núcleos transfectados para cada condición y se determinó la cantidad de células en donde GFP-Rev1 colocalizo con el CPD (daño) en dos experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre el E.V. y el sp21 $\Delta$ C en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.05.

*Podemos concluir que la interacción persistente entre p21 y PCNA luego de irradiación UV bloquea la reorganización focal de todas las polimerasas de TLS al ADN lesionado.*

5.6.3 La estabilización de p21 impide la formación de complejos de PCNA con las polimerasa de TLS

Hasta aquí p21 a través de su dominio de unión a PCNA, inhibe el reclutamiento de las polimerasas especializadas a factorías de replicación luego de irradiación UV. Esto sugería que p21 estaba impidiendo la formación de los complejos entre las polimerasas especializadas y PCNA que resultan en los focos que observamos en el microscopio. Para evaluar esta hipótesis decidimos inmunoprecipitar PCNA y mediante anticuerpos específicos analizar la presencia de las polimerasas especializadas en los complejos de PCNA. Observamos que ante la exposición a luz UV la interacción de GFP-Pol  $\eta$ , GFP-Pol  $\kappa$  y GFP-Pol  $\iota$  con PCNA aumento en comparación con las muestras no irradiadas (Figura 5.13 A, B y C. Véase columnas correspondientes al E.V.). Esto indicaba que efectivamente la interacción de las polimerasas de TLS con PCNA se induce en respuesta a irradiación UV. En contraste no observamos la presencia de las polimerasas de TLS en los complejos de PCNA cuando expresábamos el mutante estable de p21, sp21 $\Delta$ C (Figura 5.13 A, B y C, véase columnas correspondientes al sp21 $\Delta$ C). Estos resultados correlacionaban de manera directa con el bloqueo en la formación de estructuras focales de las polimerasas de TLS en presencia de p21.



**Figura 5.13:** La interacción persistente de p21 con PCNA luego de irradiación UV previene la formación de complejos de las polimerasas de TLS con PCNA. **A)** Células U2OS fueron transfectadas con E.V. o sp21 $\Delta$ C, junto a al plásmido de GFP-Pol  $\eta$ . 24 horas después fueron irradiadas con 40J/m<sup>2</sup>, y 2 horas más tarde las muestras se sometieron a una inmunoprecipitación cromatínica (ver

Materiales y Métodos) utilizando un anticuerpo monoclonal para PCNA. Experimentos similares se realizaron para GFP-Pol  $\iota$  (**B**) y GFP-Pol  $\kappa$  (**C**). Las cantidades relativas de cada polimerasa unida a PCNA (que inmunoprecipito con PCNA) fue calculada por densitometría de cada banda, normalizando según los niveles de PCNA. Los resultados informados se relativizaron a la muestra no irradiada control (E.V.).

*Por lo tanto, la interacción sostenida entre p21 y PCNA impide la formación de complejos entre las polimerasas especializadas y PCNA luego de irradiación UV.*

---

La pérdida de interacción entre las polimerasas de TLS y PCNA en presencia de p21 afecta negativamente el proceso de TLS, lo que podría explicar la acumulación de ADN lesionado evidenciado por la inducción en los marcadores de estrés replicativos ( $\gamma$ H2AX y 53BP1). Para evaluar la hipótesis de una TLS subóptima decidimos utilizar una técnica que nos permitiera evaluar directamente el comportamiento de horquillas activas en presencia de ADN lesionado. A continuación se detalla el ensayo de fibras, técnica que mide la velocidad de progresión de horquillas individuales.

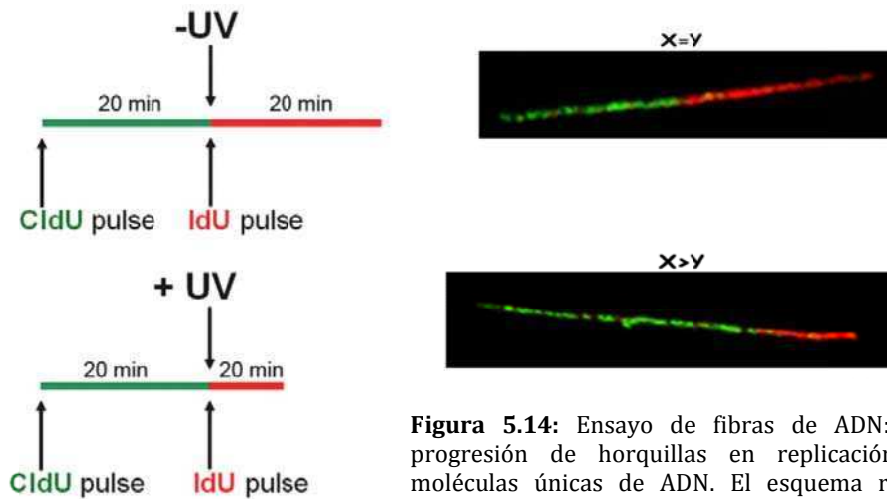
### *5.7 Ensayo de fibras de ADN: una herramienta para medir la progresión de horquillas en replicación activa*

---

La síntesis de ADN por Translesión es un mecanismo de tolerancia al daño genómico que actúa asociado a la fase replicativa. Su función consiste en mantener la procesividad de horquillas en replicación activa a fin de evitar el colapso de estas horquillas, que en consecuencia generarían muerte celular. Esta función la lleva a cabo mediante el uso de las polimerasas especializadas de TLS, que se intercambian por las polimerasas replicativas en el momento que éstas se encuentran con la lesión. Hasta el momento no existían técnicas que permitieran evaluar la TLS de manera directa, ya que su función se lleva a cabo en la fase replicativa del ciclo celular y es casi imposible medir pequeños eventos de síntesis en un mar de síntesis activa. Las medidas indirectas de TLS mayormente utilizadas, son el reclutamiento a focos de las polimerasas de TLS y la

ubiquitinación de PCNA, fenotipos que se inducen en presencia de lesiones en el ADN. Sin embargo actualmente, se han desarrollado técnicas que permiten medir directamente que ocurre con la replicación de ADN después de daño genómico. Uno de los métodos más utilizados en la bibliografía es el ensayo de fibras de ADN (60, 139, 140) que permite obtener datos cuantificables sobre la procesividad de horquillas en replicación activa, antes y después de generada la lesión.

Éste método se basa en medir la longitud de fragmentos de ADN recientemente sintetizados, en ausencia de lesiones (replicación normal) y luego de generada la lesión (replicación sobre ADN lesionado) sobre una misma molécula de ADN y comparar sus longitudes. Para lograr esto se utilizan dos pulsos de incorporación consecutiva de análogos de timina. El primer pulso de cloro-deoxiuridina (CldU) durante 20 minutos antes de exponer a las células a irradiación UV, el segundo pulso de yodo-deoxiuridina (IdU) se realiza inmediatamente después del daño con luz UV también por 20 minutos. La detección del CldU y IdU se realiza con anticuerpos primarios específicos (no poseen reacción cruzada) y subsiguientemente con anticuerpos secundarios asociados a diferentes fluoroforos, es posible distinguir, el primer fragmentos del segundo. Un paso muy importante a tener en cuenta cuando se realiza esta técnica y que asegura el éxito del ensayo, es la desnaturalización y subsiguiente estiramiento de las fibras de ADN previo a la fijación. Este paso permite que los focos de replicación se extiendan asemejando a una fibra (de ahí su nombre en castellano) lo que asegura que la detección sea en forma de línea con dos colores consecutivos que representan los dos pulsos de los análogos (ver figura 5.14). El uso de microscopia confocal permite la obtención de imágenes de alta resolución en donde se puede medir la razón entre el primer fragmento (antes de la lesión) y el segundo (después del daño).



**Figura 5.14:** Ensayo de fibras de ADN: medida de progresión de horquillas en replicación activa en moléculas únicas de ADN. El esquema representa la detección de la incorporación consecutiva de los

análogos de timina con dos anticuerpos específicos. El panel superior derecho, representa una situación no perturbada en donde ambos fragmentos tienen la misma longitud. El panel de la izquierda es una imagen representativa de cómo se visualizan las fibras en esa situación, nótese el mismo largo para ambos colores ( $X=Y$ ) por lo que la razón entre CldU e IdU (CldU:IdU) es 1. El panel inferior derecho representa una situación en donde la célula fue expuesta a daño genotóxico, por lo que los largos de ambos fragmentos son distintos, siendo el segundo color más corto (representa una horquilla más lenta). La imagen de la izquierda es representativa de esta situación, en este caso  $X>Y$  por lo que la razón entre CldU:IdU será  $> 1$ .

La exposición a una determinada cantidad de irradiación UVC provoca la acumulación de lesiones sobre el templado de ADN que está siendo replicado, lo que genera que horquillas activas se encuentren aleatoriamente con una lesión. Esta premisa es la base de la técnica ya que lo que se calcula es la razón entre el primer fragmento (CldU) y el segundo fragmento (IdU). Si la horquilla no se encontró con ninguna lesión en el tiempo que incorporo el análogo, éste fragmento tendrá una  $X$  longitud (medida en  $\mu\text{m}$ ), y el segundo fragmento tendrá la misma longitud ( $Y$ ),  $X=Y$ , siendo la razón CldU:IdU igual a 1. Si la horquilla se encontró con una lesión y disminuyó su velocidad de replicación, el primer fragmento seguirá midiendo  $X$  pero será mayor al segundo,  $X>Y$ , siendo la razón CldU:IdU  $> 1$ . Usualmente una horquilla que se encuentra con una lesión tiene una razón de CldU:IdU = 2.5, en situaciones donde la horquilla se ve más afectada se espera una razón mayor. Midiendo dicha razón en un número estadísticamente significativo de horquillas se puede determinar si el promedio de las razones se encuentra alterado en el contexto deseado, en nuestro caso la variable a modular es p21.



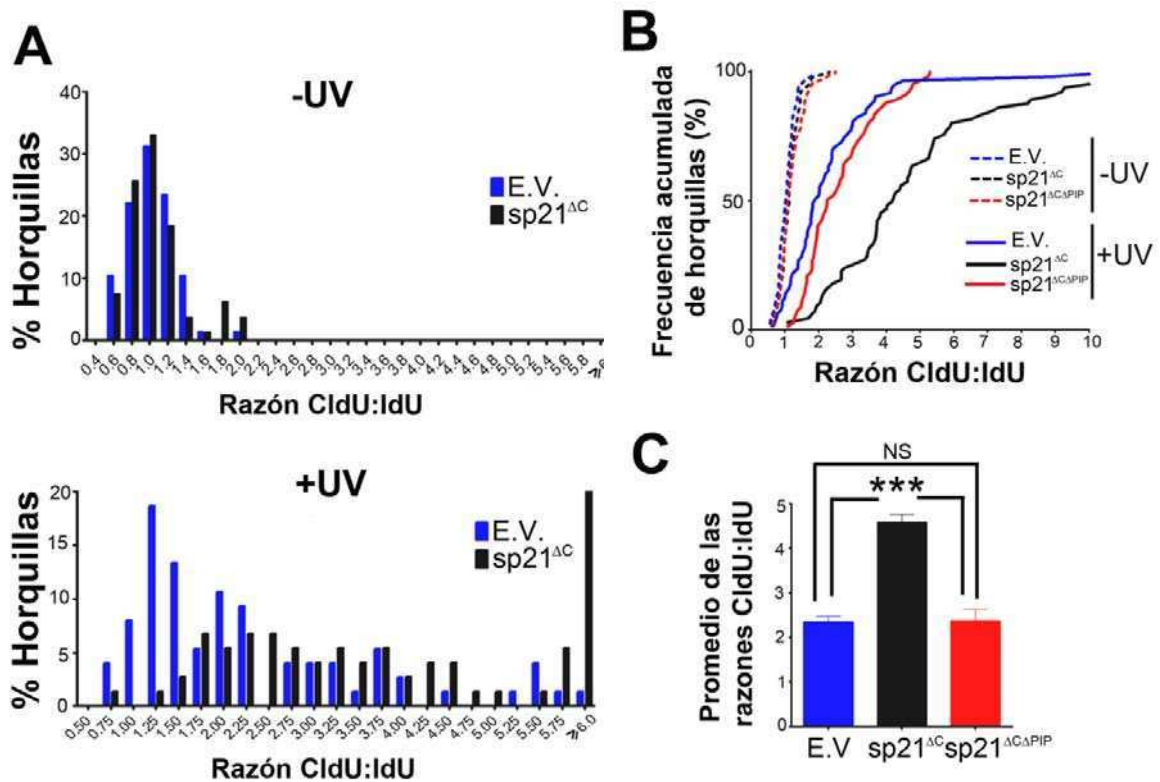
## *5.8 La interacción sostenida entre p21 y PCNA retrasa la velocidad de replicación sobre ADN lesionado*

El ensayo de fibras de ADN nos permitía entonces evaluar la eficiencia de TLS en presencia de p21 luego de irradiación UV. Además existían evidencias que indican que defectos en TLS retrasan la progresión de horquillas de replicación sobre ADN lesionado (60, 139).

En primer lugar corroboramos que las razones entre el primer análogo y el segundo (CldU:IdU) fueran igual a 1 en la situación control, sin estrés genotóxico, y en condiciones normales, sin sobreexpresar ningún mutante (E.V.) (Figura 5.15A - UV). Esto es esperable ya que las longitudes de ambos fragmentos (correspondientes a cada análogo) son iguales, dando como resultado una relación igual a 1. En contraste cuando la célula fue expuesta a un estrés genotóxico, en este caso irradiación UVC, la razón promedio de CldU:IdU fue mayor a 1 (aproximadamente 2.3) (Figura 5.15A + UV y 15C). Este aumento es consecuencia de horquillas activas encontrándose con las lesiones, disminuyendo su velocidad, lo que genera un retraso en la incorporación del segundo análogo. Por ende la razón CldU:IdU es mayor a 1. Además se observó una amplia distribución en las razones CldU:IdU, lo que refuerza el concepto de que las lesiones se generan aleatoriamente en el ADN (Figura 5.15A + UV). Estos resultados indican que frente a una lesión las horquillas disminuyen su velocidad de replicación (60, 139, 140).

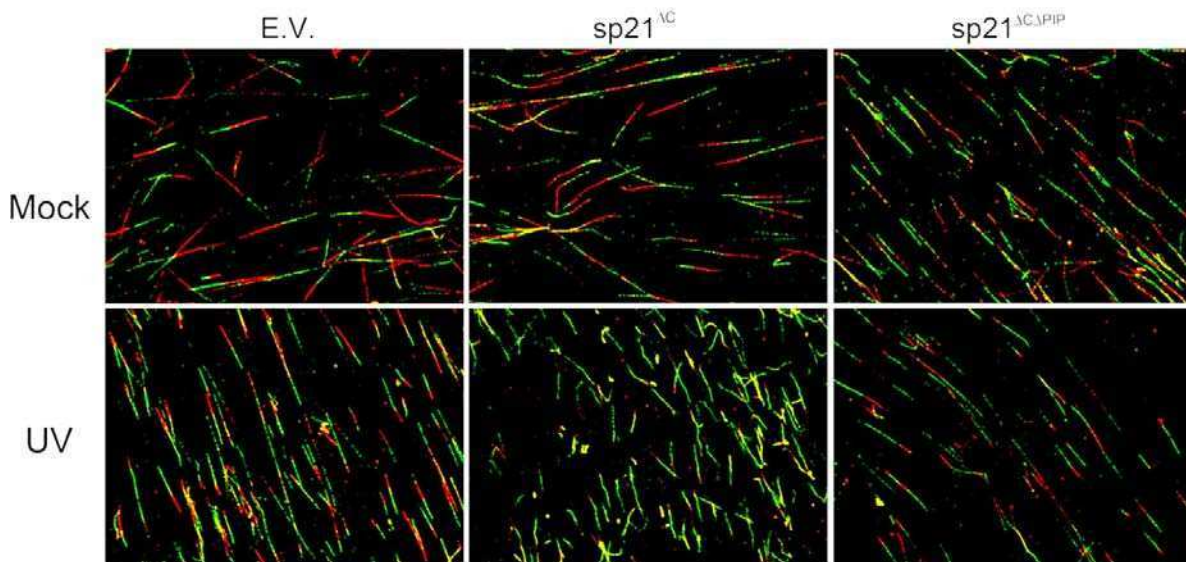
Una vez analizado el comportamiento de las horquillas frente a irradiación UV, incorporamos los mutantes estables de p21. Observamos que la expresión de sp21<sup>ΔC</sup>, no afectó la distribución ni el promedio de las razones CldU:IdU antes de UV (Figura 4.15A - UV), pero si generó una distribución de razones CldU:IdU mayores a 2.5, corriendo la distribución de razones de CldU:IdU hacia la izquierda en el gráfico de frecuencias (Figura 5.15A + UV). Este resultado indicaba que la estabilización de p21 disminuye la velocidad de replicación sobre ADN lesionado. Incluimos en el análisis el mutante que perdió la capacidad de unirse a PCNA, sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>, y no observamos ningún efecto sobre la velocidad de replicación antes o después de irradiación UV en comparación con el sp21<sup>ΔC</sup>, que si disminuye la progresión de horquillas sobre ADN lesionado (Figura 5.15B y 5.16). Luego promediamos las razones graficadas en la figura 4.15A y B, de las muestras

irradiadas, y observamos que el efecto de  $sp21^{\Delta C}$ , sobre la velocidad de replicación es estadísticamente significativo y difiere de las muestras control (E.V.) y del  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ .



**Figura 5.15:** La interacción sostenida de p21 con PCNA modula negativamente la replicación sobre ADN lesionado. **A)** Grafico de distribución de frecuencia de las razones CldU:IdU antes y después de UV. Células U2OS fueron transfectadas con las construcciones indicadas y 24hs mas tarde se realizó una primera incorporación con CldU por 20 minutos, se irradiaron con 20J/m<sup>2</sup>, se incorporó inmediatamente después de la irradiación IdU por otros 20 minutos y las muestras fueron procesadas según el protocolo del ensayo de fibras. **B)** Frecuencia acumulada de las razones CldU:IdU. Células U2OS fueron tratadas como en A) y se incorporó al análisis el doble mutante  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ . **C)** Promedio de las razones de CldU:IdU de las muestras irradiadas. Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.0

La disminución en la velocidad observada, podría deberse a horquillas retrasada transitoriamente o inclusive a horquilla detenidas permanentemente. En estas condiciones experimentales tal distinción no puede hacerse, pero es contundente el efecto observado por parte de  $sp21^{\Delta C}$  sobre la progresión de horquillas activas sobre ADN lesionado. (Figura 5.16)



**Figura 5.16:** p21 disminuye la velocidad de progresión de horquillas activas sobre ADN lesionado. Figura representativa de las imágenes adquiridas para la cuantificación de las fibras. Nótese el panel del medio en las fibras irradiadas correspondiente al sp21<sup>ΔC</sup>, el fragmento de color rojo, producto de la segunda incorporación (IdU), es significativamente más corto en la mayoría de las fibras de ADN en comparación con el control (E.V.) y el doble mutante (sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>).

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que la interacción sostenida de p21 con PCNA luego de irradiación UV, disminuye la velocidad de replicación sobre ADN dañado, lo que sugiere una falta de actividad de TLS

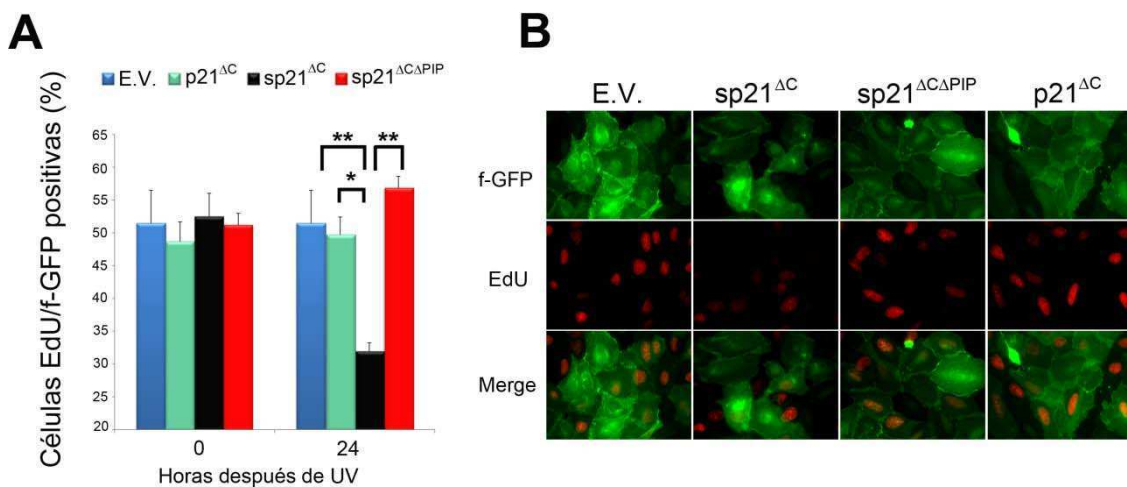
### *5.8.1 La estabilización de p21 después de irradiación UV retrasa la progresión de la fase S y la tasa de división celular*

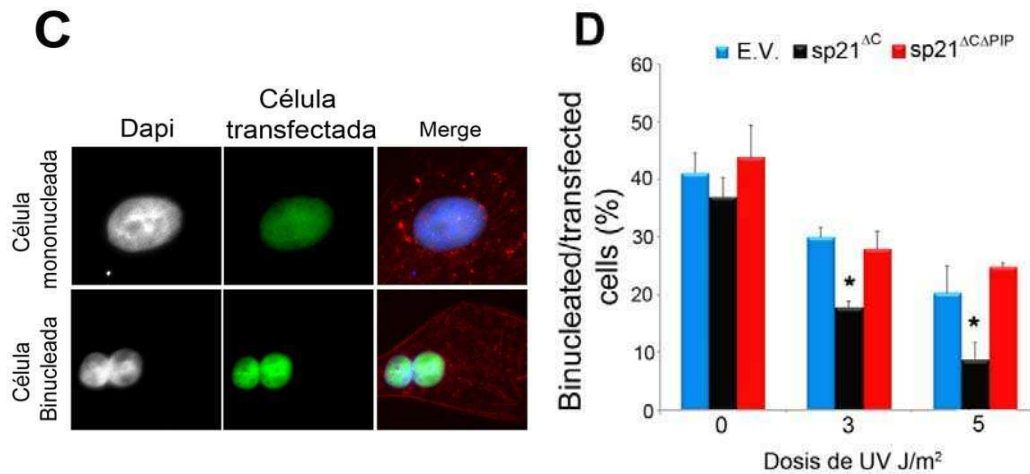
El retraso observado en la velocidad de replicación en el análisis de progresión de horquillas individuales sobre ADN lesionado en células que expresan p21 estable, sugería que este retraso observado podría extenderse a la velocidad con la que la célula progresa durante la fase S, y consecuentemente afectar el tiempo en que ésta tarda en dividirse.

Decidimos analizar la progresión por la fase replicativa en presencia de los mutantes estables de p21. Para lograr esto determinamos la cantidad de células en fase S luego de irradiación UV utilizando un marcador de fase S, en este caso el EdU, que fue introducido en resultados previos y en detalle en la sección de materiales y métodos. Este análogo de timina se incorpora al ADN a medida que

este se replica, y es detectado por anticuerpos específicos. Incorporamos el análogo al medio de cultivo 24 horas luego de irradiar las células durante 15 minutos, e inmediatamente después fueron fijadas y procesadas. Nuestro diseño experimental nos permite realizar el análisis sobre células transfectadas ya que los plásmidos de p21 se co-transfectan junto a f-GFP, obteniendo una número de células positivas para EdU sobre la población de células transfectadas.

No observamos diferencias en la cantidad de células positivas para EdU en la situación sin estrés entre ninguno de los mutantes analizados (Figura 5.17A). En contraste, luego de irradiación UV la cantidad de células positivas para EdU fue menor en aquellas células donde se expresó el mutante estable  $sp21^{\Delta C}$ , mientras que la construcción  $sp21^{\Delta C\Delta PIP}$ , no mantuvo una proporción de células positivas para EdU que el control, (E.V.) (Figura 5.17A y B). Analizamos también el efecto de la sobreexpresión del mutante degradable,  $p21^{\Delta C}$ , y no observamos efectos sobre la progresión de la fase S ni antes ni después de irradiación UV (Figura 5.17A y B). En conjunto estos resultados sugieren que la interacción sostenida de p21 con PCNA afecta la velocidad de progresión por la fase replicativa. Este efecto es dependiente del dominio de interacción con PCNA y la eficiente degradación de p21 previene los defectos observados en la progresión de la fase S.





**Figura 5.17:** La estabilización de p21 genera un retraso en la progresión de la fase S luego de irradiación UV. **A)** Células U2OS fueron transfectadas con las construcciones de p21 indicadas, 24 horas más tarde fueron irradiadas con 5J/m<sup>2</sup> o no, y 24 horas después se fijaron según el protocolo de detección de EdU. Se cuantificaron 200 núcleos transfectados sobre los cuales se determinó si eran o no positivos para EdU. **B)** Células tratadas como en A). Imágenes representativas de la fluorescencia detectada para EdU para cada mutante después de irradiación UV. **C)** Células U2OS transfectadas con un marcador de transfección GFP-PCNA y vector vacío E.V. Imágenes representativas de una célula mononucleada (panel superior) y una célula binucleada (panel inferior). Se utilizó phalloidina 568 para teñir la membrana celular. **D)** Células U2OS transfectadas con un marcador de transfección, GFP-PCNA y las construcciones de p21 indicadas. 24 horas más tarde fueron replaqueadas a baja densidad e irradiadas un día después según las dosis indicadas en la imagen. Pasadas las 24hs se incorporó al medio citocalasina B (4.5µg/ml) durante 40hs, pasado este tiempo se fijaron las células y se realizó una inmunotinción con phalloidina para detectar la membrana celular. Se cuantificaron 300 células de las cuales se calculó el porcentaje de células binucleadas presentes en el preparado. Las significancias de las diferencias entre cada uno de los mutantes en las distintas condiciones experimentales: \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo, p>0.05.

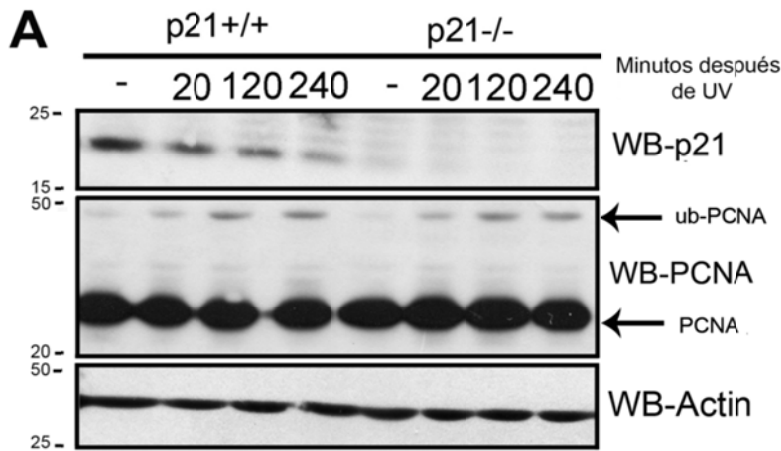
Utilizando otro diseño experimental, en donde se determina la tasa de división celular, evaluamos el efecto de estabilizar p21 luego de irradiación UV. Este ensayo, (CBPI), del inglés Cytokinesis Block Proliferation Index (141), mide indirectamente la velocidad con la que la célula se divide, sincronizando a las células en el estadio previo de la división de la membrana plasmática, citocinesis, a través del agregado de citocalasina B (su método de acción fue introducido en resultados anteriores y en la sección de Materiales y Métodos). Como resultado se obtienen células binucleadas que han logrado dividir el núcleo quedando arrestadas en el estadio previo a la citocinesis, mientras que aquellas que no llegaron a dividir el núcleo durante el tiempo del ensayo se observan como mononucleadas (Figura 5.17C). En primer lugar determinamos el número de células binucleadas en la situación sin estrés y observamos proporciones similares

de células binucleadas sobre el total de células transfectadas para cualquiera de los mutantes analizados (Figura 5.17D). Una vez establecido las proporciones de células binucleadas en la situación control, analizamos la tasa de división celular a distintas dosis de UV y observamos que la proporción de células binucleadas disminuyó de manera significativa en presencia del mutante estable de p21, sp21<sup>ΔC</sup> en comparación con el control E.V. y el doble mutante sp21<sup>ΔCΔPIP</sup> (Figura 5.17D).

Ambos experimentos demostraron que la estabilización de p21 luego de irradiación UV retrasa la velocidad de replicación sobre ADN lesionado, afectando la progresión por la fase S y la tasa de división celular.

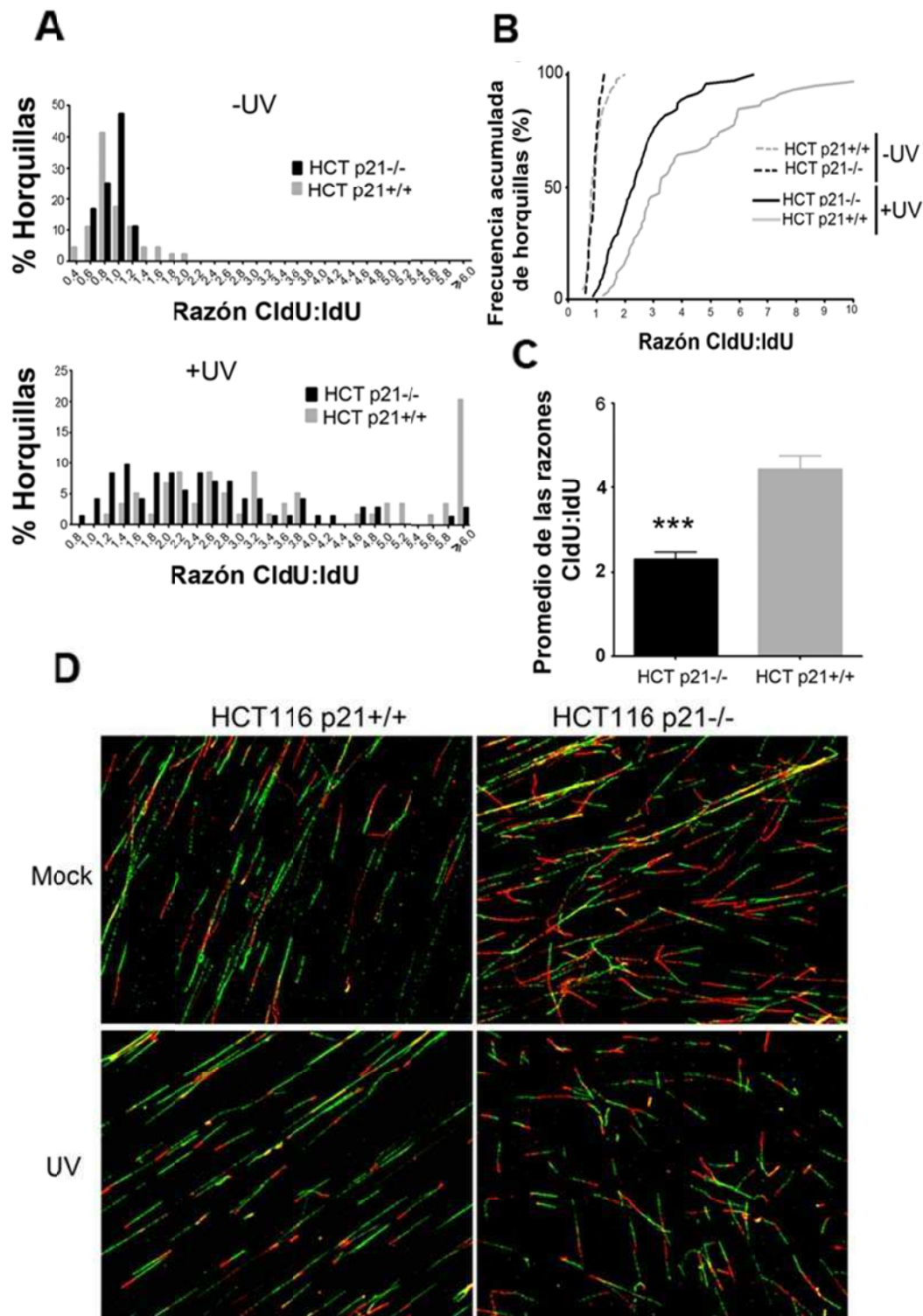
### *5.9 p21 endógeno modula la velocidad de replicación sobre ADN lesionado*

Uno de los interrogantes que surgió luego de analizar el comportamiento de la sobreexpresión y estabilización de p21, fue si niveles endógenos de p21 eran suficientes para modular la eficiencia de TLS en presencia de daño. Este interrogante se tornaba difícil de abordar dado que p21 se degrada luego de irradiación UV. Con la técnica del ensayo de fibras era posible evaluar a tiempos cortos después de UV (20 minutos) donde todavía hay una fracción de p21 que no fue totalmente degradada, si los niveles endógenos de p21 eran suficientes para afectar la velocidad de replicación sobre ADN lesionado. Utilizamos el par de líneas celulares isogénicas salvajes o nulas para p21 llamadas HCT116 p21<sup>+/+</sup> y p21<sup>-/-</sup> y determinamos en primer lugar los niveles de p21 luego de irradiación UV (Figura 5.18A), y observamos que a 20 minutos todavía hay una cantidad considerable de p21 en comparación con el tiempo 0, mientras que en las células nulas para p21 no se detectó p21 (Figura 5.18A).



**Figura 5.18:** Cinética de degradación de p21 luego de irradiación UV. **A)** Células HCT116 p21+/+ y p21-/- fueron irradiadas o no con 30J/m<sup>2</sup>, y levantadas a los distintos tiempos indicados. Las muestras fueron lisadas en buffer de carga para luego determinar los niveles de p21, PCNA-ub y Actina como control de carga.

Evaluamos la velocidad de replicación antes de la inducción de estrés, y no observamos diferencias en la progresión de las horquillas activas entre ambas líneas (Figura 5.19A panel superior). En contraste, luego de la exposición a luz UV observamos que las células con niveles endógenos detectables de p21 evidenciaban una velocidad de replicación menor sobre templado dañado, (Figura 5.19A panel inferior) en comparación con las células que no expresan p21. Este resultado se infiere por el corrimiento de la distribución de las razones CldU:IdU hacia valores más altos en el gráfico de frecuencias, resultado de una velocidad menor del segundo tramo (IdU) (Figura 5.19D). Si analizamos el grafico de frecuencias acumuladas, la ausencia de p21 propicia una velocidad de replicación más veloz sobre templados dañados (Figura 5.19B). Este resultado también se observa si promediamos el total de razones CldU:IdU analizadas, en donde la falta de p21 arroja un valor significativamente menor que el observado para las células que expresan niveles endógenos de p21 (Figura 5.19C).



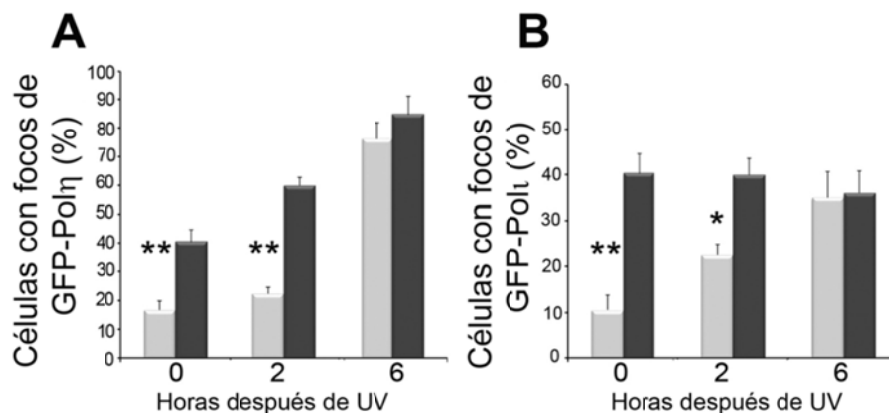
**Figura 5.19:** p21 endógeno modula la replicación sobre ADN lesionado. **A)** Células HCT116 p21<sup>+/+</sup> y p21<sup>-/-</sup> se realizaron incorporaciones de CldU por 20 minutos y consecutivamente de IdU por otros 20 minutos más, en una situación sin UV y con UV. Luego las células fueron tratadas según el protocolo de fibras, se midieron los largos de cada sección de la fibra y se calcularon las razones CldU:IdU para cada fibra analizada. Panel superior: distribución de frecuencias de las razones de CldU:IdU de las fibras cuantificadas en una situación control para ambas líneas celulares. Panel inferior: distribución de frecuencias de las razones de CldU:IdU de las fibras cuantificadas luego de irradiación UV (30J/m<sup>2</sup>). **B)** Células tratadas como en A). Gráfico de las frecuencias acumuladas de

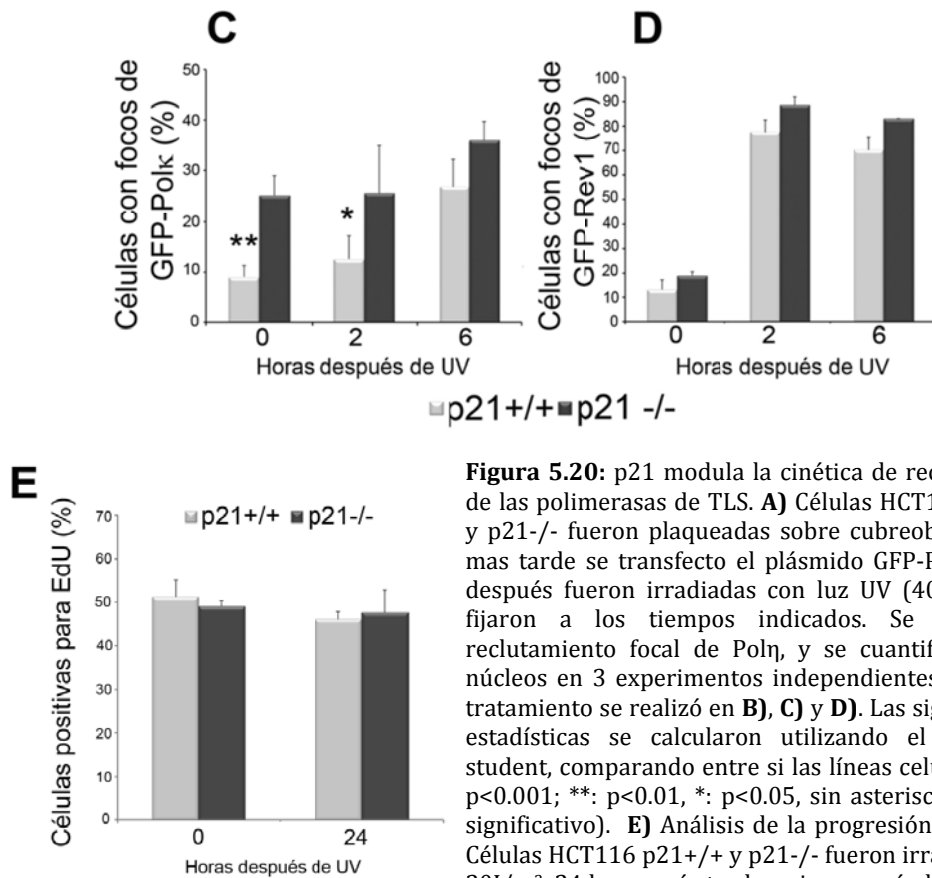


cada razón CldU:IdU. **C)** Promedio de las razones CldU:IdU luego de irradiación UV, del experimento graficado en A) Se cuantificaron 75 fibras individuales para cada variable. La significancia estadística de las diferencias en los promedios de las razones CldU:IdU para cada línea celular se calculó utilizando el test no paramétrico Mann-Whitney (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , sin asterisco = NS –no significativo). **D)** Imágenes confocales representativas de las fibras analizadas en ambas líneas celulares en una situación control (panel superior) y después de inducido el daño (panel inferior).

### 5.9.1 p21 endógeno afecta la cinética de reclutamiento de las polimerasas de TLS

Siguiendo la misma línea de pensamiento evaluamos si efectivamente el efecto observado sobre la replicación de ADN lesionado era consecuencia de un efecto de p21 sobre las polimerasas de TLS. Para esto analizamos el reclutamiento focal de las polimerasas de TLS antes y después de la exposición al daño genómico. Observamos que antes de generada la lesión y aun a tiempos cortos después de inducir el daño por irradiación UV, las células HCT116 p21<sup>-/-</sup> presentaban mayor cantidad de células con reclutamiento focal de GFP-Pol  $\eta$ , GFP-Pol  $\kappa$  y GFP-Pol  $\iota$  (Figura 5.20 A, B y C) en comparación con las HCT116 p21<sup>+/+</sup>. A tiempos más largos, 6hs después de irradiación UV, el reclutamiento focal de las polimerasas de TLS fue similar en ambas líneas celulares, lo que concuerda con una eficiente degradación de p21 permitiendo que las polimerasas especializadas interaccionen con PCNA (Figura 5.20 A, B y C). En el caso de la polimerasa Rev1, no se observaron diferencias en la cinética de reclutamiento focal entre ambas líneas antes o después de irradiación UV (Figura 5.20D), lo que era esperable de acuerdo con lo observado los experimentos de estabilización de p21 que indican que GFP-Rev1 puede unirse a PCNA aun en presencia de p21 a través de su BRCT o de su dominio de unión a otras polimerasas.





**Figura 5.20:** p21 modula la cinética de reclutamiento de las polimerasas de TLS. **A)** Células HCT116 p21+/+ y p21-/- fueron plaqueadas sobre cubreobjetos, 24hs más tarde se transfeció el plásmido GFP-Pol $\eta$  y 24hs después fueron irradiadas con luz UV (40J/m<sup>2</sup>) y se fijaron a los tiempos indicados. Se analizó el reclutamiento focal de Pol $\eta$ , y se cuantificaron 200 núcleos en 3 experimentos independientes. El mismo tratamiento se realizó en **B), C)** y **D)**. Las significancias estadísticas se calcularon utilizando el test *t* de student, comparando entre si las líneas celulares. (\*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, sin asterisco = NS –no significativo). **E)** Análisis de la progresión por fase S: Células HCT116 p21+/+ y p21-/- fueron irradiadas con 30J/m<sup>2</sup>, 24 horas más tarde se incorporó al medio EdU

por 5 minutos inmediatamente previo a la fijación. 200 núcleos fueron cuantificados según la positividad para este marcador de fase S, en dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que la ausencia de p21 altera la cinética de reclutamiento focal de las polimerasas de TLS, en comparación con las células que expresan p21 endógeno. Otra observación interesante es el aumento de células con reclutamiento focal de las polimerasas especializadas en situaciones control en ausencia de p21, lo que podría afectar la integridad genómica de la célula ya que estas polimerasas son altamente mutagénicas sobre templados no lesionado. La diferencia observada en la velocidad de reclutamiento focal se pierde a tiempos más largos luego de irradiación UV lo que correlaciona con una eficiente degradación de p21. En conjunto estos resultados podrían indicar que p21 endógeno modula la cinética de reclutamiento de las polimerasas de TLS, retrasando la formación de los complejos de las polimerasas de TLS y PCNA a tiempos cortos después de irradiación UV lo que podría generar retrasos transitorios en la replicación de ADN lesionado. Este retraso en la progresión de

horquillas activas se pierde a medida que p21 se degrada y no tiene consecuencias sobre la progresión de la fase S (Figura 5.20E).

En conjunto p21 en una situación sin estrés, es necesario para prevenir el cargado innecesario de las polimerasas especializadas a templados no dañados y mantener la integridad genómica. Mientras que en respuesta al daño inducido por luz UV, p21 debe ser eficientemente degradado para permitir el eficaz y eficiente funcionamiento de la síntesis por translesión, promoviendo la replicación sobre ADN lesionado, manteniendo la integridad genómica y la viabilidad celular.

---

---

## 6 Discusión

La mayoría de los laboratorios que estudian la respuesta celular a estrés genotóxico esperan una regulación positiva de p21 cuando el ADN es dañado por cualquier agente externo. Esto se debe a que p21 es un excelente blanco del factor transcripcional p53 y a que se necesitan altos niveles de p21 para promover su bien caracterizada función de bloqueo del ciclo celular. En este trabajo de tesis se demostró que los bajos niveles endógenos de p21, lejos de ser residuales y carentes de función, tienen un rol en el control de la replicación de ADN lesionado en etapas tempranas luego de la exposición a luz UV. La degradación de los niveles basales de p21 es necesaria para la correcta replicación de ADN durante respuesta celular a UV siendo necesaria su degradación para prevenir defectos en la progresión de la fase S como también para evitar excesiva muerte celular e incrementos de la inestabilidad genómica. De hecho, la estabilización forzada de p21 luego de irradiación UV, bloquea la interacción de las polimerasas especializadas de TLS con PCNA previniendo la formación de complejos necesarios para la acción de la TLS. En este escenario, las alteraciones causadas en la replicación de ADN lesionado correlacionan con defectos persistentes en la progresión de la fase S, con la acumulación de marcadores de estrés replicativo ( $\gamma$ H2AX y 53BP1) y con la pérdida de estabilidad genómica.

### *6.1 p21 debe ser removido de PCNA en horquillas en replicación activas que encuentra ADN molde dañado por irradiación UV.*

---

Como se detalló en la sección de introducción, por mucho tiempo se validó y se aceptó como dogma central del estrés celular, el aumento en los niveles de p21 dependientes de p53 en respuesta a agentes estresores como la irradiación gamma. Este aumento de p21 mantiene la viabilidad celular a través de la promoción del arresto del ciclo celular(142), permitiendo la remoción del daño y evitando que la célula entre en fase replicativa en presencia de las lesiones generadas por los agentes estresores. El escenario cambia completamente cuando

la célula es expuesta a irradiación UV. En este caso, aun con una eficiente acumulación de p53, p21 no aumenta sus niveles de expresión sino por el contrario, se observa una disminución en los niveles de p21 que disminuyen por debajo del nivel endógeno. Esto ocurre en manera independiente al aumento de p53 y principalmente en células con una alta tasa de proliferación (114). La acelerada degradación de p21 por debajo de los niveles basales nos sugirió la existencia de funciones de p21 todavía no descritas en la respuesta celular a irradiación UV (114).

Nuestros resultados indicaron que la relevancia biológica de la degradación de p21 está asociada a la promoción de la replicación de ADN dañado; específicamente promoviendo la interacción entre PCNA y las polimerasas especializadas como consecuencia de la degradación de p21. Esto se corroboró al observar alteraciones persistentes en la progresión de la fase S cuando p21 no puede ser eficientemente degradado. También registramos un aumento de marcadores de estrés replicativo asociados a la expresión estable de p21: una marcada inducción de fosforilación de la histona H2AX en todo el núcleo, que como se detalló en la introducción, sugiere que los defectos en la activación de TLS causados por la expresión estable de p21 causan un desacople de horquillas activas alterando la dinámica de la replicación, la morfología de la cromatina y finalmente, posiblemente causando la aparición de cortes en la doble cadena (CDC) de ADN como consecuencia de una tensión extrema de horquillas de replicación frenadas por ADN lesionado. Sosteniendo los datos obtenidos mediante el monitoreo de la fosforilación de H2AX, también observamos la aparición de focos de 53BP1, una proteína considerada como marcador específico de CDCs. Teniendo en cuenta que la irradiación UV no genera por si sola cantidades detectables de CDC, la acumulación de 53BP1 indicaría que el bloqueo de TLS por parte de p21 causaría un bloqueo sostenida de horquillas en lesiones, las cuales eventualmente colapsan, aumentando el número de CDCs. En concordancia con el aumento de CDC en el ADN, observamos también la aparición de micronúcleos (MN), un indicador de inestabilidad genómica asociado a la pérdida de información genética, posiblemente consecuencia de regiones dañadas del ADN que no fueron eficientemente replicadas por falta de TLS. Esta hipótesis se refuerza con la

---

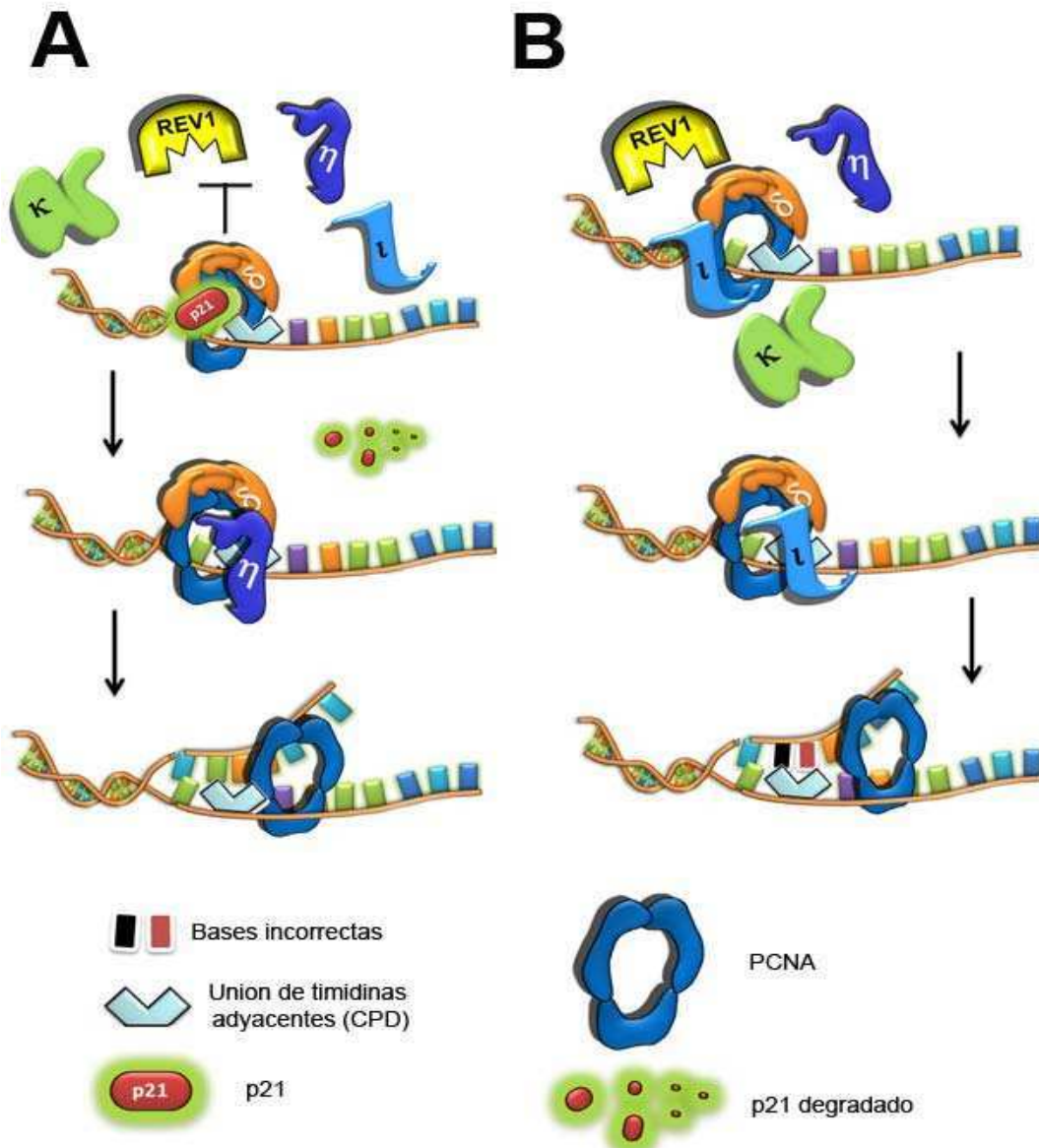
evidencia de la formación MN asociados a las células transitando la fase S y expresando el estable de p21 luego de irradiación UV

Otra interesante observación que se desprende de nuestros resultados es que los niveles endógenos de p21 reprimen o al menos bloquean los eventos iniciales de TLS luego de irradiación UV. Esta evidencia surge de la disminución observada en la progresión de horquillas activas sobre ADN lesionado en células donde p21 todavía es detectable, (fracción sin degradar) en comparación con su contraparte, células sin la expresión de p21, que progresan de manera más rápida sobre ADN lesionado. Otra línea de evidencia surge del aumento de la fracción de células con focos de polimerasas de TLS en ausencia de p21, aun en situaciones sin estrés, si se compara con la cinética de reclutamiento de las polimerasas de TLS observada para las células p21+/+, donde se ve una clara inducción en respuesta a UV. Estas observaciones podrían atribuirle una función a p21 en las etapas iniciales de TLS, donde los niveles de p21 son todavía detectables. Como la mayoría de las células humanas expresan niveles endógenos detectables de p21, proponemos que la demora transiente en eventos de TLS causada por el tiempo que requiere la degradación de p21 asociada a PCNA debería ser en realidad beneficiosa para la célula. En otras palabras, la activación de TLS podría beneficiarse de un “chequeo” previo a cargo de p21 que podría servir para limitar los eventos de TLS a los estrictamente necesarios o promover TLS poco mutagénica. Esto podría estar sugerido por experimentos realizando utilizando un modelo de replicación de ADN plásmidico donde una lesión artificialmente introducida en una hebras es enfrentada a un gap. Dicho plásmido es transfectado en células humanas y se espera que solo un evento de TLS seguido de una ligación pueda darle capacidad transformante a dicho plásmido. Utilizando este modelo , el grupo de Livneh y colaboradores demostró que los niveles endógenos de p21 disminuyen la eficiencia pero aumentan la precisión de los eventos de TLS (143). Este grupo demostró que la expresión de p21 causa una disminución en los eventos de TLS si se comparan con el número de eventos que se detectan en células que no expresan p21. Sin embargo, los eventos de TLS en presencia de p21 son mucho más precisos que lo observado en ausencia de p21 Esto sugiere que retardar un evento de TLS puede hacerlo menos mutagénico. Especulamos entonces que p21 puede promover la elección de la polimerasa menos mutagénica

para cada lesión; por un lado retrasando el evento de TLS y permitiendo la mejor llegada de todas las polimerasas especializadas que pueden realizar la función y por el otro promoviendo la competencia activa por dicha lesión. Es importante destacar que en nuestro modelo los niveles endógenos de p21 retrasan la replicación y la organización focal de p21 y que en el modelo plásmidico del grupo de Livneh es p21 endógeno quien reduce la mutagénesis de la TLS. Juntos estos datos indican que los eventos de TLS precedidos por la degradación de p21 pueden ser menos mutagénicos que los que no encuentran dicha barrera inicial.

### *6.1.1 Precisión de la TLS: balance entre degradación de p21 y acceso de las polimerasas especializadas a PCNA.*

De acuerdo con nuestros resultados y lo observado por el grupo de Livneh, proponemos un modelo en donde existe un balance entre dos procesos opuestos: la degradación de p21 acoplada a PCNA en respuesta a irradiación UV, y el impedimento del cargado de las polimerasas de TLS a PCNA por parte de p21. Creemos que un fino balance entre estos dos procesos es lo que favorece una TLS más precisa. Si tomamos en cuenta que evolutivamente se seleccionó una polimerasa especializada en particular para sintetizar sobre los CDPs (Pol  $\eta$ ), quiere decir que la selección de una polimerasa frente a otra es esperada. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que indiquen como dicho proceso de selección se lleva a cabo. Nuestros datos obtenidos con p21 podrían sugerir un mecanismo molecular de selección. La degradación de p21 podría generar una ventana temporal que permite el reclutamiento de todas las polimerasas TLS antes que una polimerasa se seleccione y lleve a cabo la TLS. Esto podría explicar por qué la degradación gradual de p21 en respuesta a UV, promueve la llegada de todas las posibles polimerasas y la selección de la adecuada para dicho evento de TLS. Esta línea de pensamiento concuerda con los resultados obtenidos por el grupo de Livneh, que muestran que la depleción de p21 aumenta los eventos de TLS mutagénicos. Esto sugiere que en ausencia de p21, la polimerasa de TLS que efectivamente sintetizan ADN en oposición a la lesión no es la polimerasa evolutivamente preparada para lidiar con este tipo de daño, sino la primera que pudo cargarse sobre PCNA. (Figura 6.1)



**Figura 6.1:** Modelos de cooperación entre la degradación de p21 en respuesta a irradiación UV y el acceso de las polimerasas de TLS a PCNA. **A)** En este modelo los niveles endógenos de p21 está unido a PCNA sin interferir con la replicación normal. La horquilla de replicación se encuentra con una lesión (CPD) y p21 se degrada, generando una ventana temporal para la elección de la mejor polimerasa para sintetizar sobre el CPD. La degradación de p21 deja accesible el sitio de unión a PCNA para las polimerasas de especializadas, y Pol  $\eta$  es cargada a PCNA para realizar la TLS. En consecuencia la síntesis a través de la lesión es precisa (incorpora dos adeninas en oposición a la lesión) y la horquilla continúa con la replicación normal. **B)** En este caso p21 no está asociado a PCNA, no existe la posibilidad de seleccionar la mejor polimerasa TLS sino que el evento de TLS es realizado por la primera polimerasa que llega al sitio de pausa replicativa (pudiendo ser pol  $\eta$  pero también pudiendo ser otra polimerasa más mutagénica, como representado en este caso por pol  $\iota$ ). En este caso la excesiva accesibilidad de las polimerasas especializadas a PCNA impide una correcta selección de la menos mutagénica, e incorporando innecesarias bases erróneas frente a la lesión. En ambos casos (A y B) la continuidad replicativa está garantizada. Las consecuencias de un bloqueo global de TLS causado por la expresión estable de p21 se discutió en el texto.



Según nuestros datos p21 estaría regulando la actividad de las polimerasas especializadas a través del sitio de unión a PCNA (PIP box) de p21. Existe otro nivel de regulación de TLS por parte de p21 no contemplado en esta tesis y que es necesario mencionar. Nuestro laboratorio demostró que p21 también modula la ubiquitinación de PCNA (106, 143) por lo que p21 controla simultáneamente dos variables centrales para TLS. Sin embargo, dado que la ubiquitinación de PCNA es regulada por la interacción p21/CDKs (106), en nuestro contexto experimental la ubiquitinación de PCNA no se encuentra afectada, ya que las construcciones de p21 que utilizamos tienen mutado el sitio de unión a CDK, p21<sup>ΔC</sup>, sp21<sup>ΔC</sup> y sp21<sup>ΔCΔPIP</sup>, respectivamente (Ver Figura 4.1 C). Aunque se requieren de más evidencias experimentales para dilucidar la contribución que el control de la ubiquitinación de PCNA por p21 tiene sobre la activación de procesos de TLS, este trabajo demuestra de manera contundente el control que ejerce p21 sobre la interacción de las polimerasas de TLS con PCNA, de manera independiente a la ubiquitinación de PCNA. Además, nuestros datos indican que p21 puede inhibir el cargado de polimerasas TLS aun cuando la ubiquitinación de PCNA es eficiente (Figura 5.5 B). Dado el efecto sensibilizante que esta inhibición global de TLS tiene sobre la sobrevivencia celular es posible proponer que la inhibición global de TLS mediada por p21 o por drogas aún no descubiertas podría representar una alternativa terapéutica de interés.

## *6.2 Competición y cooperación: un balance clave en horquillas detenidas frente a una lesión*

p21 se degrada después de irradiación UV en manera dosis dependiente (106, 112, 114, 117), evidencia que es consistente con la probabilidad de que la degradación de p21 ocurra en horquillas que se van encontrando con las lesiones, siendo más la cantidad de lesiones mientras más alta se la dosis de irradiación UV, aumentando la proteólisis de p21. En este trabajo demostramos que la interacción sostenida entre p21 y PCNA luego de irradiación UV, impide la progresión de horquillas replicativas sobre ADN lesionado y el reclutamiento de polimerasas especializadas a focos replicativos. Es lógico preguntarse cómo funciona dicho

bloqueo, ya que p21 no afecta a las polimerasas replicativas que también poseen PIP box y bien podrían competir con p21 por los sitios de unión a PCNA. Existen numerosas evidencias que indican que la interacción de p21 con PCNA es la más fuerte observada hasta el momento (144). El hecho de que las polimerasas replicativas no se vean afectadas por la presencia de p21, puede ser consecuencia de la estructura multi-subunidad de las polimerasas replicativas (145). Esta característica les confiere mayor capacidad de unión con PCNA sin tener que competir por un solo sitio de unión. Por otro lado recientemente se describió una región de p21 más extensa que el conocido PIP box, responsable de la interacción con PCNA, el PIR (del inglés PCNA interacting region- including PIP box and NLS) que incluye el PIP box y la señal de localización nuclear (del inglés NLS)(146). Numerosas líneas de evidencia indican que el PIR de p21, es capaz de desplazar a las polimerasas de TLS de forma específica y eficiente de su interacción con PCNA. En primer lugar este trabajo de tesis demuestra que sp21<sup>ΔC</sup>, previene la interacción específicamente de las polimerasas especializadas con PCNA, Pol η, Polι y Polκ, sin alterar la interacción de las polimerasas replicativas involucradas en la replicación normal (97). Segundo, en condiciones de sobreexpresión de las polimerasas de TLS (GFP-Pols), niveles endógenos de p21 son capaces de impedir el reclutamiento de esas polimerasas a factorías de replicación, evidencia también aportada en este trabajo de tesis. Tercero, en un trabajo reciente se demostró que la sustitución del PIR de Pol κ, por el PIR de p21, aumenta la afinidad de interacción de la quimera Pol κ-PIRp21 por PCNA (5). Cuarto, también en trabajos recientes se demostró que la expresión de PIDD (del inglés p53 induced protein with death domain), una proteína capaz de romper la interacción entre p21 y PCNA a tiempos cortos luego de irradiación UV, induce un aumento en la ubiquitinación de PCNA, y un aumento en la fracción de Pol η unida a PCNA (147). En conjunto estas evidencias refuerzan la premisa de un balance entre competencia y cooperación, entre los factores que disparan la degradación de p21 (por ende su remoción de PCNA) y la activación de TLS. Podría decirse entonces que el paso crucial para una correcta TLS reside en una remoción a tiempo de p21 de horquillas detenidas frente a ADN lesionado.

### *6.2.1. PCNA y REV1: su contribución e importancia a la función de la TLS.*

Hasta el momento siempre se introdujo a PCNA como "la proteína" encargada de orquestar los procesos relacionados con la replicación de ADN lesionado, pero aún queda mucho por entender sobre la cooperación de PCNA con otras proteínas sobre las horquillas de replicación detenidas frente a una lesión. El grupo de Sale, en el año 2008 introdujo un modelo en donde Rev1 sería otro posible encargado de orquestar la activación de la TLS en horquillas detenidas frente a la lesión. De hecho, en ese manuscrito se provee evidencia que indica una separación espacial entre la acción de Rev1 y la ubiquitinación de PCNA. Mientras que la ubiquitinación de PCNA sería necesaria para los eventos de TLS post-replicativos retrasados ("gap filling" o llenado de brechas), Rev1 sería la encargada de la TLS dependiente de intercambio de polimerasas, acoplada a las horquillas de replicación activa(60). Interesantemente, la actividad catalítica de Rev1 no sería necesaria en este modelo por lo que su capacidad de interactuar (y probablemente, reclutar) otras polimerasas sería central para su acción en TLS.

Al mismo tiempo otros grupos de investigación demostraron que la acción de Rev1 podría no estar limitada a eventos de intercambio de polimerasas sino también participar en eventos post-replicativos de "gap" filling. Analizaron la contribución de Rev1 y sus dominios a la replicación de ADN lesionado, demostrando que el BRCT sería necesario para el intercambio de polimerasas en las horquillas de replicación detenidas, mientras que el C-terminal de la proteína podría cumplir una función orquestando la interacción de las polimerasas de TLS con PCNA en un modelo post replicativo (139). En todos los casos, Rev1 debería completar su acción en TLS en asociación con una polimerasa extensora debido a su incapacidad de introducir más de una base. A su vez se demostró que Rev1 interactúa con la subunidad accesoria de Pol  $\zeta$ , Rev7, mediando la interacción Rev1-Pol  $\zeta$ . Esta interacción sugiere que Rev1 y Pol  $\zeta$  pueden actuar en conjunto para realizar TLS sobre cualquier templado dañado, demostrándose en ese trabajo que efectivamente ambas polimerasas trabajan juntas para realizar la síntesis a través de la lesión. Es importante destacar que dicha síntesis debería ser siempre mutagénica ya que ambas polimerasas son poco fieles (148). Por todo lo mencionada es difícil predecir si la acción de Rev1 como iniciadora de TLS es

necesaria en todo contexto o solo cuando hay un defecto en la activación de TLS dependiente de polimerasas más fieles.

Considerando la existencia de eventos de TLS acoplados a la horquilla y post-replicativos y además la posibilidad que “actores” diferentes desencadenen ambos procesos resulta importante analizar el posible efecto de p21 sobre ambos procesos. El análisis directo de p21 sobre la replicación fue logrado utilizando el ensayo de fibras que, por su naturaleza, se asocia directamente a intercambios de polimerasas. Sin embargo, es imposible descartar que en los 20 minutos del ensayo se formaron pequeños gaps que fueron resueltos antes de la desnaturalización del ADN. La formación y resolución del gap podría disminuir la fibra de ADN en manera dependiente de gap filling y no exclusivamente de un evento acoplado a la horquilla. Por todo esto, si bien podemos concluir que p21 afecta la eficiencia de eventos de TLS no podemos asociarlos a eventos exclusivos de gap filling o de intercambio de polimerasas acoplado a la horquilla, por lo p21 podría afectar a ambos mecanismos por igual.

Por otro lado, es posible pensar que, si bien p21 es un inhibidor global de TLS, esta inhibición podría ser ineficiente en el bloqueo de al menos parte de los eventos de TLS dependientes de Rev1. Nuestros datos arrojaron evidencia de un bloqueo específico del reclutamiento de Rev1 a zonas de ADN dañado por parte de p21, sin alterar una fracción de Rev1 constante antes y después de irradiación UV. Esta fracción de focos constante de Rev1 podría estar asociada a PCNA a través de su BRCT, dominio que no puede ser competido por el PIP box de p21. Razonamos entonces que si bien p21 puede ser considerado un inhibidor global de polimerasas de TLS, algunos eventos de TLS podrían aún tener lugar cuando p21 no es degradado. Dichos eventos dependerían de la fracción de Rev1 reclutada al ADN durante la replicación no perturbada. Además, dado que Rev1 no es una polimerasa sino una C-transferasa, el completamiento del evento de TLS podría depender de Pol  $\zeta$ , por lo que el número de eventos de TLS no sería solo reducido o subóptimo, sino también mutagénicos.

Por todo esto, más investigación es necesaria no solo para dirimir la relación directa entre la degradación de p21 y la sobrevivencia celular sino también para revelar el efecto que un desbalance en la elección de polimerasas TLS causado

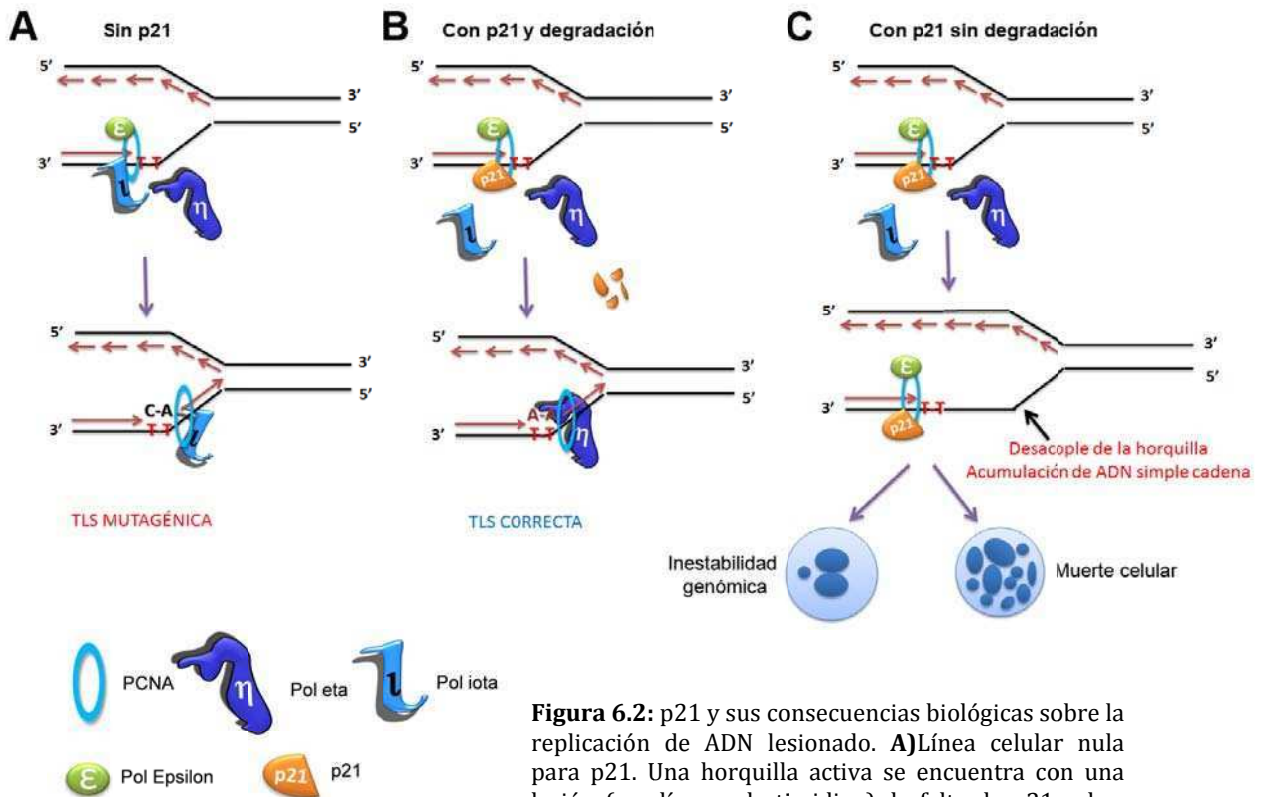
por la estabilización de p21 puede tener sobre la estabilidad genómica de la célula irradiada.

### *6.3 Regulación de TLS: p21 cumple con los requisitos para ser considerado un regulador negativo de TLS*

Durante muchos años la regulación del proceso de síntesis de ADN por translesión fue un área de poco desarrollo, hasta que se identificó la relación entre la acumulación de lesiones en el ADN y la activación de E3 ligasas que propiciaban TLS mediada por ubiquitinación de PCNA. Dicha modificación post-transcripcional de PCNA se asocia a la aparición de lesiones en el ADN que generen horquillas atascadas. La ubiquitina promueve el reclutamiento de polimerasas especializadas a PCNA ya que estas últimas poseen dominios UBM o UBZ (sitio de unión a residuos de ubiquitina)(28). Es por esto que hasta el momento el único regulador negativo aceptado en el campo para el proceso de TLS es el complejo encargado de la deubiquitinación de PCNA, el complejo USP1/UAF1 (149). Este complejo es necesario para deubiquitinar a PCNA durante la replicación no perturbada. USP1 es rápidamente degradado, después de la irradiación UV, presumiblemente para evitar la de-ubiquitinación de PCNA en lesiones encontradas en el ADN. De manera intrigante nuestros resultados resaltan similitudes entre p21 y USP1/UAF1, reforzando la función de p21 como regulador negativo de TLS. En primer lugar, tanto USP1 como p21 regulan la ubiquitinación de PCNA y la reorganización focal de las polimerasas especializadas. USP1 actúa removiendo el residuo de ubiquitina de PCNA, afectando negativamente la reorganización focal de Pol  $\eta$  (150). En cambio p21 regula la acción de TLS en al menos dos niveles, controlando no solo la ubiquitinación de PCNA sino también la organización focal de las polimerasas especializadas a través de sus sitios de interacción con CDKs (106) y PCNA respectivamente (descrito en este trabajo). Estos resultados sugieren que p21 y USP1 podrían cooperar en la regulación de los eventos de TLS para coordinar la mejor TLS posible. En segundo lugar, tanto p21 como USP1 son regulados de manera similar en respuesta a irradiación UV y al tratamiento con HU (hidroxiurea, droga que atasca horquillas activas por depleción de reservas de dNTPs). Mientras que la irradiación UV promueve la rápida degradación tanto de USP1 como de p21,

los niveles de ambas proteínas no se modifican luego del tratamiento con HU (96, 151). Esta regulación diferencial podría estar relacionada a diferentes estrategias celulares en respuesta a la irradiación UV y al uso de HU, muy posiblemente asociado al efecto diferencial de HU, que solo altera la velocidad de replicación por depletar a la célula de DNTPs, sin generar lesiones al ADN (152). De cualquier manera, el tratamiento con HU desencadena estrategias distintas a la degradación proteica tanto para p21 como para USP1: por un lado, impide la interacción de USP1 con su dominio activador, UAF1, (150, 151), y la interacción p21/PCNA (96), ambas interacciones son específicamente prevenidas en respuesta a HU y podrían desencadenar procesos necesarios para la reanudación de la replicación del ADN. En tercer lugar, la degradación proteica de USP1 y p21 no se limita a la fase replicativa. Recientemente se demostró que el complejo APC/CCdh1 (del inglés, *anaphase-promoting complex/cyclosome*(Cdh1)), desencadena la degradación de USP1 en G1 luego de irradiación UV (153). Funcionalmente la degradación de USP1 en G1 podría servir al pre-ensamblado de los complejos de polimerasas especializadas, favoreciendo su acción una vez que comience la fase replicativa (153). Sorprendentemente p21 también es degradado en G1 en respuesta a irradiación UV, inclusive en células arrestadas, observándose complejos de polimerasas en forma de focos en esta estadio (106). Aunque la función de los agregados de polimerasas especializadas en G1, es todavía desconocida (154), es indiscutible que la activa degradación de USP1 y p21 favorece la formación de estos complejos (153, 154).

En conjunto, las evidencias presentadas demuestran que al igual que USP1 p21 es un regulador negativo de TLS, que debe ser removido luego de irradiación UV para promover la síntesis de ADN lesionado. La necesidad de remover a p21 de horquillas detenidas está íntimamente asociado a la fuerte interacción que p21 tiene por PCNA y a su capacidad de impedir el cargado de polimerasas TLS al ADN lesionado por luz UV. La correcta respuesta celular a luz UV depende entonces de la degradación y remoción de p21 de horquillas de replicación activas. Defectos en la temporalidad de remoción de p21 de horquillas atascadas causa incrementos en la muerte celular y desencadena inestabilidad genómica (Figura 6.2). Estos datos en conjunto, provén un significado biológico a la inesperada regulación negativa de p21 observada después de irradiación UV.



**Figura 6.2:** p21 y sus consecuencias biológicas sobre la replicación de ADN lesionado. **A)** Línea celular nula para p21. Una horquilla activa se encuentra con una lesión (un dímero de timidina), la falta de p21 sobre PCNA genera un reclutamiento aleatorio y prematuro de las polimerasas especializadas reclutándose la que está más cerca. En este caso se representa a Pol  $\iota$ , y la TLS que se realiza sobre la lesión es mutagénica, incorporándose bases erróneas frente a la lesión. **B)** Línea celular con p21. Ante la presencia de una lesión en el ADN, la horquilla se detiene, p21 se degrada sobre la horquilla y se selecciona la polimerasa más adecuada para la síntesis sobre la lesión. En este caso es Pol  $\eta$ , e introduce las bases correctas en oposición al daño. **C)** Línea celular con p21 establemente unido a PCNA. En este contexto la horquilla que se detiene frente a la lesión, no puede degradar a p21, por lo que las polimerasas de TLS no pueden reclutarse y formar focos replicativos asociados a PCNA, impidiendo la acción de la TLS. En consecuencia, se produce un desacople de la horquilla, aumento de ADN simple cadena, lo que desencadena incremento de la inestabilidad genómica (MN) y muerte celular.

## 6.4 La síntesis de ADN por Translesión como posible blanco terapéutico

Durante los últimos años el entendimiento al proceso de TLS ha tomado más protagonismo, al plantear la duplicación del ADN como un molde imperfecto de replicación. Esto permitió el desarrollo de investigación dirigida a comprender como funcionan los mecanismos auxiliares de la replicación de ADN, sus implicancias y principalmente que los activa y como se regulan. Aunque hasta el momento no se han establecido estrategias terapéuticas que consideren esta variable, publicaciones recientes ofrecen información interesante con respecto al

rol de Pol  $\eta$  sobre ciertos tipos de quimioterapia. Se demostró inicialmente que células deficientes en Pol  $\eta$  son 3 veces más sensibles al tratamiento con drogas como el cisplatino y gemtabicina que las células que expresan normalmente esta polimerasa, y 10 veces más sensibles si se las expone a combinaciones de drogas como cisplatino/gemtabicina (155), un esquema de drogas comúnmente utilizado en tratamientos contra el cáncer. Por otro lado se han encontrado evidencias de cambios en la expresión y mutaciones en los genes que codifican para las polimerasas Pol  $\iota$  y Pol  $\kappa$  en tumores humanos (156). En conjunto, hay un gran número de evidencias que indican que la modulación del proceso de TLS puede alterar el efecto de un esquema terapéutico tradicional.

Asimismo, la inhibición transiente de la TLS podría ser beneficiosa para el tratamiento contra el cáncer. Este concepto fue difícil de evaluar hasta la fecha ya que la inhibición global de TLS fue difícil de alcanzar: la depleción de una polimerasa de TLS puede promover TLS dependiente de otras polimerasas y no necesariamente, disminución de los eventos de TLS. Por esto nuestro descubrimiento de un rol inhibitorio global de p21 sobre todas las polimerasas permitió evaluar dicha hipótesis, demostrando que p21 pueden incrementar la mortalidad de células irradiadas con luz UV, concepto que podría extrapolarse a drogas como el cisplatino, usadas en el tratamiento de varios cánceres ente los que se destaca el de ovario.

Por otro lado, no podemos ignorar el alerta sugerido por el incremento de inestabilidad genómica asociada a la inhibición global de TLS discutido en las Figuras 4.8 y 4.9. Sin embargo la oportunidad radica en lograr un incremento demasiado abrupto de la inestabilidad genómica esto debería generar células demasiado inestables para sobrevivir por lo que, usado en contextos adecuados la inestabilidad genómica causada por TLS podría asociarse a un incremento de muerte celular y no a la sobrevivencia de células genómicamente inestables. De hecho, muchos blancos terapéuticos evaluados en ensayos clínicos causan incremento en la inestabilidad genómica. Por ejemplo, la inhibición de la actividad quinasa de Chk1 está avanzando en ensayos clínicos de fase III(157). Si bien se sabe que la inactivación de Chk1 causa una inestabilidad genómica intrínseca, se supone que el éxito de dichos tratamientos reside en la combinación utilizada: no solo se inhibe



el blanco específico (en este caso Chk1 pero también podría ser TLS) sino que se combina esto con un tratamiento que permite incrementar mortalidad.

De hecho, la búsqueda de combinaciones inteligentes que involucren un cambio en el “background” genético de la célula tumoral se conoce como búsqueda de “letalidad sintética”, una estrategia terapéutica que se está explorando en la actualidad. El principio de la letalidad sintética es el de combinar de dos eventos que pueden ser tolerados por separados, pero cuya combinación se torna letal para la célula. El éxito de este esquema fue reportado para la inhibición de mecanismos de reparación de cortes en una cadena de ADN (PARPrilación) en un contexto defectuoso para la reparación por recombinación homóloga (defectos en la expresión de BRCA1 o BRCA2). La letalidad incrementada parece surgir porque los cortes en cadenas simples de ADN no reparados (a causa de la inhibición de PARPs) necesitan de la recombinación homóloga para el mantenimiento de la replicación (dependiente de BRCA1 y BRCA2)(158). Por esto, la inhibición de ambos mecanismos causa un sustancial incremento de la muerte celular.

Dentro del concepto de letalidad sintética nuestros datos sugieren que la acumulación de lesiones causadas por cisplatino, en un contexto deficiente para TLS como el provocado por la expresión estable de p21 debería incrementar la mortalidad celular. Este concepto que será evaluado en nuestro laboratorio y podrá ser también perfeccionado mediante la creación de fármacos que bloqueen TLS en manera similar a p21. Por todo lo aquí discutido, proponemos a la inhibición de TLS como una estrategia terapéutica novedosa que podría mejorar tratamientos ya existentes.

## 7 Conclusiones generales

- i. La interacción sostenida entre p21 y PCNA luego de la exposición a luz UV genera la acumulación de marcadores de estrés replicativo, evidenciado tanto por la inducción de  $\gamma$ H2AX como por la aparición de focos de 53BP1.
- ii. La eficiente degradación de p21 luego de irradiación UV previene la acumulación de ADN dañado, promoviendo la supervivencia celular y la estabilidad genómica.
- iii. La estabilización de p21 produce un retraso en la progresión de horquillas sobre ADN lesionado. Esta modulación negativa es a través de su sitio de unión a PCNA (PIP box), ya que la estabilización de un mutante de p21 que no interactúa con PCNA no induce ningún efecto sobre la replicación de ADN lesionado.
- iv. El proceso biológico promovido por la degradación de p21 luego de irradiación UV es la síntesis de ADN por translesión (TLS), bloqueando el reclutamiento a focos replicativos de todas las polimerasas de TLS luego de irradiación UV a través de su PIP box.
- v. p21 endógeno controla la mutagénesis inducida por TLS promoviendo la correcta activación de la TLS a través de la degradación gradual de p21, favoreciendo la selección de la polimerasa más apta para las lesiones causadas por irradiación UV.
- vi. p21 actúa como regulador negativo de la TLS, inhibiendo su acción innecesaria y promoviendo su correcta activación, manteniendo un balance positivo entre mutagénesis y supervivencia celular.
- vii. Nuestra investigación sugiere que la inhibición global de TLS por parte de p21 podría ser beneficiosa como estrategia terapéutica contra el cáncer, utilizando la inhibición de TLS en combinación en diversos contextos terapéuticos con el objetivo de sensibilizar a las células tumorales al efecto generado por las drogas quimioterapéuticas.

## 8 Referencias bibliográficas

1. Lindahl T & Barnes DE (2000) Repair of endogenous DNA damage. (Translated from eng) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:127-133 (in eng).
2. Jackson SP & Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461(7267):1071-1078.
3. Jackson DA & Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* 140(6):1285-1295.
4. Gilbert DM (2007) Replication origin plasticity, Taylor-made: inhibition vs recruitment of origins under conditions of replication stress. (Translated from eng) *Chromosoma* 116(4):341-347 (in eng).
5. Jones RM & Petermann E (2012) Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J* 443(1):13-26.
6. Moldovan GL, Pfander B, & Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129(4):665-679.
7. Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, & Oda M (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? (Translated from eng) *Annual review of biochemistry* 79:89-130 (in eng).
8. Nick McElhinny SA, Gordenin DA, Stith CM, Burgers PM, & Kunkel TA (2008) Division of labor at the eukaryotic replication fork. (Translated from eng) *Mol Cell* 30(2):137-144 (in eng).
9. Zheng L & Shen B (2011) Okazaki fragment maturation: nucleases take centre stage. (Translated from eng) *Journal of molecular cell biology* 3(1):23-30 (in eng).
10. Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, & Cimprich KA (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. (Translated from eng) *Genes Dev* 19(9):1040-1052 (in eng).
11. Walter J & Newport J (2000) Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. (Translated from eng) *Mol Cell* 5(4):617-627 (in eng).
12. Makovets S, Herskowitz I, & Blackburn EH (2004) Anatomy and dynamics of DNA replication fork movement in yeast telomeric regions. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 24(9):4019-4031 (in eng).
13. Miller KM, Rog O, & Cooper JP (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. (Translated from eng) *Nature* 440(7085):824-828 (in eng).

14. Wang Y, Vujcic M, & Kowalski D (2001) DNA replication forks pause at silent origins near the HML locus in budding yeast. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 21(15):4938-4948 (in eng).
15. Brewer BJ (1988) When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the E. coli chromosome. (Translated from eng) *Cell* 53(5):679-686 (in eng).
16. Brewer BJ & Fangman WL (1988) A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. (Translated from eng) *Cell* 55(4):637-643 (in eng).
17. Deshpande AM & Newlon CS (1996) DNA replication fork pause sites dependent on transcription. (Translated from eng) *Science* 272(5264):1030-1033 (in eng).
18. Hyrien O (2000) Mechanisms and consequences of replication fork arrest. (Translated from eng) *Biochimie* 82(1):5-17 (in eng).
19. Mitchell DL, Brash DE, & Nairn RS (1990) Rapid repair kinetics of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts in human cells are due to excision rather than conformational change. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 18(4):963-971 (in eng).
20. Prakash S, Johnson RE, & Prakash L (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* 74:317-353.
21. Ling H, *et al.* (2004) Crystal structure of a benzo[a]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2265-2269 (in eng).
22. Yang W (2003) Damage repair DNA polymerases Y. (Translated from eng) *Current opinion in structural biology* 13(1):23-30 (in eng).
23. Goodman MF (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. (Translated from eng) *Annual review of biochemistry* 71:17-50 (in eng).
24. Kunkel TA (2004) DNA replication fidelity. (Translated from eng) *J Biol Chem* 279(17):16895-16898 (in eng).
25. Lehmann AR, *et al.* (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* 6(7):891-899.
26. Ling H, Boudsocq F, Plosky BS, Woodgate R, & Yang W (2003) Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution. (Translated from eng) *Nature* 424(6952):1083-1087 (in eng).
27. Yagi Y, *et al.* (2005) DNA polymerases eta and kappa are responsible for error-free translesion DNA synthesis activity over a cis-syn thymine dimer in *Xenopus laevis* oocyte extracts. (Translated from eng) *DNA Repair (Amst)* 4(11):1252-1269 (in eng).
28. Waters LS, *et al.* (2009) Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev* 73(1):134-154.

29. Masutani C, *et al.* (1999) Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *Embo J* 18(12):3491-3501.
30. Lehmann AR (2005) Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett* 579(4):873-876.
31. Johnson RE, Kondratick CM, Prakash S, & Prakash L (1999) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* 285(5425):263-265.
32. Abdulovic AL & Jinks-Robertson S (2006) The in vivo characterization of translesion synthesis across UV-induced lesions in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into Pol zeta- and Pol eta-dependent frameshift mutagenesis. (Translated from eng) *Genetics* 172(3):1487-1498 (in eng).
33. Gibbs PE, McDonald J, Woodgate R, & Lawrence CW (2005) The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol eta, Pol zeta, Rev1 protein and Pol32 in the bypass and mutation induction of an abasic site, T-T (6-4) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer. (Translated from eng) *Genetics* 169(2):575-582 (in eng).
34. Lin Q, *et al.* (2006) Increased susceptibility to UV-induced skin carcinogenesis in polymerase eta-deficient mice. (Translated from eng) *Cancer Res* 66(1):87-94 (in eng).
35. Dumstorf CA, *et al.* (2006) Participation of mouse DNA polymerase iota in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48):18083-18088 (in eng).
36. Rey L, *et al.* (2009) Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol Cell Biol* 29(12):3344-3354.
37. Bergoglio V, *et al.* (2013) DNA synthesis by Pol eta promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. (Translated from eng) *The Journal of cell biology* 201(3):395-408 (in eng).
38. Tissier A, *et al.* (2000) Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase iota. (Translated from eng) *EMBO J* 19(19):5259-5266 (in eng).
39. Johnson RE, Washington MT, Haracska L, Prakash S, & Prakash L (2000) Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406(6799):1015-1019.
40. Kannouche P, *et al.* (2003) Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *Embo J* 22(5):1223-1233.
41. Vidal AE, *et al.* (2004) Proliferating cell nuclear antigen-dependent coordination of the biological functions of human DNA polymerase iota. *J Biol Chem* 279(46):48360-48368.

42. Ohashi E, *et al.* (2000) Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase kappa. (Translated from eng) *Genes Dev* 14(13):1589-1594 (in eng).
43. Ogi T, *et al.* (2001) Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription. (Translated from eng) *Genes Cells* 6(11):943-953 (in eng).
44. Ogi T, Kannouche P, & Lehmann AR (2005) Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci. (Translated from eng) *J Cell Sci* 118(Pt 1):129-136 (in eng).
45. Ogi T, Shinkai Y, Tanaka K, & Ohmori H (2002) Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15548-15553.
46. Friedberg EC, Lehmann AR, & Fuchs RP (2005) Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* 18(5):499-505.
47. Haracska L, Prakash S, & Prakash L (2002) Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase. (Translated from eng) *J Biol Chem* 277(18):15546-15551 (in eng).
48. Haracska L, *et al.* (2001) Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. (Translated from eng) *Genes Dev* 15(8):945-954 (in eng).
49. Masuda Y, Takahashi M, Fukuda S, Sumii M, & Kamiya K (2002) Mechanisms of dCMP transferase reactions catalyzed by mouse Rev1 protein. (Translated from eng) *J Biol Chem* 277(4):3040-3046 (in eng).
50. Jansen JG, *et al.* (2005) The BRCT domain of mammalian Rev1 is involved in regulating DNA translesion synthesis. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 33(1):356-365 (in eng).
51. Murakumo Y, *et al.* (2000) A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. (Translated from eng) *J Biol Chem* 275(6):4391-4397 (in eng).
52. Guo C, *et al.* (2006) REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo. *Mol Cell* 23(2):265-271.
53. Akagi J, *et al.* (2009) Interaction with DNA polymerase eta is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. (Translated from eng) *DNA Repair (Amst)* 8(5):585-599 (in eng).
54. Guo C, *et al.* (2003) Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *Embo J* 22(24):6621-6630.
55. Ohashi E, *et al.* (2004) Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes Cells* 9(6):523-531.

56. Tissier A, *et al.* (2004) Co-localization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol eta and REV1 protein. *DNA Repair (Amst)* 3(11):1503-1514.
57. Masuda Y, Ohmae M, Masuda K, & Kamiya K (2003) Structure and enzymatic properties of a stable complex of the human REV1 and REV7 proteins. (Translated from eng) *J Biol Chem* 278(14):12356-12360 (in eng).
58. Nelson JR, Lawrence CW, & Hinkle DC (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. (Translated from eng) *Science* 272(5268):1646-1649 (in eng).
59. Ross AL, Simpson LJ, & Sale JE (2005) Vertebrate DNA damage tolerance requires the C-terminus but not BRCT or transferase domains of REV1. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 33(4):1280-1289 (in eng).
60. Edmunds CE, Simpson LJ, & Sale JE (2008) PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Mol Cell* 30(4):519-529.
61. Kannouche PL, Wing J, & Lehmann AR (2004) Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 14(4):491-500.
62. Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, & Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419(6903):135-141.
63. Bienko M, *et al.* (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* 310(5755):1821-1824.
64. Parker JL, Bielen AB, Dikic I, & Ulrich HD (2007) Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 35(3):881-889.
65. Lopes M, Foiani M, & Sogo JM (2006) Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* 21(1):15-27.
66. Calzada A, Hodgson B, Kanemaki M, Bueno A, & Labib K (2005) Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. (Translated from eng) *Genes Dev* 19(16):1905-1919 (in eng).
67. Carr AM, Paek AL, & Weinert T (2011) DNA replication: failures and inverted fusions. (Translated from eng) *Semin Cell Dev Biol* 22(8):866-874 (in eng).
68. Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, & Helleday T (2010) Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. (Translated from eng) *Mol Cell* 37(4):492-502 (in eng).
69. Budzowska M & Kanaar R (2009) Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys* 53(1):17-31.

70. Burhans WC & Weinberger M (2007) DNA replication stress, genome instability and aging. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 35(22):7545-7556 (in eng).
71. Branzei D & Foiani M (2005) The DNA damage response during DNA replication. (Translated from eng) *Current opinion in cell biology* 17(6):568-575 (in eng).
72. Branzei D & Foiani M (2007) Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. (Translated from eng) *DNA Repair (Amst)* 6(7):994-1003 (in eng).
73. Rogakou EP, Boon C, Redon C, & Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. (Translated from eng) *The Journal of cell biology* 146(5):905-916 (in eng).
74. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, & Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. (Translated from eng) *J Biol Chem* 273(10):5858-5868 (in eng).
75. Cleaver JE (2011) gammaH2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". (Translated from eng) *Photochemistry and photobiology* 87(6):1230-1239 (in eng).
76. Fernandez-Capetillo O, *et al.* (2003) H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. (Translated from eng) *Developmental cell* 4(4):497-508 (in eng).
77. Wossidlo M, *et al.* (2010) Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. (Translated from eng) *EMBO J* 29(11):1877-1888 (in eng).
78. Yin B & Bassing CH (2008) The sticky business of histone H2AX in V(D)J recombination, maintenance of genomic stability, and suppression of lymphoma. (Translated from eng) *Immunologic research* 42(1-3):29-40 (in eng).
79. Halicka HD, *et al.* (2005) Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. (Translated from eng) *Cell Cycle* 4(2):339-345 (in eng).
80. Staszewski O, Nikolova T, & Kaina B (2008) Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. (Translated from eng) *Environ Mol Mutagen* 49(9):734-740 (in eng).
81. de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, & Cleaver JE (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(15):6870-6875 (in eng).
82. Rothkamm K & Lobrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9):5057-5062 (in eng).
83. Limoli CL, Giedzinski E, Bonner WM, & Cleaver JE (2002) UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA



- double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1):233-238 (in eng).
84. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, & Fields S (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13):6098-6102 (in eng).
  85. Iwabuchi K, *et al.* (1998) Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. (Translated from eng) *J Biol Chem* 273(40):26061-26068 (in eng).
  86. Rappold I, Iwabuchi K, Date T, & Chen J (2001) Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. (Translated from eng) *The Journal of cell biology* 153(3):613-620 (in eng).
  87. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, & Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151(7):1381-1390.
  88. Anderson L, Henderson C, & Adachi Y (2001) Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 21(5):1719-1729 (in eng).
  89. Bork P, *et al.* (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. (Translated from eng) *FASEB J* 11(1):68-76 (in eng).
  90. Callebaut I & Mornon JP (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. (Translated from eng) *FEBS Lett* 400(1):25-30 (in eng).
  91. Ward IM, Minn K, van Deursen J, & Chen J (2003) p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 23(7):2556-2563 (in eng).
  92. Yamane K, Wu X, & Chen J (2002) A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 22(2):555-566 (in eng).
  93. Dotto GP (2000) p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471(1):M43-56.
  94. Zhang H, Xiong Y, & Beach D (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 4(9):897-906.
  95. Cai K & Dynlacht BD (1998) Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21):12254-12259.
  96. Gottifredi V, McKinney K, Poyurovsky MV, & Prives C (2004) Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block. *J Biol Chem* 279(7):5802-5810.
  97. Flores-Rozas H, *et al.* (1994) Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18):8655-8659.

98. Podust VN, Podust LM, Goubin F, Ducommun B, & Hubscher U (1995) Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry* 34(27):8869-8875.
99. Waga S, Hannon GJ, Beach D, & Stillman B (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369(6481):574-578.
100. Cayrol C, Knibiehler M, & Ducommun B (1998) p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16(3):311-320.
101. Cazzalini O, *et al.* (2003) p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition. *Cell Cycle* 2(6):596-603.
102. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, & Dutta A (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374(6520):386-388.
103. Lin J, Reichner C, Wu X, & Levine AJ (1996) Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol* 16(4):1786-1793.
104. Ogryzko VV, Wong P, & Howard BH (1997) WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17(8):4877-4882.
105. Nakanishi M, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, & Smith JR (1995) The C-terminal region of p21SDI1/WAF1/CIP1 is involved in proliferating cell nuclear antigen binding but does not appear to be required for growth inhibition. *J Biol Chem* 270(29):17060-17063.
106. Soria G, Podhajcer O, Prives C, & Gottifredi V (2006) P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene* 25(20):2829-2838.
107. Soria G, Speroni J, Podhajcer OL, Prives C, & Gottifredi V (2008) p21 differentially regulates DNA replication and DNA-repair-associated processes after UV irradiation. *J Cell Sci* 121(Pt 19):3271-3282.
108. Luo Y, Hurwitz J, & Massague J (1995) Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375(6527):159-161.
109. Cooper MP, Balajee AS, & Bohr VA (1999) The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol Cell* 10(7):2119-2129.
110. Pan ZQ, *et al.* (1995) Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* 270(37):22008-22016.
111. Shivji MK, Ferrari E, Ball K, Hubscher U, & Wood RD (1998) Resistance of human nucleotide excision repair synthesis in vitro to p21Cdn1. *Oncogene* 17(22):2827-2838.
112. Bendjennat M, *et al.* (2003) UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. (Translated from eng) *Cell* 114(5):599-610 (in eng).

113. Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, & Stillman B (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371(6497):534-537.
114. Soria G & Gottifredi V (2010) PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? *DNA Repair (Amst)* 9(4):358-364.
115. Gottifredi V, Shieh S, Taya Y, & Prives C (2001) p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3):1036-1041.
116. Mattia M, Gottifredi V, McKinney K, & Prives C (2007) p53-Dependent p21 mRNA elongation is impaired when DNA replication is stalled. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 27(4):1309-1320 (in eng).
117. Abbas T, *et al.* (2008) PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev* 22(18):2496-2506.
118. Savio M, *et al.* (2009) Degradation of p21CDKN1A after DNA damage is independent of type of lesion, and is not required for DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 8(7):778-785.
119. Lee H, Zeng SX, & Lu H (2006) UV Induces p21 rapid turnover independently of ubiquitin and Skp2. *J Biol Chem* 281(37):26876-26883.
120. Lee JY, Yu SJ, Park YG, Kim J, & Sohn J (2007) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates p21WAF1/CIP1 for proteasomal degradation after UV irradiation. *Mol Cell Biol* 27(8):3187-3198.
121. Nishitani H, *et al.* (2008) CDK inhibitor p21 is degraded by a proliferating cell nuclear antigen-coupled Cul4-DDB1Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J Biol Chem* 283(43):29045-29052.
122. Bornstein G, *et al.* (2003) Role of SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 during S-phase. *J Biol Chem*.
123. Havens CG & Walter JC (2009) Docking of a specialized PIP Box onto chromatin-bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2. (Translated from eng) *Mol Cell* 35(1):93-104 (in eng).
124. Green CM & Almouzni G (2003) Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *Embo J* 22(19):5163-5174.
125. Kannouche P, *et al.* (2001) Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev* 15(2):158-172.
126. Sporbert A, Gahl A, Ankerhold R, Leonhardt H, & Cardoso MC (2002) DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol Cell* 10(6):1355-1365.
127. Leonhardt H, *et al.* (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 149(2):271-280.

128. Bi X, *et al.* (2006) Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol* 26(9):3527-3540.
129. De Haro LP, *et al.* (Metnase promotes restart and repair of stalled and collapsed replication forks. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 38(17):5681-5691 (in eng).
130. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, & Pagano M (2003) Proteasome-Mediated Degradation of p21 via N-Terminal Ubiquitylation. *Cell* 115(1):71-82.
131. Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, & Kuriyan J (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87(2):297-306.
132. Fotedar R, Bendjennat M, & Fotedar A (2004) Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* 3(2):134-137.
133. Revet I, *et al.* (2011) Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(21):8663-8667 (in eng).
134. Cleaver JE, Feeney L, & Revet I (2011) Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 10(19):3223-3224.
135. Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455(1-2):81-95.
136. Choi JH & Pfeifer GP (2005) The role of DNA polymerase eta in UV mutational spectra. *DNA Repair (Amst)* 4(2):211-220.
137. Kannouche P & Sary A (2003) Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* 85(11):1123-1132.
138. Volker M, *et al.* (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8(1):213-224.
139. Jansen JG, *et al.* (2009) Separate domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 29(11):3113-3123.
140. Speroni J, Federico MB, Mansilla SF, Soria G, & Gottifredi V (2012) Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(19):7344-7349.
141. Razidlo GL, *et al.* (2009) KSR1 is required for cell cycle reinitiation following DNA damage. *J Biol Chem* 284(11):6705-6715.
142. Bunz F, *et al.* (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282(5393):1497-1501.
143. Avkin S, *et al.* (2006) p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol Cell* 22(3):407-413.
144. Hishiki A, *et al.* (2009) Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 284(16):10552-10560.

145. Klinge S, Nunez-Ramirez R, Llorca O, & Pellegrini L (2009) 3D architecture of DNA Pol alpha reveals the functional core of multi-subunit replicative polymerases. (Translated from eng) *EMBO J* 28(13):1978-1987 (in eng).
146. Bienko M, *et al.* (2010) Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination. *Mol Cell* 37(3):396-407.
147. Logette E, *et al.* (2011) PIDD orchestrates translesion DNA synthesis in response to UV irradiation. *Cell Death Differ* 18(6):1036-1045.
148. Hashimoto K, *et al.* (2012) The vital role of polymerase zeta and REV1 in mutagenic, but not correct, DNA synthesis across benzo[a]pyrene-dG and recruitment of polymerase zeta by REV1 to replication-stalled site. (Translated from eng) *J Biol Chem* 287(12):9613-9622 (in eng).
149. Fox JT, Lee KY, & Myung K (2011) Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/deubiquitylation. (Translated from eng) *FEBS Lett* 585(18):2780-2785 (in eng).
150. Huang TT, *et al.* (2006) Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol* 8(4):339-347.
151. Brown S, Niimi A, & Lehmann AR (2009) Ubiquitination and deubiquitination of PCNA in response to stalling of the replication fork. (Translated from eng) *Cell Cycle* 8(5):689-692 (in eng).
152. Timson J (1975) Hydroxyurea. *Mutat Res* 32(2):115-132.
153. Cotto-Rios XM, Jones MJ, Busino L, Pagano M, & Huang TT (2011) APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *J Cell Biol* 194(2):177-186.
154. Soria G, *et al.* (2009) DNA damage induced Pol eta recruitment takes place independently of the cell cycle phase. *Cell Cycle* 8(20):3340-3348.
155. Chen YW, Cleaver JE, Hanaoka F, Chang CF, & Chou KM (2006) A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. (Translated from eng) *Mol Cancer Res* 4(4):257-265 (in eng).
156. Sakiyama T, *et al.* (2005) Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POLI, REV1 and LIG4 with lung cancer risk. (Translated from eng) *Int J Cancer* 114(5):730-737 (in eng).
157. Garrett MD & Collins I (2011) Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? (Translated from eng) *Trends Pharmacol Sci* 32(5):308-316 (in eng).
158. Fong PC, *et al.* (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. (Translated from eng) *N Engl J Med* 361(2):123-134 (in eng).