



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Calzetta, Nicolás Luis

El procesamiento aberrante de intermediarios replicativos en mitosis causa inestabilidad cromosómica pero no conduce a la muerte de células deficientes en la quinasa CHK1



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Calzetta, N. L. (2021). *El procesamiento aberrante de intermediarios replicativos en mitosis causa inestabilidad cromosómica pero no conduce a la muerte de células deficientes en la quinasa CHK1. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3366>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

El procesamiento aberrante de intermediarios replicativos en mitosis causa inestabilidad cromosómica pero no conduce a la muerte de células deficientes en la quinasa CHK1

TESIS DOCTORAL

Nicolás Luis Calzetta

nicolascalzetta@hotmail.com

Resumen

El cáncer es una enfermedad dinámica caracterizada por cambios en la composición genómica de las células tumorales a lo largo del tiempo. La inestabilidad cromosómica, que implica la pérdida y/o ganancia de cromosomas enteros y/o fragmentos de cromosomas en cada evento de duplicación celular es el gran impulsor de esta variabilidad. Estas alteraciones genéticas pueden proveer ventajas evolutivas a las células malignas, facilitando su adaptación a entornos adversos y contribuyendo a la generación de tumores resistentes a tratamientos oncológicos. Debido a que los tratamientos quimioterapéuticos pueden aumentar la inestabilidad cromosómica de una población tumoral, las drogas quimioterapéuticas se consideran “armas de doble filo”. Por un lado, inducen muerte tumoral; pero por el otro lado, aumentan la inestabilidad cromosómica de la población residual que sobrevive, generando una oportunidad de adquirir resistencia tumoral al tratamiento.

Mientras la mayoría de las estrategias de optimización de quimioterapias se focalizan en aumentar la muerte celular, en esta tesis nos vamos a focalizar en optimizar las quimioterapias suprimiendo el crecimiento tumoral sin inducir inestabilidad cromosómica. La fuente de la inestabilidad cromosómica es multicausal; por lo tanto, determinar el mecanismo molecular que subyace cada quimioterapia es central para poder controlarla. Esta tesis se focaliza en la exploración de los eventos moleculares que preceden a la inestabilidad cromosómica en células deficientes en la quinasa de chequeo 1 o CHK1. Dado su potencial en la inducción de muerte celular, los inhibidores de esta quinasa están siendo evaluados en ensayos clínicos avanzados. A pesar que se sabe que la inhibición de CHK1 también

induce inestabilidad cromosómica, no se han identificado los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de tal inestabilidad.

En esta tesis identificamos los gatillos moleculares de la inestabilidad cromosómica causada por la deficiencia en CHK1. Comprobamos que la inestabilidad cromosómica tiene su origen en el traspaso a mitosis de regiones de ADN que no completaron su duplicación en la fase S previa del ciclo celular.

Si bien la síntesis de ADN en mitosis (MiDAS) tiene el potencial de finalizar la duplicación de las secuencias de ADN no duplicadas en fase S, comprobamos que en células deficientes en CHK1 los nucleótidos disponibles son insuficientes para abastecer la demanda de MiDAS. Demostramos que la baja disponibilidad de este reactivo, esencial para la síntesis de ADN, provoca el procesamiento de los intermediarios replicativos en mitosis dependiente de MUS81-EME1, una endonucleasa que reconoce intermediarios replicativos atascados. Mostramos además que los cortes en el ADN generados por MUS81-EME1 son los promotores de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

Habiendo desentrañado las bases moleculares de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1, determinamos el grado de interconexión entre la inestabilidad cromosómica y la muerte celular. Nuestros experimentos demuestran que la inestabilidad cromosómica y la muerte celular ocasionadas por el silenciamiento de CHK1 derivan de dos vías moleculares independientes y, por lo tanto, pueden inhibirse selectivamente. Dado que la inestabilidad cromosómica puede promover resistencia al tratamiento oncológico, y que es un efecto secundario común de las quimioterapias, nuestros hallazgos implican la posibilidad de optimizar las terapias dirigidas hacia CHK1 al inducir muerte celular sin que esto conlleve riesgo de inducir inestabilidad cromosómica.

EL PROCESAMIENTO ABERRANTE DE INTERMEDIARIOS
REPLICATIVOS EN MITOSIS CAUSA INESTABILIDAD
CROMOSÓMICA PERO NO CONDUCE A LA MUERTE DE
CÉLULAS DEFICIENTES EN LA QUINASA CHK1



Universidad Nacional de Quilmes
Doctorado en Ciencia y Tecnología



Universidad Nacional de Quilmes

**El procesamiento aberrante de intermediarios
replicativos en mitosis causa inestabilidad
cromosómica pero no conduce a la muerte de células
deficientes en la quinasa CHK1**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencia y
Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

Nicolás Luis Calzetta

Directora de tesis: Dra. Vanesa Gottifredi

Co-directora de tesis: Dra. Marina Alejandra González Besteiro

Consejero de estudio: Dr. Facundo Temprana

Fundación Instituto Leloir – Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires –
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Julio 2021

Resumen

El cáncer es una enfermedad dinámica caracterizada por cambios en la composición genómica de las células tumorales a lo largo del tiempo. La inestabilidad cromosómica, que implica la pérdida y/o ganancia de cromosomas enteros y/o fragmentos de cromosomas en cada evento de duplicación celular es el gran impulsor de esta variabilidad. Estas alteraciones genéticas pueden proveer ventajas evolutivas a las células malignas, facilitando su adaptación a entornos adversos y contribuyendo a la generación de tumores resistentes a tratamientos oncológicos. Debido a que los tratamientos quimioterapéuticos pueden aumentar la inestabilidad cromosómica de una población tumoral, las drogas quimioterapéuticas se consideran “armas de doble filo”. Por un lado, inducen muerte tumoral; pero por el otro lado, aumentan la inestabilidad cromosómica de la población residual que sobrevive, generando una oportunidad de adquirir resistencia tumoral al tratamiento.

Mientras la mayoría de las estrategias de optimización de quimioterapias se focalizan en aumentar la muerte celular, en esta tesis nos vamos a focalizar en optimizar las quimioterapias suprimiendo el crecimiento tumoral sin inducir inestabilidad cromosómica. La fuente de la inestabilidad cromosómica es multicausal; por lo tanto, determinar el mecanismo molecular que subyace cada quimioterapia es central para poder controlarla. Esta tesis se focaliza en la exploración de los eventos moleculares que preceden a la inestabilidad cromosómica en células deficientes en la quinasa de chequeo 1 o CHK1. Dado su potencial en la inducción de muerte celular, los inhibidores de esta quinasa están siendo evaluados en ensayos clínicos avanzados. A pesar que se sabe que la inhibición de CHK1 también induce inestabilidad cromosómica, no se han identificado los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de tal inestabilidad.

En esta tesis identificamos los gatillos moleculares de la inestabilidad cromosómica causada por la deficiencia en CHK1. Comprobamos que la inestabilidad cromosómica tiene su origen en el traspaso a mitosis de regiones de ADN que no completaron su duplicación en la fase S previa del ciclo celular.

Si bien la síntesis de ADN en mitosis (MiDAS) tiene el potencial de finalizar la duplicación de las secuencias de ADN no duplicadas en fase S, comprobamos que en células deficientes en CHK1 los nucleótidos disponibles son insuficientes para abastecer la demanda de MiDAS. Demostramos que la baja disponibilidad de este reactivo, esencial para la síntesis de ADN, provoca el procesamiento de los intermediarios replicativos en mitosis dependiente de MUS81-EME1, una endonucleasa que reconoce intermediarios replicativos atascados. Mostramos además que los cortes en el ADN generados por MUS81-EME1 son los promotores de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

Habiendo desentrañado las bases moleculares de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1, determinamos el grado de interconexión entre la inestabilidad cromosómica y la muerte celular. Nuestros experimentos demuestran que la inestabilidad cromosómica y la muerte celular ocasionadas por el silenciamiento de CHK1 derivan de dos vías moleculares independientes y, por lo tanto, pueden inhibirse selectivamente. Dado que la inestabilidad cromosómica puede promover resistencia al tratamiento oncológico, y que es un efecto secundario común de las quimioterapias, nuestros hallazgos implican la posibilidad de optimizar las terapias dirigidas hacia CHK1 al inducir muerte celular sin que esto conlleve riesgo de inducir inestabilidad cromosómica.

Para mamá y papá,

Agradecimientos

Este trabajo es el punto culmine de mis casi 6 años de doctorado. Al momento de escribir estas palabras, casi finalizando la escritura de esta tesis, es que tomo dimensión del tiempo que transcurrió desde aquel día de lluvia torrencial en que fui a mi primera entrevista con Vane en el Instituto Leloir. Cuanto tiempo ha pasado y cuantas cosas han cambiado. Cambiaron gobiernos, cambiaron familias, y hasta una pandemia azotó al mundo. Sin embargo, de eso se trata la vida. De cambios. “La vida es aquello que te ocurre mientras estas ocupado haciendo otros planes” fue la frase con la que cerré mi seminario de grado allá por el 2015, y auténticamente el tiempo no hizo otra cosa que ratificarme esa idea. Pero para que este camino sea posible y agradable es necesario hacerlo acompañado. ¿De qué sirve alcanzar una meta si no puedes compartirla con la gente que quieres? Siempre me fue más importante el viaje, antes que el destino. Por eso, quiero agradecer a cada uno de los que me acompañaron en este viaje de 6 años e hicieron posible que esta tesis esté completa y lista para ser entregada.

En primer lugar, quiero agradecer a Vanesa. Gracias por enseñarme y mostrarme que en Argentina es posible hacer ciencia de alto nivel. Que si bien es más difícil que en otros países, las posibilidades están ahí y solo hace falta esforzarse para alcanzarlas. Gracias por todos los consejos que me supiste dar. Gracias también por siempre anteponer el bienestar de las personas antes que la producción científica, anteponer la entidad de grupo antes que la realización personal, son valores que ojalá todos los directores de laboratorio puedan transmitir a sus becarios.

Marina, gracias por todos tus consejos y enseñanzas profesionales que me diste durante todos estos años. Gracias también a todos mis compañeros que pasaron por el laboratorio a lo largo de este tiempo: Belén de la Vega, Natalia Paviolo, Julieta Martino, Sabrina Mansilla, Belén Federico, Sofía Loureiro, Victoria Pauwels, Agostina Bertolin, Sebastián Siri, Sofía Venerus y Verónica Okraine. Gracias a la Fundación Instituto Leloir por proporcionar los equipos y el personal para poder hacer este trabajo. Gracias a mi querida

Universidad Nacional de Quilmes, siempre una parte de mi corazón va a seguir siendo UNQuiano. Gracias al CONICET por otorgarme la beca para poder llevar a cabo esta tesis.

Luego, (¿y cómo no?) quiero agradecer a mis padres, Sandra y Luis. Gracias por todo, gracias por estar ahí siempre para ayudarme y aconsejarme. Son los mejores padres que uno podría tener. También quiero agradecer a toda mi familia, los que están, y los que me estarán ayudando desde alguna otra parte. Gracias Pocha, gracias Tere, gracias a todos.

También quiero agradecer a mis amigos, Maurito y Tata. ¿Qué decir muchachos que ya no sepan? Gracias por estar siempre a un simple mensaje dispuestos a escuchar y dar su opinión (sea de mi agrado o no). Obviamente tampoco puedo dejar de nombrar y agradecer al resto de la banda: Emma, Kevin, Roy, Fabri, Andy, Emmi, Nahu y Nico. También quiero agradecer a mis amigos de la universidad: Nati, Anto, Juli y Agus. Gracias por hacerme crecer personal y profesionalmente. Tampoco me puedo olvidar de los “chicos” del jueves: Baqui, Gurka, Franco, Dani, Oscar, Gustavo, Pablo, Esteban y Agustín.

Y, ¿cómo olvidarlo?, gracias a mi paisito. Gracias Argentina, que con sus aciertos y errores, me dio la posibilidad de estudiar una carrera que toda mi vida busqué de forma totalmente gratuita. Gracias por permitirme entrar en este mundo tan apasionante que es la investigación científica. Hay muchas cosas de las cuales seguir sintiéndonos orgullosos de este país, y una de ellas es que permita que personas de clase media (como quien les escribe) podamos aspirar a alcanzar un título de Doctor.

Luego de todo lo dicho, me parece muy egoísta decir que una sola persona realiza una tesis, es de todos los que ayudaron a esa persona a lograrla (directores, compañeros, padres, familiares y amigos) y la pienso compartir con todos ellos.

Colaboración y fuentes de financiamiento

Este trabajo se desarrolló con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) gracias a la “Beca interna doctoral 2016-2021” otorgada a Nicolás Luis Calzetta con prórroga automática por 1 año dado el “aislamiento social, preventivo y obligatorio” dictaminado por el gobierno nacional en el año 2020.

Las fuentes de financiamiento utilizadas fueron: PICT-2012-1371, PICT-2013-1049 y PICT-2016-1239 (adjudicadas a la doctora Vanesa Gottifredi) otorgadas por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica; PICT-2014-0522 (adjudicada a la doctora Marina A. González Besteiro) otorgada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica; Asistencia Financiera IV (adjudicada a la doctora Vanesa Gottifredi) otorgada por el Instituto Nacional del Cáncer.

Agradezco a G. Soria (Universidad Nacional de Córdoba), B. Vogelstein (Universidad Johns Hopkins) y T. Seufferlein (Department of Internal Medicine, University of Ulm, Alemania) por el regalo de reactivos. También agradezco a Anabel Álvarez Julia y Andrés Hugo Rossi por el apoyo técnico con cultivo celular y microscopía, respectivamente.

Publicaciones y presentaciones en congresos

Artículos científicos

- Nicolás Luis Calzetta¹; Marina Alejandra González Besteiro¹; Vanesa Gottifredi. **2021**. PARP activity fine-tunes the DNA replication choreography of Chk1-depleted cells. **ISSN: 0022-2836 – Journal of Molecular Biology.**

¹ Equal contribution: Nicolás Luis Calzetta and Marina A. González Besteiro

- Nicolás Luis Calzetta¹; Marina Alejandra González Besteiro¹; Vanesa Gottifredi. **2020**. Mus81-Eme1-dependent aberrant processing of DNA replication intermediates in mitosis impairs genome integrity. **ISSN: 2375-2548 – Science Advances.**

¹ Equal contribution: Nicolás Luis Calzetta and Marina A. González Besteiro

- Sabrina Florencia Mansilla; María Belén De La Vega¹; Nicolás Luis Calzetta¹; Sebastián Omar Siri¹; Vanesa Gottifredi. **2020**. CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication. **ISSN: 2073-4425 – Genes.**

¹ Equal contribution: María Belén De La Vega, Nicolás Luis Calzetta and Sebastián Omar Siri

- María Belén Federico; Sebastián Omar Siri¹; Nicolás Luis Calzetta¹; Natalia Soledad Paviolo; María Belén de la Vega; Julieta Martino; María Carolina Campana; Lisa Wiesmüller; Vanesa Gottifredi. **2020**. Unscheduled MRE11 activity triggers cell death but not chromosome instability in polymerase eta-depleted cells subjected to UV irradiation. **ISSN: 2641-9475 - Oncogene.**

¹ Equal contribution: Sebastián Omar Siri and Nicolás Luis Calzetta

- Marina Alejandra González Besteiro; Nicolás Luis Calzetta; Sofía Loureiro; Martín Habif; Remy Bétous; Marie-Jeanne Pillaire; Antonio Maffia; Simone Sabbioneda; Sebastián Hoffmann; Vanesa Gottifredi. **2019**. CHK1 loss creates replication barriers that compromise cell survival independently of origin firing levels. **ISSN: 0261-4189 - EMBO journal.**

- Natalia Soledad Paviolo; María Belén de la Vega; María Pansa; Iris García; Nicolás Luis Calzetta; Gastón Soria; Vanesa Gottifredi. **2019**. Persistent double strand

break accumulation does not precede cell death in an Olaparib-sensitive BRCA-deficient colorectal cancer cell model. **ISSN: 1415-4757- Genetics and Molecular Biology.**

Congresos nacionales e internacionales

- Nicolás Luis Calzetta; Marina Alejandra González Besteiro; Vanesa Gottifredi. **2021.** A potential strategy to prevent drug resistance: Chromosome instability can be prevented with no changes in the induction of cell death after Chk1 depletion. Buenos Aires Breast Cancer Symposium. Modalidad on-line. **Poster, Expositor: NLC.**
- Nicolás Luis Calzetta; Marina Alejandra González Besteiro; Vanesa Gottifredi. **2020.** Molecular bases of the genomic instability triggered by incomplete MiDAS in CHK1 deficient backgrounds. 5th AEK Autumn School 2020 “Replication Stress in Cancer”. Modalidad on-line (organizador: German Cancer Society, Experimental Cancer Research). **Oral, Expositor: NLC. Premio al mejor orador.**
- Nicolás Luis Calzetta; Marina Alejandra González Besteiro; Vanesa Gottifredi. **2020.** An inefficient resolution of under-replicated DNA in mitosis triggers genomic instability. Reunión conjunta 2020 SAIB-SAMIGE. Modalidad on-line (organizador: Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular en conjunto con Sociedad Civil de Microbiología General). **Oral, Expositor: NLC. Premio al mejor orador.**
- Sebastián Omar Siri; María Belén Federico; Nicolás Luis Calzetta; Julieta Martino; María Belén De la Vega; Vanesa Gottifredi. **2020.** CIN-Independent cell death in S phase induced by Pol Eta depletion. Reunión conjunta 2020 SAIB-SAMIGE. Modalidad on-line (organizador: Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular en conjunto con Sociedad Civil de Microbiología General). **Oral, Expositor: SOS.**
- Nicolás Luis Calzetta; Marina Alejandra González Besteiro; Vanesa Gottifredi. **2019.** Checkpoint kinase 1 triggers cell death and genomic instability by independent pathways. Joint LV Annual SAIB Meeting and XIV PABMB Congress. Salta, Argentina. **Poster, Expositor: NLC**

- Nicolás Luis Calzetta; Marina Alejandra González Besteiro; Vanesa Gottifredi. **2018**. La inhibición de CHK1 causa daño al ADN por dos vías diferentes. 3ra Reunión de Jóvenes Investigadores de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Quilmes, Buenos Aires, Argentina. **Oral y poster, Expositor: NLC.**

- Marina Alejandra González Besteiro; Nicolás Luis Calzetta; Sofía Loureiro; Vanesa Gottifredi. **2017**. *Checkpoint* Kinase 1 is a master regulator of the DNA replication program in cancer cells. Reunión Conjunta de Biociencias. Buenos Aires, Argentina. **Oral, Expositor: MAGB.**

- Nicolás Luis Calzetta; Marina Alejandra González Besteiro; Natalia Paviolo; Vanesa Gottifredi. **2017**. Molecular dissection of biologically relevant pathways after inhibition of *checkpoint* kinase 1. Reunión Conjunta de Biociencias. Buenos Aires, Argentina. **Oral, Expositor: NLC.**

- Marina Alejandra González Besteiro; Nicolás Luis Calzetta; María Belén Federico; Vanesa Gottifredi. **2016**. La quinasas CDK2 inhibe la progresión de horquillas de replicación en células sin actividad de CHK1. XX Alexander Hollaender Course “Nutrition, environment and health”. Buenos Aires, Argentina. **Poster, Expositor: NLC. Premio al mejor poster.**

- Sabrina Mansilla; Agostina Bertolín; Valérie Bergoglio; Marina Alejandra González Besteiro; María Belén de la Vega; Marie Jeanne Pillaire; Nicolás Calzetta; Natalia Paviolo; Paola Campodónico; María Belén Federico; Jean Sebastián Hoffmann; Vanesa Gottifredi. **2016**. Más que un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas: una nueva función de p21 en el replisoma. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Salamanca, España. **Poster, Expositor: SM**

- Marina Alejandra González Besteiro; Nicolás Luis Calzetta; María Belén de la Vega; Natalia Paviolo; María Belén Federico; Sabrina Mansilla; Agostina Bertolín; Vanesa Gottifredi. **2016**. *Checkpoint* kinase 1 maintains genomic stability independently of its contribution to DNA replication. At the intersection of DNA replication and Genome Maintenance: From Mechanisms to Therapy. Trieste, Italia. **Poster, Expositora: MAGB.**

- Marina Alejandra González Besteiro; Nicolás Luis Calzetta; María Belén de la Vega; Natalia Paviolo; María Belén Federico; Sabrina Mansilla; Agostina Bertolín; Vanesa Gottifredi. **2016**. La inhibición de *Checkpoint* Kinase 1 (CHK1) en células tumorales promueve la inestabilidad genómica independientemente de su contribución a la replicación del ADN. Simposio Internacional RAÍCES, Ganando la Guerra Contra el Cáncer. Buenos Aires, Argentina. 2016. **Poster, Expositora: MAGB.**

Abreviaturas

53BP1-NBs: 53BP1 nuclear bodies (cuerpos nucleares de 53BP1)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN-pol: ADN polimerasa

ADNsc: ADN simple cadena

APH: Aphidicolin (afidicolina)

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related

CDK: Cyclin-dependent kinase (ciclina dependiente de quinasa)

CFS: Common fragile sites (sitios frágiles comunes)

CHK1: Checkpoint kinase 1 (quinasa de chequeo 1)

CHK1i: Inhibidor de CHK1

CldU: Clorodeoxiuridina (análogo de timidina)

DDR: DNA Damage Response (respuesta al daño de ADN)

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

DSB: Double strand break (corte de doble cadena)

EdU: Timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (análogo de timidina)

HU: Hydroxyurea (hidroxiurea)

IdU: Iododeoxiuridina (análogo de timidina)

MiDAS: Mitotic DNA Synthesis (síntesis de ADN en mitosis)

Ns: Nucleósidos

RRM2: Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2 (subunidad reguladora de ribonucleótido reductasa M2)

SAC: Spindle assembly checkpoint (punto de control de ensamblaje del huso)

shRNA: Short hairpin RNA (ARN de interferencia por horquilla corta)

siRNA: Short interfering RNA (ARN de interferencia)

SSB: Single strand break (cortes de simple cadena)

TLS: Translesion synthesis (síntesis de ADN por translesión)

UFB: Ultra Fine Bridge (puente ultrafino)

UR-DNA: Under-replicated DNA (secuencia de ADN no replicado en mitosis)

Lista de figuras

Fig. 1.1. El ciclo celular.....	3
Fig. 1.2. Variación en los niveles de ciclina a lo largo del ciclo celular	4
Fig. 1.3. Licenciamiento y disparo de orígenes replicativos	10
Fig. 1.4. El replisoma.....	12
Fig. 1.5. La síntesis del ADN por ADN-polimerasas.....	13
Fig. 1.6. Duplicación de ADN bi-direccional.....	14
Fig. 1.7. Las horquillas atascadas resultan en largos tramos de ADNsc y en la pérdida de coordinación entre las cadenas líder y retrasada	17
Fig. 1.8. Resolución de una horquilla atascada por activación de un origen replicativo cercano.....	21
Fig. 1.9. DSB asociado a horquilla replicativa.....	22
Fig. 1.10. Representación esquemática de estructuras secundarias de ADN que son procesadas por endonucleasas específicas de estructura	24
Fig. 1.11. Funciones de las endonucleasas MUS81-EME1 y MUS81-EME2	26
Fig. 1.12. El UR-DNA que no se resuelve en mitosis induce un UFB en anafase y 53BP1-NB en G1	31
Fig. 1.13. Modelo de síntesis de ADN en mitosis.....	33
Fig. 1.14. Las anafases aberrantes producen micronúcleos	36
Fig. 1.15. El estrés replicativo de una célula tumoral llega a niveles mayores que los de una célula normal bajo tratamientos quimioterapéuticos	38
Fig. 1.16. Diferentes estrategias farmacológicas para aumentar el estrés replicativo	41
Fig. 1.17. Modelo de un tratamiento oncológico inductor de muerte celular e inestabilidad cromosómica.....	42
Fig. 1.18. Modelo de activación de CHK1.....	44
Fig. 1.19. Modelo original y modelo nuevo donde CHK1 regula la coreografía replicativa	48
Fig. 1.20. Modelo original y modelo nuevo donde CHK1 regula la inducción de DSBs y la muerte celular	50
Fig. 1.21. Los DSBs en células deficientes en CHK1 podrían inducir inestabilidad cromosómica	53
Fig. 2.1. El silenciamiento de CHK1 induce inestabilidad cromosómica.....	59
Fig. 2.2. El silenciamiento de CHK1 altera la coreografía replicativa	60
Fig. 2.3. La coreografía replicativa alterada depende de CDC45 en células deficientes en CHK1	62

Fig. 2.4. La catástrofe replicativa es dependiente de CDC45 en células deficientes en CHK1.....	62
Fig. 2.5. La inestabilidad cromosómica es independiente de CDC45 en células deficientes en CHK1	63
Fig. 2.6. La catástrofe replicativa, no así la inestabilidad cromosómica, es dependiente de CDC45 en células HCT116 y PANC-1 deficientes en CHK1	64
Fig. 2.7. Modelo I.....	63
Fig. 2.8. El daño al ADN es dependiente de MUS81 en células deficientes en CHK1	66
Fig. 2.9. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MUS81 en células deficientes en CHK1	67
Fig. 2.10. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MUS81 en células HCT116 y PANC-1 deficientes en CHK1.....	67
Fig. 2.11. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MUS81-EME1, no así de MUS81-EME2, en células deficientes en CHK1	70
Fig. 2.12. Ratificación de la Fig. 2.11 con otros siRNAs para EME1 y EME2.....	71
Fig. 2.13. MUS81-EME1 produce DSBs mitóticos en células deficientes en CHK1	72
Fig. 2.14. Modelo II.....	72
Fig. 2.15. El silenciamiento de CHK1 induce MiDAS	74
Fig. 2.16. MiDAS es independiente de MUS81 en células deficientes en CHK1	75
Fig. 2.17. Los cortes de MUS81-EME1 en cromosomas metafásicos de células deficientes en CHK1 ocurren en sitios de síntesis de ADN semi-conservativa.....	77
Fig. 2.18. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MiDAS en células deficientes en CHK1	79
Fig. 2.19. El daño al ADN y el enlentecimiento de horquillas replicativas en fase S es independiente del MiDAS inducido por la depleción de CHK1	80
Fig. 2.20. La deficiencia de nucleótidos durante la síntesis de ADN en mitosis conduce a inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.....	82
Fig. 2.21. La baja disponibilidad de nucleótidos causa un MiDAS sub-óptimo que desencadena inestabilidad cromosómica dependiente de MUS81.....	83
Fig. 2.22. Modelo III.....	83
Fig. 2.23. La deficiencia de nucleótidos durante MiDAS impide que el UR-DNA se duplique completamente en células deficientes en CHK1	86
Fig. 2.24. La muerte celular es independiente de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	87
Fig. 3. Fenotipos asociados a la duplicación del ADN en células deficientes en CHK1 .	103
Fig. 4.1. Imágenes representativas y esquema de las fibras de ADN que se observan al microscopio de fluorescencia	114

Fig. 4.2. Ensayo de extensión de fibra de ADN	115
Fig. 4.3. Imagen del COMETA.....	116
Fig. 4.4. Ensayo de COMETA neutro.....	117

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El ciclo celular	2
1.1.1 Fases del ciclo celular y su regulación	2
1.1.2 Puntos de control del ciclo celular	4
1.2 El ADN y su duplicación	6
1.2.1 El ADN es el portador de la información genética	6
1.2.2 La duplicación del ADN es un proceso central para la vida	8
1.2.3 La duplicación del ADN se inicia en los orígenes de replicación	8
1.2.4 El replisoma	11
1.2.5 Características básicas de la duplicación del ADN	13
1.3 Las barreras replicativas comprometen la duplicación del ADN	16
1.3.1 Las barreras replicativas atascan a las horquillas de replicación	16
1.3.2 Las barreras replicativas activan la Respuesta al Daño de ADN	18
1.3.3 Las barreras replicativas pueden inducir el colapso de las horquillas replicativas	20
1.4 Las endonucleasas específicas de estructura procesan horquillas atascadas	23
1.4.1 La endonucleasa MUS81: un actor central en la DDR	23
1.4.2 MUS81-EME1 se activa en mitosis	24
1.4.3 MUS81-EME2 se activa en fase S	25
1.5 El estrés replicativo y la inestabilidad genómica en células tumorales	27
1.5.1 Las células tumorales y el estrés replicativo	27
1.5.2 Estrés replicativo agudo y moderado	28
1.5.3 MiDAS: la última oportunidad de sintetizar el ADN sin duplicar en mitosis	31
1.5.4 Las células tumorales y la inestabilidad genómica	33
1.5.5 Técnicas para la medición de inestabilidad cromosómica	34
1.5.6 La inestabilidad cromosómica es la base de la microevolución tumoral	36
1.6 Tratamientos quimioterapéuticos y tolerancia	38
1.6.1 Las quimioterapias aprovechan los altos niveles de estrés replicativo de las células tumorales	38
1.6.2 La evolución de las quimioterapias	39
1.6.3 Estrategias oncológicas para aumentar el estrés replicativo	40
1.6.4 Las células tumorales se pueden volver tolerantes al tratamiento	41
1.7 CHK1: un esperanzador blanco terapéutico para tratamientos oncológicos	43
1.7.1 La activación de la vía ATR-CHK1	43
1.7.2 La función de CHK1 no se circunscribe solamente a la regulación del <i>checkpoint</i> intra-S44	
1.7.3 CHK1 regula la coreografía replicativa en condiciones perturbadas	46
1.7.4 CHK1 regula a la coreografía replicativa en condiciones no perturbadas	47
1.7.5 CHK1 previene inducción de daño al ADN y muerte celular en condiciones no perturbadas	49
1.7.6 CHK1 previene inducción de ADN sin duplicar al final de la fase S e inestabilidad cromosómica en condiciones no perturbadas	50
1.7.7 Relación entre la estabilidad cromosómica y supervivencia regulada por CHK1	51

1.7.8 CHK1 y cáncer	53
1.8 Objetivos	55
2. RESULTADOS.....	56
2.1 Estrategia experimental para silenciar o inhibir a CHK1.....	57
2.2 El silenciamiento de CHK1 desencadena inestabilidad cromosómica.....	58
2.3 El silenciamiento de CHK1 desencadena catástrofe replicativa.....	60
2.4 La catástrofe replicativa y la inestabilidad cromosómica ocurren por vías independientes.....	63
2.5 La endonucleasa MUS81 desencadena inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	66
2.6 Los DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis desencadenan inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	69
2.7 MUS81-EME1 corta intermediarios replicativos de la síntesis de ADN en mitosis en células deficientes en CHK1.....	73
2.8 La síntesis de ADN en mitosis causa inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	78
2.9 La deficiencia de nucleótidos durante la síntesis en mitosis desencadena inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	81
2.10 La baja disponibilidad de nucleótidos impide que las secuencias de ADN no replicadas en fase S se dupliquen en la mitosis	84
2.11 La inestabilidad cromosómica no compromete la supervivencia de las células deficientes en CHK1	87
3. DISCUSIÓN	88
3.1 La depleción o inhibición de CHK1 induce inestabilidad cromosómica	89
3.2 La depleción de CHK1 induce catástrofe replicativa dependiente de CDC45	90
3.3 Una cantidad limitada de DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis inducen inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	92
3.4 La entrada a mitosis prematura podría ser la causa de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.....	94
3.5 El daño al ADN ocasionado por MUS81-EME1 en mitosis es el impulsor de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1	97
3.6 La escasez de nucleótidos atasca a los intermediarios replicativos en mitosis, los cuales son reconocidos y procesados por MUS81-EME1 en células deficientes en CHK1 ...	99

3.7 La inestabilidad cromosómica no es la causa de la muerte celular en células deficientes en CHK1	101
3.8 Alternativas al tratamiento oncológico con inhibidores de CHK1 y proyecciones de esta investigación	104
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
4.1 Cultivo Celular.....	107
4.2 Silenciamiento génico.....	107
4.2.1 Transfección con siRNA	107
4.2.2 Transducción con shRNA	108
4.3 Western-Blot.....	109
4.4 PCR en tiempo real (qPCR).....	110
4.5 Ensayos de inmunofluorescencia	111
4.6 Ensayo de extensión de fibra de ADN.....	112
4.7 Ensayo de COMETA neutro	115
4.8 Ensayo de aberraciones anafásicas.....	117
4.9 Ensayo de micronúcleos	117
4.10 Ensayo para cuantificar cortes en cromosomas mitóticos.....	118
4.11 Ensayo para cuantificar síntesis de ADN en células mitóticas.....	118
4.12 Ensayo para cuantificar síntesis de ADN en cromosomas metafásicos	119
4.13 Ensayo de sobrevivencia.....	120
4.14 Análisis estadístico de los datos.....	120
5. BIBLIOGRAFÍA	122
ANEXO.....	133

1. Introducción



1.1 El ciclo celular

1.1.1 Fases del ciclo celular y su regulación

Todos los organismos vivos que pueblan nuestro planeta Tierra están constituidos por células. La mayoría de dichos organismos (10 a 100 millones) están formados por una única célula (unicelulares). Otros están formados por grandes cantidades de células que se relacionan entre sí mediante elaborados sistemas de comunicación (pluricelulares). Desde una bacteria hasta el ser humano, cada organismo pluricelular o población de organismos unicelulares se han formado por sucesivas divisiones a partir de una célula única. Es decir que una célula, desde el momento de su concepción, tiene como finalidad crecer, desarrollarse y dividirse en un proceso cíclico llamado ciclo celular.

Cada célula posee toda la información necesaria para desarrollarse almacenada en moléculas de ADN (ver también sección 1.2). Por este motivo, el ADN se debe duplicar con fidelidad y separar con precisión en dos células hijas. El ciclo celular se divide en dos secciones: la interfase, donde las células duplican el ADN y pasan la mayor parte de su tiempo (entre 23 y 24 hs), y la mitosis o M, donde se separan las copias de ADN y las células hijas se escinden una de otra con relativa velocidad (menos de 1 h) . A la interfase se la sub-sectoriza en 3 secciones: G1, donde las células se preparan para la duplicación de su ADN; S, donde se duplica el ADN; y G2, donde las células se preparan para dividirse. A la mitosis se la sub-sectoriza en 4 secciones: profase, donde la envoltura nuclear se disgrega; metafase, donde el ADN se alinea en el ecuador celular; anafase, donde se separan equitativamente las copias del ADN hacia lados opuestos de la célula; y telofase, donde el ADN llega a los polos y se reorganiza una nueva envoltura nuclear para cada una de las dos futuras células hijas (Harashima et al, 2013; Schafer, 1998). Al final de la telofase, la célula inicia la citocinesis. La citocinesis consiste en la división del citoplasma mediante un anillo contráctil que estrangula a la célula dando lugar a dos células hijas. Cada una de estas células hijas entra nuevamente en interfase, de manera que se reinicia el ciclo (**Fig. 1.1**).

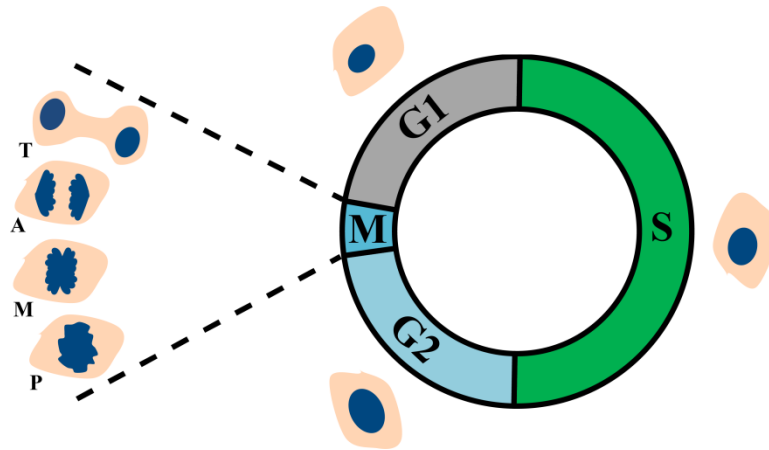


Fig. 1.1. El ciclo celular. El ciclo celular está conformado por la interfase (G1, S y G2) y la mitosis (M). En la interfase la célula crece y duplica su ADN. Luego de la interfase, las células entran en mitosis en donde separan su material genético duplicado y se escinden en dos células hijas. La mitosis está compuesta por 4 secciones: la profase (P), la metafase (M), la anafase (A) y la telofase (T).

El ciclo celular es un proceso finamente regulado que garantiza que las células crezcan y transmitan su información hereditaria con gran fidelidad. Uno de los principales reguladores de la progresión del ciclo son los complejos proteicos “ciclina-CDK”. Estos complejos están constituidos por una ciclina y una quinasa dependiente de ciclina (o CDK, por sus siglas en inglés *cyclin-dependent kinase*). La transición entre fases del ciclo está dictaminada por cambios cíclicos (de allí su nombre) en la expresión de cuatro ciclinas diferentes: ciclina D, ciclina E, ciclina A y ciclina B (Harashima et al, 2013; Schafer, 1998). Es decir, las variaciones en la concentración de las ciclinas marcan los tiempos del ciclo, como si de un “metrómetro molecular” se tratase (**Fig. 1.2**). Cada complejo ciclina-CDK promueve la progresión de una etapa particular del ciclo celular a través de la fosforilación de proteínas diana específicas.

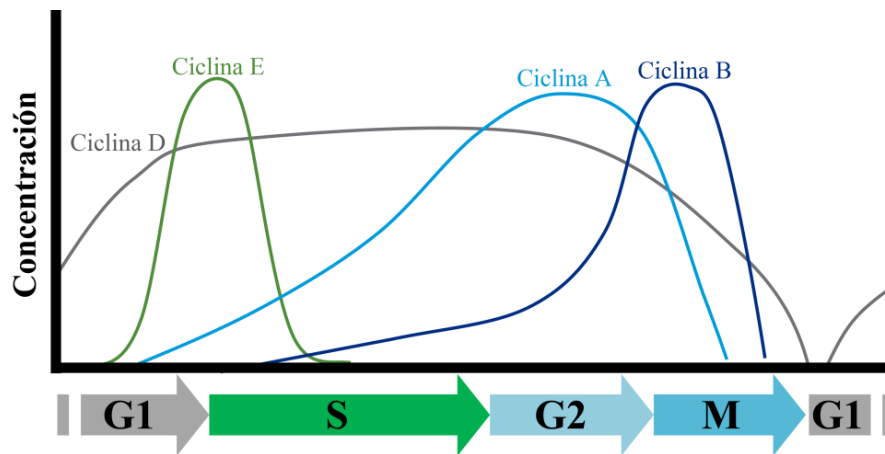


Fig. 1.2. Variación en los niveles de ciclina a lo largo del ciclo celular. Los niveles de ciclinas, a diferencia de los niveles de CDKs, varían a lo largo del ciclo, haciendo variar los niveles de los complejos “ciclina-CDK”. La concentración de los distintos complejos “ciclina-CDK” en un punto específico del ciclo celular define la fase del ciclo.

El ciclo celular comienza con la inducción de las ciclinas D en G1. Las ciclinas D se unen a CDK4 y CDK6. Los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6 fosforilan a la proteína de retinoblastoma, inactivándola parcialmente. Esta inactivación parcial de retinoblastoma alcanza para inducir la expresión de ciclina E. Ciclina E se une a CDK2 y forma el complejo ciclina E-CDK2. El aumento en la concentración de este complejo induce la transcripción de genes necesarios para la transición desde G1 a S. A medida que la replicación avanza, la ciclina E es progresivamente sustituida por la ciclina A que, unida a CDK2, permite el avance hacia la fase G2. Finalmente, tanto el inicio como el desarrollo de la mitosis están controlados por CDK1. Al inicio de la mitosis, CDK1 se asocia con la ciclina A y posteriormente a la ciclina B, promoviendo la fosforilación de numerosos sustratos necesarios para el inicio y el progreso de la mitosis, respectivamente (Harashima et al, 2013; Lim & Kaldis, 2013; Schafer, 1998).

1.1.2 Puntos de control del ciclo celular

En todas las células eucariotas el control del ciclo celular se lleva a cabo por mecanismos similares. Estos mecanismos de control o “puntos de control” (del inglés, *checkpoints*) garantizan el cumplimiento de cada fase del ciclo antes del pasaje a la siguiente fase (Harashima et al, 2013; Poon, 2016). Existen cuatro *checkpoints*: el *checkpoint* G1/S controla que la capacidad

metabólica sea suficiente para iniciar y completar la duplicación del ADN; el *checkpoint* intra-S controla los niveles de daño al ADN durante la fase S; el *checkpoint* G2/M controla que la duplicación del ADN haya finalizado; y el *checkpoint* de mitosis (o SAC, por sus siglas en inglés *Spindle Assembly Checkpoint*) controla que los cromosomas estén correctamente unidos al huso mitótico (Bartek et al, 2004; Murray, 1994).

La activación de un punto de control bloquea la progresión del ciclo celular. Un punto de control se activa si se detectan problemas fuera o dentro de la célula. Por ejemplo, si las condiciones extracelulares no son las apropiadas para la proliferación celular se activa el *checkpoint* G1/S impidiendo que se inicie el ciclo hasta que las condiciones sean favorables. Asimismo, si aumentan los niveles de daño al ADN durante su duplicación se activa el *checkpoint* intra-S, lo cual reduce o frena la velocidad de síntesis del ADN. Como vemos, la activación de un punto de control frena el ciclo celular en una etapa determinada con el fin de aumentar el tiempo de permanencia en esa etapa. Dicha permanencia amplía las posibilidades de solucionar el problema que activó al punto de control.

Los puntos de control frenan el ciclo celular inhibiendo la actividad de ciclinas-CDKs a través de proteínas que actúan a modo de “interruptores moleculares”. Estos interruptores pueden reagruparse en tres subcategorías: aquellos que promueven degradación de las ciclinas, aquellos que promueven fosforilaciones inhibitorias de CDKs, y aquellos que se unen al sitio activo de CDKs para inhibir su actividad quinasa. La amplia gama de interruptores que existe proporciona una gran flexibilidad al ciclo celular, permitiendo entre otras cosas su comunicación con estímulos intracelulares o extracelulares específicos (Abraham, 2001; Bartek et al, 2004; Harashima et al, 2013; Murray, 1994). Así por ejemplo, el daño particular al ADN producido por la radiación ultravioleta (UV) puede actuar como una señal intracelular a partir de un estímulo externo que promueve que se fosforile inhibitoriamente a CDK2 y/o CDK1, impidiendo que la célula prosiga la síntesis del ADN en fase S (activación *checkpoint* intra-S) o entre a mitosis (activación *checkpoint* G2/M), respectivamente (Elbaek et al, 2020).

1.2 El ADN y su duplicación

1.2.1 El ADN es el portador de la información genética

La vida depende de la capacidad de las células de almacenar y transmitir la información necesaria para generar otra célula. Esta información se encuentra almacenada en moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN es un polímero formado por monómeros llamados nucleótidos (Avery et al, 1944; Meselson & Stahl, 1958; Watson & Crick, 1953). Los nucleótidos están compuestos por una molécula de ácido fosfórico unida al carbono 5' de una molécula de azúcar (pentosa), unida a su vez a una base nitrogenada (purina o pirimidina). Existen 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina) que forman los 4 nucleótidos del ADN: deoxiadenosina trifosfato (dATP), deoxiguanina trifosfato (dGTP), deoxicitosina trifosfato (dCTP) y deoxitimina trifosfato (dTTP). Estos nucleótidos pueden polimerizar y unirse entre sí a través de reacciones de condensación entre el grupo -OH del ácido fosfórico y el grupo -OH 3' del azúcar, liberando pirofosfato al medio. La polimerización de la cadena de ADN ocurre como consecuencia de reacciones sucesivas de condensación entre un nucleótido de la cadena naciente y un nucleótido entrante. Dado que la polimerización siempre sucede entre el -OH del ácido fosfórico del nucleótido entrante y el -OH 3' del azúcar del nucleótido de la cadena naciente, la macromolécula adquiere una polaridad química en donde el grupo fosfato libre es catalogado como extremo 5' y el grupo -OH libre del azúcar como extremo 3'.

El ADN se caracteriza por su alta estabilidad fisicoquímica, que es consecuencia de los enlaces covalentes entre sus nucleótidos y de su estructura espacial (Travers & Muskhelishvili, 2015). El ADN consiste en dos cadenas o hebras de ácido desoxirribonucleico que forman una doble hélice. Los grupos azúcar y fosfato forman el esqueleto de cada cadena mientras que las bases nitrogenadas se posicionan hacia el centro de la hélice. Las dos cadenas se mantienen unidas entre sí por enlaces no-covalentes del tipo puente hidrógeno que ocurren entre bases nitrogenadas complementarias, formando unidades llamadas pares de bases. La adenina es la base complementaria a la timina, mientras que la guanina lo es a la citosina. Los miembros de cada par de bases solo pueden unirse si las cadenas están en

posiciones antiparalelas, es decir, si la polaridad química de una cadena está orientada de manera opuesta a la de la otra cadena (Avery et al, 1944; Chargaff et al, 1951; Meselson & Stahl, 1958; Watson & Crick, 1953).

El ADN de una célula humana tiene un total de $3,2 \times 10^9$ pares de bases, lo que corresponde a una increíble longitud de 2 metros. La combinación del ADN con las histonas, proteínas básicas que interaccionan con el ADN por la carga negativa de este, conforma la cromatina y es lo que permite empaquetar al ADN de manera que entre en el núcleo de una célula. Los $3,2 \times 10^9$ pares de bases de una célula humana no integran una única y larga cadena de ADN sino que están organizados en 46 cromosomas (Kornberg, 1974). Cada cromosoma está constituido por 3 sectores diferenciados: los telómeros, o extremos cromosómicos; el centrómero, la región donde se unen los cromosomas al huso mitótico; y los brazos cromosómicos, las dos secciones entre los telómeros y el centrómero. Los cromosomas se duplican en fase S, de manera que cada cromosoma da lugar a dos cromátidas (o cromatinas condensadas) idénticas llamadas cromátidas hermanas. Las cromátidas hermanas se mantienen unidas por el centrómero en la profase y metafase. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan, repartiéndose el material genético equitativamente entre las futuras células hijas (Kornberg & Lorch, 1999; Woodcock, 2006).

Las células humanas son diploides, es decir que contienen 2 copias de cada cromosoma. Una copia es heredada de la madre y la otra del padre; y cada copia recibe el nombre de cromosoma homólogo. Los cromosomas homólogos tienen la misma estructura y los mismos *loci* (lugares específicos del cromosoma donde se localiza una secuencia de ADN) pero distintos alelos (variaciones de esa secuencia de ADN). Así pues, las células humanas tienen 23 pares de cromosomas, haciendo un total de 46 cromosomas (23 de la madre y 23 del padre). Cada uno de los 46 cromosomas actúa como una unidad estructural diferenciada capaz de duplicarse independientemente durante la fase S del ciclo celular.

1.2.2 La duplicación del ADN es un proceso central para la vida

Al conjunto de la información almacenada en el ADN de un organismo se lo denomina genoma. Un genoma contiene unidades de secuencia individuales llamadas genes. Un gen es una secuencia particular de nucleótidos de ADN que actúa como una unidad funcional; cualquier variación en el orden y/o en la identidad de los nucleótidos, o cualquier variación en el largo de un gen, puede cambiar su función. Es por ello que la duplicación del genoma debe ser completa y precisa (Cooper et al, 2004; Crow, 2000).

La duplicación del ADN no sufrió grandes modificaciones a lo largo de la evolución y es similar entre todos los organismos que pueblan el planeta Tierra. Esta constancia a lo largo de los años nos ratifica que la duplicación del ADN es central para el desarrollo de la vida desde el momento de su concepción. La duplicación del ADN es un proceso altamente eficiente, preciso y fiel. Es eficiente porque el tiempo promedio requerido para duplicar todo el ADN de especies con genomas grandes (en el orden de gigabases, 10^9 pares de bases) es similar al de especies con genomas más chicos. Esto ocurre porque a medida que aumenta el tamaño del genoma aumenta el número de puntos de inicio de replicación que actúan en simultáneo (Rivera-Mulia & Gilbert, 2016; Robinson & Bell, 2005) (ver también sección 1.2.3). Es preciso porque las enzimas que polimerizan ADN a partir de la secuencia molde tienen una baja tasa de error (ver también sección 1.2.5). Es fiel porque la duplicación del ADN cuenta con un sistema de reconocimiento y reparación de errores introducidos durante el copiado (ver también sección 1.2.5).

1.2.3 La duplicación del ADN se inicia en los orígenes de replicación

Las interacciones puente hidrógeno entre ambas cadenas de ADN aportan una gran estabilidad a la doble cadena de ADN. Tal es así que para poder separar ambas cadenas se debe utilizar una gran cantidad de energía. Para poder utilizar esta doble cadena como molde en la síntesis de ADN, la doble cadena debe abrirse y permitir que las dos cadenas expongan sus bases desapareadas. Las helicasas son proteínas presentes en todos los organismos vivos que pueden separar las cadenas de ADN rompiendo los puentes hidrógeno entre sus bases nitrogenadas utilizando energía almacenada en

forma de ATP (Dillingham, 2006; Mott & Berger, 2007; Robinson & Bell, 2005). Estas proteínas se posicionan en sitios específicos del genoma y se activan mediante un proceso exquisitamente regulado.

Las helicasas reconocen secuencias específicas del genoma llamadas orígenes de replicación u orígenes replicativos. La activación o disparo de los orígenes implica el inicio de la duplicación del ADN e involucra la activación de una helicasa (que separa ambas cadenas de ADN) y el cargado de los replisomas (complejos proteicos encargados de duplicar el ADN) (Ekundayo & Bleichert, 2019). La activación de los orígenes en fase S está precedida por el licenciamiento de orígenes en la fase G1 previa. Se llama licenciamiento al cargado del complejo proteico pre-replicativo (pre-RC) sobre el origen de replicación. El pre-RC está formado por el complejo de reconocimiento de orígenes (ORC), las proteínas cargadoras de la helicasa (CDC6 y CDT1), y las seis sub-unidades que conforman el complejo helicasa (MCM2-7). El cargado de la helicasa es el último paso en la reacción de licenciamiento y puede tener lugar solo si ORC, CDC6 y CDT1 ya están asociados al origen (Fragkos et al, 2015; Kornberg, 1974; Patel & Weiss, 2018). Una vez terminada la fase G1 no se pueden licenciar más orígenes. Si bien esto podría parecer una medida que atenta contra la finalización de la fase S, es una condición necesaria para limitar la duplicación del ADN a una vez por ciclo celular (Dillingham, 2006).

La activación de los orígenes licenciados ocurre en fase S e implica la activación del complejo helicasa (MCM2-7) y el reclutamiento al origen del complejo de pre-iniciación (pre-IC). La activación del MCM2-7 comienza con la activación de la ciclina A-CDK2 que gatilla la unión de otras proteínas como MCM10, CDC45, TOPBP1 y el complejo GINS al pre-RC. MCM10 es la primera proteína que interacciona con el pre-RC y cataliza la interacción con las demás. TOPBP1 recluta a CDC45, que, junto con MCM2-7 y el complejo GINS, forma la helicasa replicativa eucariota. CDK2 también fosforila a CDC6 y CDT1, proteínas del pre-RC que se cargaron en G1 durante el licenciamiento de orígenes. CDC6 y CDT1, que actúan como inhibidores de MCM2-7, pierden afinidad con el ADN al estar fosforilados, activándose la helicasa. La activación de la helicasa separa las cadenas de ADN e induce el reclutamiento de las proteínas del pre-IC. El pre-IC contiene a las proteínas que formarán parte del

replisoma (ver también sección 1.2.4), entre las que se encuentran las ADN polimerasas (Morgan, 1997; Robinson & Bell, 2005). El cargado de todas las proteínas del pre-IC resulta en la activación del origen replicativo y el consecuente inicio de la replicación del ADN (**Fig. 1.3**).

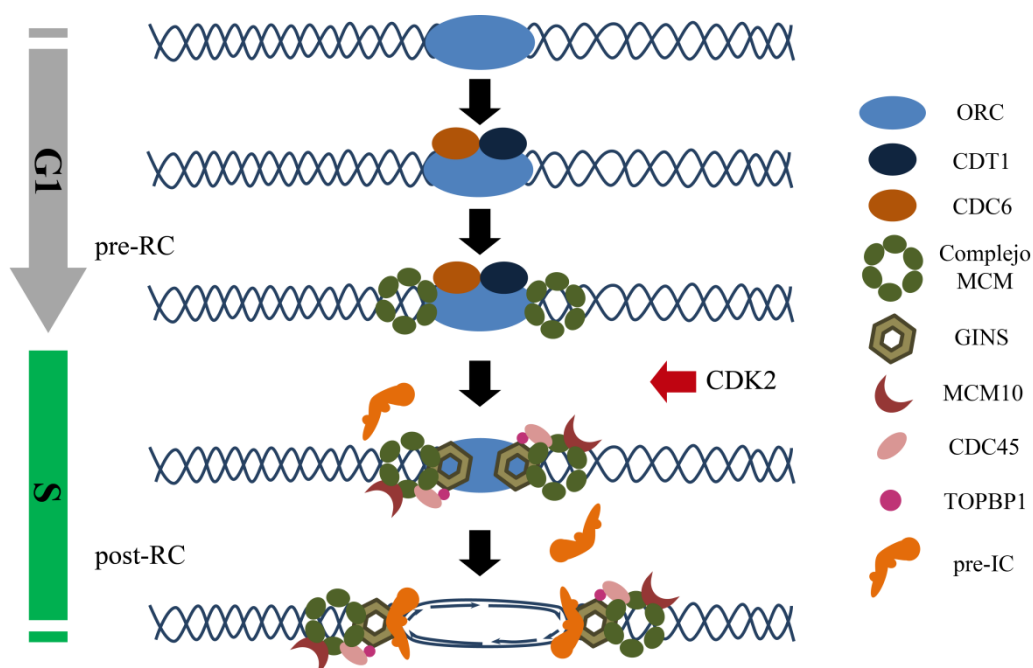


Fig. 1.3. Licenciamiento y disparo de orígenes replicativos. Los orígenes replicativos se licencian en fase G1 y se activan en fase S. En primer lugar, el complejo ORC reconoce el origen replicativo. Luego, CDT1, CDC6 y el complejo MCM (helicasa) inactivo interaccionan con ORC, formando el complejo pre-RC. La quinasa CDK2 fosforila a varios factores de replicación (MCM10, CDC45, GINS, TOPBP1) promoviendo su carga al pre-RC. CDK2 también activa al complejo MCM fosforilando a CDC6 y CDT1. La activación de la helicasa promueve el cargado del pre-IC y el origen se activa. El inicio de la replicación del ADN marca la transición en el estado del complejo, de pre-RC a post-RC (post-replicativo).

Existe un gran número de orígenes replicativos distribuidos a lo largo del genoma. Los orígenes replicativos se organizan en grupos, de modo que varios orígenes adyacentes constituyen una fábrica de replicación (Jackson & Pombo, 1998; Zeman & Cimprich, 2014). Cada fábrica de replicación controla la duplicación de aproximadamente una sección de 1 millón de pares de bases. Las fábricas de replicación se activan de manera temprana o tardía con respecto al inicio de la fase S (Fragkos et al, 2015; Masai et al, 2010; Zink et al, 1999). Esta activación diferencial se debe a que las células necesitan equilibrar la precisión, velocidad, consumo y distribución de recursos relevantes para completar la duplicación total de ADN de manera eficiente.

Las secuencias de nucleótidos que forman a los orígenes replicativos de células eucariotas no necesariamente son iguales. Aunque comparten similitudes, como tener un alto contenido de adenosina/timidina, a diferencia de las procariotas, las células eucariotas no tienen orígenes definidos por secuencias particulares. Por otro lado, el número total de orígenes replicativos sí es igual en todas las células de un mismo organismo eucariota. En cada célula humana se licencian alrededor de 50.000 orígenes (Hamperl et al, 2017), pero no todos se activan. Aquellos orígenes que se activan independientemente del tipo celular o cualquier otra condición se llaman orígenes constitutivos, mientras que aquellos que se activan en algunas células y en otras no se llaman orígenes flexibles. Los orígenes constitutivos y flexibles constituyen solo el 10% de los orígenes licenciados. El 90% restante funcionan a modo de “*backup*” y no se activan a menos que sean imprescindibles para completar la duplicación del genoma en circunstancias adversas. Estos orígenes son los llamados orígenes dormidos (Ge et al, 2007; Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015; Ibarra et al, 2008; Mirkin, 2006; Wickramasinghe et al, 2015). Se activan por ejemplo si una célula se enfrenta a un agente externo que enlentece la duplicación del ADN, asegurando así la completa duplicación del genoma.

1.2.4 El replisoma

La síntesis de ADN es llevada a cabo por un complejo proteico denominado replisoma. El replisoma se encuentra asociado a la horquilla replicativa, la coyuntura entre las dos cadenas parentales que se separaron luego de la activación del origen y se están copiando. Entre las proteínas que conforman al replisoma se destacan: la helicasa, que separa las cadenas de ADN, las RPA (del inglés *Replication Protein A*), que protegen al ADN simple cadena (ADNsc), la PCNA (del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que actúa a modo de abrazadera deslizante manteniendo unidas a otras proteínas del replisoma al ADN, y las ADN-polimerasas (**Fig. 1.4**) (Indiani & O'Donnell, 2006; Kornberg, 1960; Meselson & Stahl, 1958; O'Donnell, 2006).

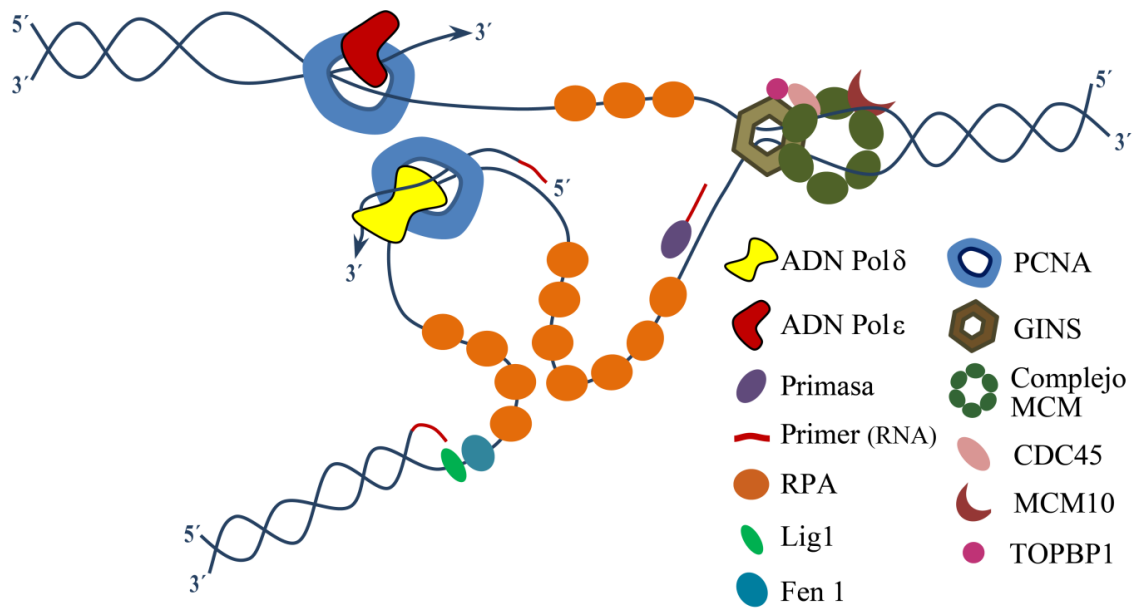


Fig. 1.4. El replisoma. El replisoma es un conjunto de proteínas que participan en la duplicación del ADN dentro de una horquilla replicativa. Mientras que el complejo MCM (helicasa), junto con GINS, CDC45 y MCM10, separan las hebras de ADN, las proteínas de andamiaje (PCNA) brindan soporte a las ADN polimerasas ϵ y δ que sintetizan las cadenas de ADN hijas. Por otro lado, las primasas sintetizan los primers o cebadores a partir de los cuales las ADN-pol inician la síntesis. Fen1 y Lig1 participan del procesamiento de los fragmentos de Okazaki eliminando los extremos 5' de ARN y uniéndolos con el fragmento anterior, respectivamente.

Las ADN-polimerasas (ADN-pol) son las enzimas que catalizan la polimerización de las cadenas hijas de ADN con nuevos nucleótidos tomando como molde las cadenas de ADN parental (**Fig. 1.5**). Las ADN-pol reconocen en su sitio activo a los nucleótidos de la cadena parental y catalizan la unión de nucleótidos complementarios sobre la cadena naciente. La polimerización de las cadenas de ADN puede ocurrir a partir de cualquiera de sus extremos 3' o 5' terminal. Sin embargo, las ADN-pol solo pueden sintetizar en sentido 5' a 3' (requieren un grupo -OH 3' libre en el azúcar para catalizar la reacción). Además, las ADN-pol no pueden iniciar una duplicación *de novo* sino que precisan que ADN primasas (ARN-polimerasas) sinteticen pequeñas cadenas de ARN (de entre 5 y 10 ribonucleótidos), llamados *primers* o cebadores, que aporten el -OH 3' libre (Kornberg, 1960; O'Donnell et al, 2013).

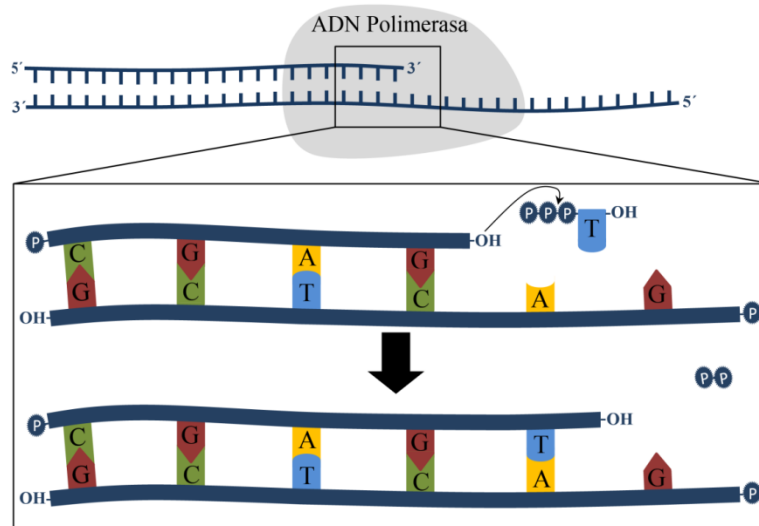


Fig. 1.5. La síntesis del ADN por ADN-polimerasas. Las ADN-polimerasas catalizan la síntesis de ADN mediante una reacción química de condensación que consiste en un ataque nucleofílico del -OH 3' libre en la cadena naciente al grupo -OH del fosfato en el nucleótido entrante, con la consecuente liberación de pirofosfato.

Las ADN-pol que sintetizan al ADN genómico en fase S tienen una tasa de error muy baja. Esto ocurre por su actividad catalítica exonucleasa correctora 3' a 5'. Esta actividad permite que las ADN-pol reconozcan y eliminen cualquier nucleótido con bases desapareadas en el extremo de la cadena de ADN naciente. La eliminación de nucleótidos de la cadena naciente ocurrirá hasta que el apareamiento entre las cadenas hija y parental sea correcto. Esta actividad otorga una inmensa fidelidad a la duplicación del ADN, evitando que se introduzcan nucleótidos incorrectos en las cadenas de ADN nacientes (Jain et al, 2018; O'Donnell et al, 2013).

1.2.5 Características básicas de la duplicación del ADN

La duplicación de ADN tiene tres características que la definen: es bi-direccional, semi-conservativa y semi-discontinua.

Síntesis bi-direccional

La duplicación del ADN se desarrolla dentro de los denominados bucles replicativos. La síntesis de ADN es bi-direccional porque un bucle replicativo está conformado por dos horquillas replicativas que avanzan en direcciones opuestas a medida que se alejan del origen de replicación y se sintetizan las

cadena de ADN hijas (O'Donnell, 2006). La duplicación del ADN en una horquilla finaliza cuando converge con otra horquilla (**Fig. 1.6**).

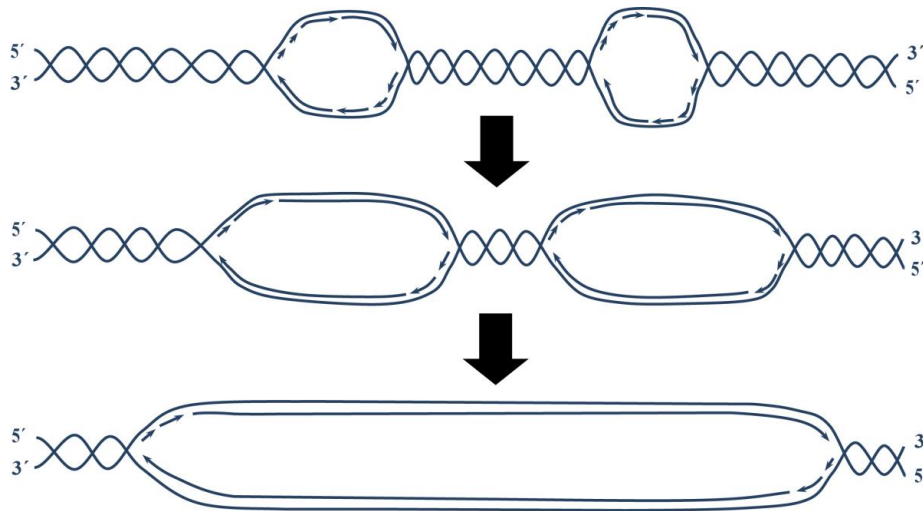


Fig. 1.6. Duplicación de ADN bi-direccional. Un bucle replicativo se forma a partir de la activación de un origen de replicación. Un bucle replicativo consta de dos horquillas replicativas que sintetizan las nuevas cadenas de ADN en direcciones opuestas. La replicación finaliza cuando una horquilla converge con otra horquilla.

Síntesis semi-conservativa

La síntesis de ADN es semi-conservativa porque cada nueva doble cadena resultante va a contener una de las cadenas originales. Esta característica fue demostrada por *Meselson y Stahl* en 1958 (*Meselson & Stahl, 1958*) cuando marcaron la doble cadena de ADN con un isótopo de nitrógeno-15 (^{15}N) y luego dejaron crecer las células en un medio con el isótopo de nitrógeno-14 (^{14}N). *Meselson y Stahl* reportaron que luego de una primera división celular apareció una señal intermedia entre ^{15}N y ^{14}N . Además observaron que luego de sucesivas divisiones en el medio con ^{14}N esa señal intermedia se diluyó y se enriqueció la señal asociada a la incorporación de ^{14}N . Estos resultados confirmaron que la duplicación del ADN es un proceso semi-conservativo, y no uno conservativo o dispersante como se discutía en aquella época.

Síntesis semi-discontinua

Inicialmente se pensaba que la síntesis de ambas cadenas de ADN era continua. Debido a que las cadenas de ADN son antiparalelas, la síntesis continua requeriría que una de las cadenas hija creciera en sentido 5' a 3' y la otra en sentido 3' a 5'. Esta teoría fue refutada dado que las ADN-pol solo pueden sintetizar en el sentido 5' a 3'. Actualmente sabemos que la síntesis de ADN es, en realidad, semi-discontinua; esto es, una de las cadenas se sintetiza de manera continua (la de crecimiento 5' a 3') y la otra en forma discontinua (la de crecimiento 3' a 5'). Cada una de estas cadenas es sintetizada por una ADN-pol específica: la cadena de síntesis continua o "líder" es sintetizada por la ADN-pol ϵ , y la cadena de síntesis discontinua o "retrasada" por la ADN-pol δ . La cadena retrasada logra extenderse en sentido 3' a 5' gracias a la síntesis de pequeños fragmentos llamados "fragmentos de Okazaki" (Okazaki et al, 1968). Los fragmentos de Okazaki se sintetizan únicamente en sentido 5' a 3' y luego de su síntesis se unen entre sí generando largas cadenas de ADN. La síntesis de cada fragmento de Okazaki (con un largo promedio de entre 100 a 200 nucleótidos) acaba cuando la ADN-pol δ se topa con el extremo 5' del cebador de ARN del fragmento anterior. Para producir una cadena continua actúa con rapidez un sistema de reparación de ADN que elimina al cebador de ARN, lo sustituye por ADN, y une ambos fragmentos.

1.3 Las barreras replicativas comprometen la duplicación del ADN

1.3.1 Las barreras replicativas atascan a las horquillas de replicación

Los replisomas pueden encontrarse con barreras replicativas que dificultan o impiden el avance de las ADN-pol. Tanto la ADN-pol δ como la ADN-pol ϵ pueden encontrarse con barreras replicativas. Dado que la dinámica de la cadena retrasada es la de sintetizar por fragmentos, si la ADN-pol δ se encuentra con una barrera replicativa, la síntesis continuará gracias a la creación de sucesivos nuevos fragmentos (de manera que la barrera quede acotada entre dos fragmentos sucesivos). Sin embargo, si la ADN-pol ϵ de la cadena líder se enfrenta a una barrera replicativa, la síntesis de esa cadena se bloquea y la horquilla se atasca (**Fig. 1.7**). El atascamiento de la horquilla causa un desacople entre la helicasa y la ADN-pol ϵ debido a que la helicasa continúa separando las cadenas de ADN mientras que la ADN-pol ϵ se frena en la barrera replicativa (Byun et al, 2005; Walter & Newport, 2000). Tal desacople resulta en: 1) la pérdida de coordinación entre la síntesis de la cadena líder y la retrasada (la ADN-pol δ continua sintetizando), y 2) la aparición de largas secuencias de ADN monocatenario o simple cadena (ADNsc) (Byun et al, 2005) (**Fig. 1.7**). En este capítulo se describirá cómo las barreras replicativas pueden provocar errores de copiado, cambiando la secuencia de nucleótidos original. Si no es reparada, dicha modificación en la secuencia de nucleótidos persiste como una mutación.

Existen tres tipos de barreras replicativas: lesiones en el ADN, complejos persistentes entre ADN y proteínas, y estructuras secundarias en el ADN (Patel & Weiss, 2018; Zeman & Cimprich, 2014). A continuación se profundizará sobre los tres tipos de barreras replicativas.

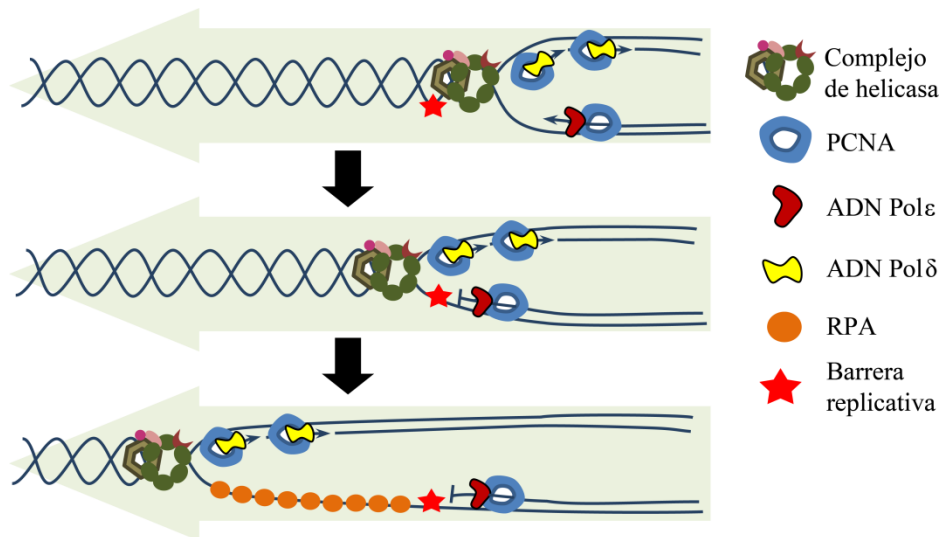


Fig. 1.7. Las horquillas atascadas resultan en largos tramos de ADNsc y en la pérdida de coordinación entre las cadenas líder y retrasada. La flecha verde indica la dirección de la helicasa, es decir de la apertura de la doble cadena. Cuando la ADN-pol ϵ (cadena líder) se enfrenta con una barrera replicativa, esta se atasca y se desacopla de la helicasa debido a que esta última continúa avanzando. Este desacople entre la helicasa y la ADN-pol ϵ resulta en la aparición de largos tramos de ADNsc. Además, el avance de la ADN-pol δ sobre la cadena retrasada continúa, lo que resulta en la pérdida de la coordinación con la ADN-pol ϵ .

Daño al ADN

El daño al ADN sucede como consecuencia de reacciones químicas espontáneas, por exposición a radiación o a ciertos agentes químicos. Ejemplos de daño que puede sufrir una molécula de ADN son: desapareamiento de bases, unión cruzada de dos bases adyacentes o alquilaciones de bases (Hartwell, 2018). Las ADN-pols pueden atascarse en cualquiera de estas lesiones al ADN. Las ADN-pols solo acomodan bases inalteradas en su sitio activo, por lo que un mínimo cambio químico es suficiente para atascar las horquillas.

Complejos de ADN-proteína

Las proteínas que interactúan con el ADN pueden representar barreras replicativas en sí mismas (Stingele et al, 2017; Zeman & Cimprich, 2014). Las barreras más frecuentes de este tipo son los complejos transcripcionales activos (Zeman & Cimprich, 2014).

Estructuras secundarias de ADN

Además de la doble hélice convencional, el ADN puede formar varias estructuras secundarias que difieren de su esquema helicoidal clásico y

atascan a las horquillas replicativas (Mirkin, 2006; Wickramasinghe et al, 2015). Las estructuras secundarias alternativas del ADN se producen por secuencias particulares de nucleótidos. Por ejemplo, las repeticiones de nucleótidos en espejo forman la conformación *triplex*, las repeticiones directas o complementarias inversas forman los *hairpins*, y las regiones ricas en guanina forman los *G4-cuadrupelex*.

1.3.2 Las barreras replicativas activan la Respuesta al Daño de ADN

Para hacer frente al atascamiento de horquillas, las células activan la Respuesta al Daño de ADN (o DDR, por sus siglas en inglés *DNA Damage Response*). La DDR es una compleja e interconectada red de rutas metabólicas que resuelven las barreras replicativas y/o permiten que las horquillas atascadas puedan atravesar las barreras (Branzei & Foiani, 2010; Ciccia & Elledge, 2010; Forment & O'Connor, 2018; Friedberg et al, 2006; Techer et al, 2017). Las vías de la DDR actúan generalmente en simultáneo e incluyen mecanismos de reparación de ADN, síntesis de ADN a pesar del daño (tolerancia al daño) y señalización nucleoplasmática (los *checkpoints* del ciclo celular). A continuación se profundizará sobre estas tres vías de DDR.

Mecanismos de reparación del ADN

Los mecanismos de reparación más estudiados son: reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés *Nucleotide Excision Repair*), reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés *Base Excision Repair*), reparación de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés *Non-homologous End Joining*), reparación por discordancia de bases (*Mismatch Repair*) y reparación por recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés *Homologous Recombination*). En función del tipo de daño al ADN y de la fase del ciclo celular, las células activan distintos mecanismos de reparación (Friedberg et al, 2006). Por ejemplo, la reparación por discordancia de bases funciona principalmente durante la fase S. Esta vía reconoce tramos de ADN con al menos una base desapareada. El mecanismo de reparación consiste en la remoción de la sección de la cadena de ADN que contiene la base desapareada y la posterior síntesis de esa sección eliminada (Branzei & Foiani, 2008).

Mecanismos de tolerancia al daño del ADN

Si el ADN es dañado en fase S, es posible que los mecanismos de reparación sean insuficientes para evitar un encuentro del replisoma con el ADN dañado. Además el replisoma puede encontrarse con otro tipo de barreras, como las estructuras secundarias de ADN. Para evitar que el replisoma se atasque, se activa un proceso de tolerancia denominado síntesis por translesión (TLS, por sus siglas en inglés *Translesion Synthesis*) (Lehmann et al, 2007; Sale et al, 2012) que promueve que el replisoma atraviese la barrera replicativa reemplazando a la ADN-pol ϵ canónica por una ADN-pol alternativa de TLS.

Las células humanas contienen más de 10 ADN-pols de TLS. Estas ADN-pols de TLS son menos fieles que las ADN-pols constitutivas. Por esta razón, este mecanismo arriesga introducir una mutación en pos de prevenir el atascamiento persistente de la horquilla replicativa. Las polimerasas de TLS son muy mutagénicas pero tienen una baja procesividad. Una vez superada la barrera replicativa, se vuelve a posicionar la ADN-pol ϵ constitutiva en el replisoma. Algunas de estas ADN-pols de TLS han evolucionado de manera de añadir el nucleótido preciso en oposición a algunas barreras específicas. Por ejemplo, la ADN-pol alternativa Pol η tolera los dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD, del inglés *cyclobutane pyrimidine dimers*) inducidos por UV con una tasa de mutagénesis llamativamente baja (Abdulovic & Jinks-Robertson, 2006; Johnson et al, 1999; Washington et al, 2000). Debido a que los CPDs constituyen el principal fotoproducto provocado por los rayos UV, Pol η tiene un papel destacado en la TLS post-UV. Sin embargo, cabe destacar que la misma polimerasa puede ser muy mutagénica ante otro tipo de lesiones.

Checkpoints

Los *checkpoints* son componentes claves en la DDR ya que su activación frena al ciclo celular, generando una ventana temporal para eliminar o atravesar las barreras replicativas mediante procesos de reparación o tolerancia, respectivamente. En caso de que la barrera sea reparada o tolerada, la DDR se inactiva, reanudando el ciclo celular. El *checkpoint* intra-S, por ejemplo, se activa por horquillas atascadas en barreras replicativas en fase S (Berti et al, 2020) y desencadena una vía de señalización molecular que se

esparce en el nucleoplasma, desacelerando la fase S. Los cortes de doble cadena y el ADN simple cadena que se acumula en horquillas atascadas activan a las quinasas ATM y ATR, respectivamente (Abraham, 2001; Paulsen & Cimprich, 2007; Pilie et al, 2019; Smith et al, 2010). ATM (*kinase ataxia-telangiectasia mutated*) y ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*) son miembros de la familia de fosfoinositida 3-quinasa (PIKK, por sus siglas en inglés *phosphoinositide 3-kinase*). Al activarse, ATM y ATR fosforilan y activan a sus quinasas *target* CHK2 y CHK1, respectivamente. Las quinasas CHK2 y CHK1 son liberadas al nucleoplasma donde fosforilan y, consecuentemente, gatillan la degradación de CDC25, una fosfatasa activadora de CDKs. Las rutas ATM-CHK2 y ATR-CHK1 ultiman en la inhibición de ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2, respectivamente, y en la consecuente ralentización o freno de la fase S.

1.3.3 Las barreras replicativas pueden inducir el colapso de las horquillas replicativas

El atascamiento de una horquilla replicativa desacopla la helicasa de la ADN-pol ϵ . Tal desacople resulta en la aparición de largos tramos de ADNsc (**Fig. 1.7**), lo que activa el *checkpoint* intra-S vía ATR-CHK1. La activación del *checkpoint* intra-S crea una ventana temporal para que la horquilla atascada pueda repararse o tolerarse por TLS. Además, la vía ATR-CHK1 del *checkpoint* intra-S también puede resolver una horquilla atascada por la activación de orígenes dormidos cercanos dentro de la misma fábrica replicativa (ver también sección 1.6.3). En este caso, un nuevo bucle replicativo bi-direccional generado por la activación del origen dormido cercano converge con la horquilla atascada y la resuelve (**Fig. 1.8**). Si los mecanismos de resolución del atascamiento de horquillas fallan, puede darse el “colapso” de la horquilla. Una horquilla colapsada se define como una horquilla que ha perdido la capacidad de reanudar la síntesis de ADN (Cortez, 2015). El colapso de horquillas es un evento poco común a menos que las células carezcan de DDR y/o sean expuestas a agentes de daño. En células con DDR activo y con grandes cantidades de barreras replicativas, si el número de horquillas atascadas supera la capacidad de respuesta, la acumulación de horquillas colapsadas

desencadena muerte celular por apoptosis o senescencia celular (Roos & Kaina, 2006; Roos & Kaina, 2013; Roos et al, 2016).

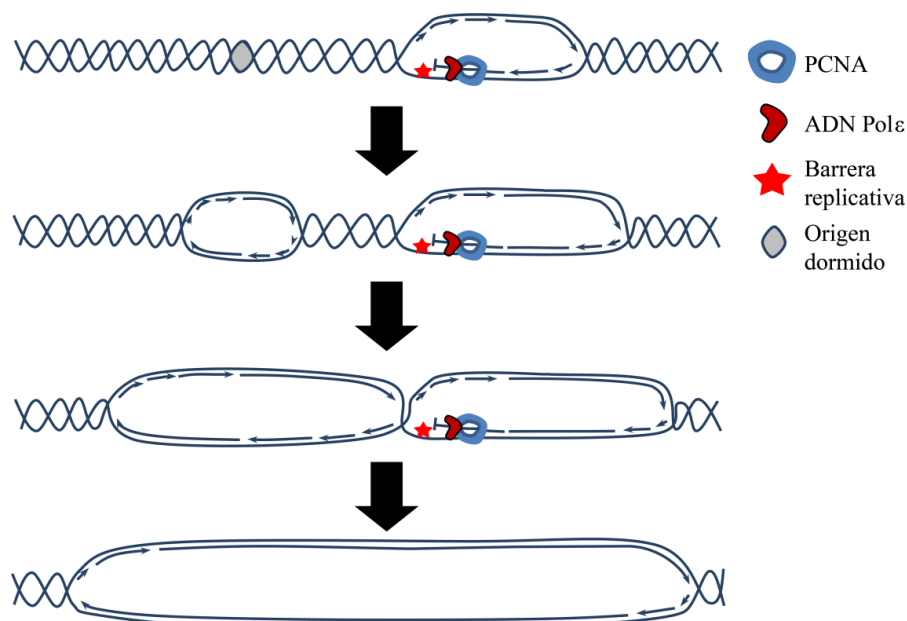


Fig. 1.8. Resolución de una horquilla atascada por activación de un origen replicativo cercano. Una horquilla atascada por una barrera replicativa puede resolverse por la activación de un origen dormido adyacente dentro de la misma fábrica replicativa. Esta resolución ocurre cuando una de las horquillas del origen recientemente activado se encuentre con la horquilla atascada.

¿Por qué colapsan las horquillas? Las horquillas replicativas solo pueden estar atascadas durante un tiempo determinado. Superado ese período, el ADNsc que se acumula como consecuencia del desacople entre la helicasa y la ADN-Pol ϵ puede derivar en un DSB asociado a la horquilla replicativa (Calzada et al, 2005; Cortez, 2015; Pasero & Vindigni, 2017). El DSB asociado a horquilla replicativa ocurre como consecuencia del corte en una de las cadenas parentales (**Fig. 1.9**). Este corte del ADNsc (la cadena parental) produce un corte de doble cadena (DSB) dado que la cadena hija complementaria nunca se llegó a sintetizar. Este DSB puede producirse mecánicamente como consecuencia de la tensión o por el accionar de una endonucleasa. El DSB mecánico ocurre por la extensión excesiva del ADNsc que alcanza longitudes tales que agota los niveles de la proteína protectora de ADNsc (RPA) (Toledo et al, 2013). El DSB provocado por endonucleasas se debe a la estructura particular que adquiere una horquilla cuando se atasca. Esta estructura puede ser reconocida y cortada por endonucleasas específicas.

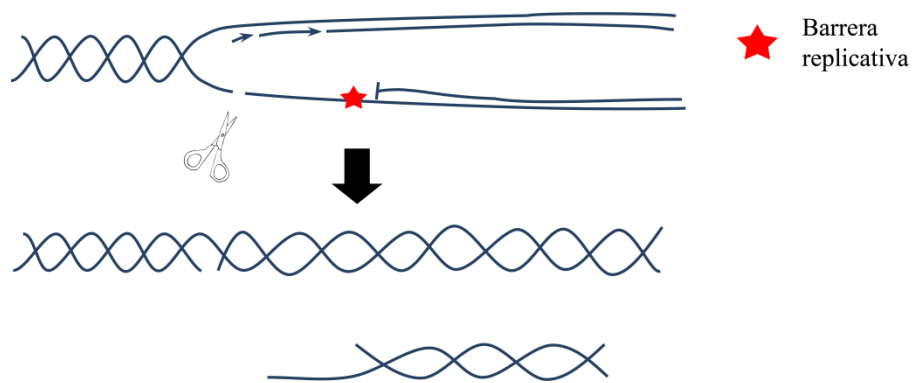


Fig. 1.9. DSB asociado a horquilla replicativa. Representación de una horquilla replicativa atascada que deriva en un DSB. Este DSB se produce por un corte en el ADNsc de la cadena parental en la horquilla replicativa. El corte en solo una de las cadenas produce un DSB dado que la cadena hija complementaria no se llegó a sintetizar. El corte en el ADNsc puede ocurrir por tensión o ser provocado por una endonucleasa.

1.4 Las endonucleasas específicas de estructura procesan horquillas atascadas

1.4.1 La endonucleasa MUS81: un actor central en la DDR

Las horquillas atascadas pueden derivar en un DSB provocado por tensión excesiva o por una endonucleasa. Aquellos DSBs provocados por tensión son mucho más graves que los provocados por una endonucleasa, dado que estos últimos pueden promover un proceso recombinogénico denominado *Fork Restart* que facilita el reinicio de la horquilla y evita su colapso (Berti et al, 2020; Quinet et al, 2017). MUS81 es una endonucleasa específica de estructura que puede cortar una horquilla replicativa atascada y promover *Fork Restart*.

Una endonucleasa específica de estructura reconoce ADN con una estructura particular y lo corta desde el interior de la cadena. MUS81 pertenece a esta familia de endonucleasas selectivas de estructura de ADN (**Fig. 1.10**) cuyos miembros forman complejos heterodiméricos compuestos por una subunidad catalítica y una no catalítica. En el caso de MUS81 encontramos los complejos MUS81-EME1 y MUS81-EME2, siendo EME1 (del inglés *essential meiotic structure-specific endonuclease 1*) y EME2 (del inglés *essential meiotic structure-specific endonuclease 2*) las subunidades no catalíticas (Ciccina et al, 2007; Ciccina et al, 2008; Pepe & West, 2014; Pfander & Matos, 2017). Además, MUS81-EME1 y MUS81-EME2 deben interaccionar con SLX4 (*Structure-Specific Endonuclease Subunit SLX4*) para ser funcionales. SLX4 es una proteína de andamiaje que proporciona una plataforma para el reconocimiento y procesamiento de estructuras específicas de ADN. Como veremos a continuación, MUS81 es una enzima fuertemente regulada por el ciclo celular (Dehe & Gaillard, 2017; Pfander & Matos, 2017).

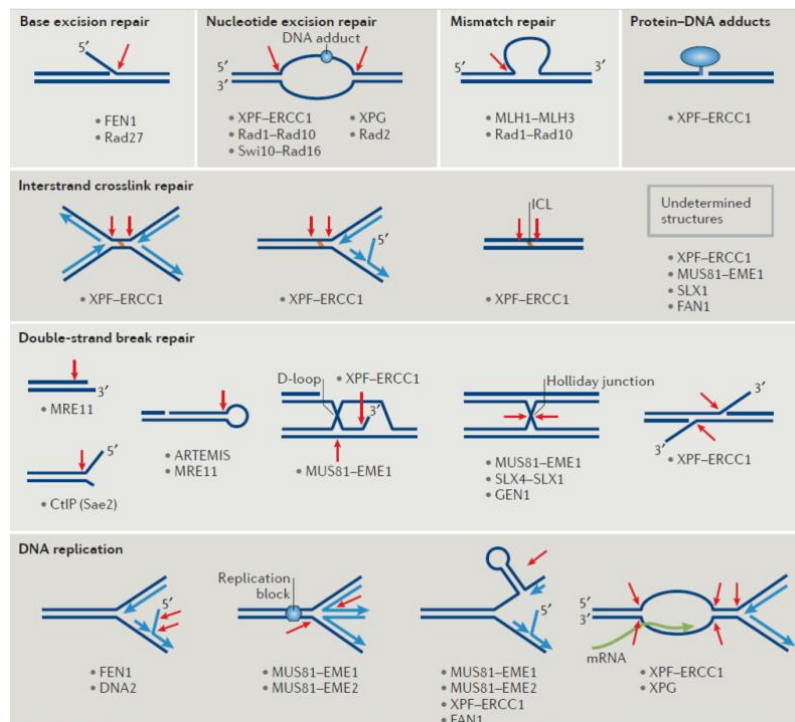


Fig. 1.10. Representación esquemática de estructuras secundarias de ADN que son procesadas por endonucleasas específicas de estructura. Las flechas rojas indican los puntos de escisión del ADN, las flechas celestes indican síntesis de ADN y las flechas verdes indican síntesis de ARN. Nótese particularmente a las estructuras reconocidas por MUS81-EME1 y MUS81-EME2 dado que son protagonistas de esta tesis. Esta imagen fue tomada de Pierre-Marie Dehé, et al., Nat. Rev., 2017.

1.4.2 MUS81-EME1 se activa en mitosis

CDK1 fosforila a EME1 (Matos et al, 2011; Wyatt et al, 2013) promoviendo su unión a MUS81. Esta fosforilación restringe la actividad de MUS81-EME1 a mitosis, dado que CDK1 se activa en esta fase del ciclo celular (**Fig. 1.11**). La restricción en la actividad de MUS81-EME1 a la mitosis es relevante ya que se observó que la activación aberrante de CDK1 en fase S provoca grandes cantidades de DSBs como consecuencia de la actividad de MUS81-EME1 sobre horquillas replicativas “sanas” (Duda et al, 2016).

Debido al tipo de estructura reconocida por MUS81-EME1, esta endonucleasa participa en el mecanismo de reparación de DSBs llamado recombinación homóloga. La recombinación homóloga es un mecanismo de reparación preferencialmente activo en G2/M. Su función está restringida a G2 y mitosis porque se trata de un mecanismo recombinogénico (proceso por el cual dos moléculas similares o idénticas de ADN intercambian sus cadenas) que requiere que el genoma se haya duplicado para poder utilizar como molde

a la cadena recientemente copiada (Szostak et al, 1983; Wright et al, 2018). Durante la recombinación homóloga en G2/M, MUS81-EME1 reconoce y resuelve las uniones de Holliday, estructuras compuestas por el cruce de dos cadenas de ADN durante el proceso recombinogénico entre dos cromosomas homólogos (Dehe & Gaillard, 2017; Naim et al, 2013). Esta resolución de las uniones de Holliday evita errores en la segregación de las cromátidas hermanas y se considera la función canónica de MUS81.

1.4.3 MUS81-EME2 se activa en fase S

MUS81 interacciona con EME2 solo en fase S, de manera que, correlativamente a MUS81-EME1 en mitosis, EME2 circunscribe el accionar de MUS81-EME2 a fase S. Actualmente se desconoce cómo se previene la formación del complejo MUS81-EME2 en la fase G2/M (**Fig. 1.11**) (Pepe & West, 2014).

MUS81-EME2 corta horquillas atascadas en fase S (ver “DNA replication” en la **Fig. 1.10**) (Dehe & Gaillard, 2017; Pepe & West, 2014). Estos cortes pueden concluir en una horquilla colapsada que no pueda reanudar la síntesis de ADN. Aunque también puede promover el reinicio de la horquilla por un proceso llamado *Fork restart*.

En resumen, los cortes en el ADN generados por MUS81-EME1 y MUS81-EME2 son normalmente beneficiosos para la homeostasis celular. De hecho, el silenciamiento de MUS81 en células humanas provoca defectos en la progresión de las horquillas replicativas y en la segregación del material genómico (Lai et al, 2017; Xing et al, 2015). Esto aumenta el riesgo de desarrollar cáncer: los ratones MUS81 *-/-* tienen una mayor predisposición a desarrollar linfomas, cáncer de mama y cáncer de próstata (McPherson et al, 2004). Sin embargo, si la actividad de MUS81 no está controlada y es aberrante, puede causar graves daños al ADN.

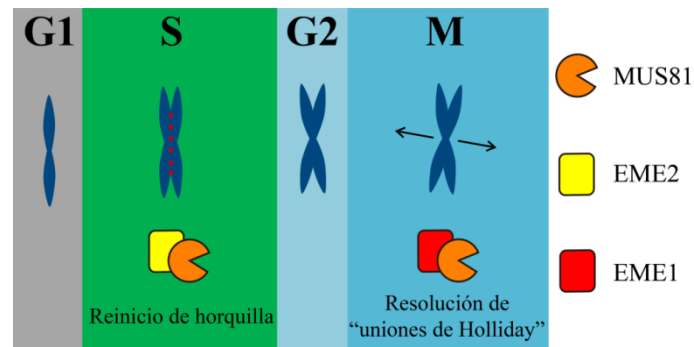


Fig. 1.11. Funciones de las endonucleasas MUS81-EME1 y MUS81-EME2. MUS81 precisa de las proteínas estructurales EME1 y EME2 para reconocer determinadas estructuras de ADN. MUS81-EME2 procesa horquillas atascadas en fase S permitiendo el reinicio de la replicación (Fork Restart). MUS81-EME1 procesa las uniones de Holliday durante la recombinación homóloga en mitosis. Esta imagen fue copiada de Pepe and West, Cell Rep., 2014.

1.5 El estrés replicativo y la inestabilidad genómica en células tumorales

1.5.1 Las células tumorales y el estrés replicativo

Según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud, una de cada cinco muertes es por cáncer. Las células cancerígenas o tumorales rompen las reglas más básicas del comportamiento celular y aprovechan todo tipo de oportunidades para llevar a cabo su único objetivo: crecer descontroladamente e invadir otros tejidos. Al estudiar estas transgresiones, la ciencia ha descubierto una infinidad de mecanismos moleculares que dan entidad a la biología celular misma. Además, el desarrollo de nuevos tratamientos oncológicos depende íntimamente de la exploración y la comprensión de dichos mecanismos moleculares.

Las células tumorales se diferencian de las normales en dos aspectos fundamentales: 1) se reproducen a pesar de las restricciones que bloquean la proliferación celular, y 2) invaden y colonizan territorios reservados para otras células (Hanahan & Weinberg, 2000). La mayoría de las células normales dejan de dividirse cuando se diferencian en células especializadas o como respuesta a daños en su ADN. Las células tumorales, por el contrario, continúan dividiéndose aun en presencia de daño al ADN. Esta división descontrolada aumenta el estrés replicativo.

El estrés replicativo se define como cualquier alteración en la coreografía replicativa (Forment & O'Connor, 2018; Gaillard et al, 2015; Pilie et al, 2019; Rodriguez-Acebes et al, 2018). La coreografía replicativa se refiere a la distribución espacial y temporal de la activación de los orígenes replicativos en relación a la velocidad de síntesis en las horquillas replicativas. Estos parámetros pueden ser analizados y cuantificados en manera precisa mediante el ensayo de estiramiento de fibras de ADN que nos permite visualizar horquillas replicativas individuales al microscopio, y así cuantificar la velocidad promedio de síntesis y la frecuencia de orígenes replicativos activos (Gonzalez Besteiro et al, 2019) (ver también sección 4.6).

La coreografía replicativa es un proceso fuertemente regulado, pero también extremadamente maleable ya que debe garantizar la duplicación de la

totalidad del genoma y mantener la homeostasis (Ge et al, 2007; Ibarra et al, 2008; Rodriguez-Acebes et al, 2018). Un mayor disparo de orígenes se compensa con una menor velocidad de síntesis de ADN en las horquillas replicativas. En este caso, la menor velocidad de síntesis de ADN ocurre porque el aumento en el número de replisomas (producto del disparo excesivo de orígenes) hace que estos compitan por una disponibilidad limitada de nucleótidos y de otros factores indispensables para la duplicación del ADN. Contrariamente, una menor velocidad de síntesis de las horquillas replicativas se compensa con un mayor disparo de orígenes dormidos (Anglana et al, 2003; Poli et al, 2012).

1.5.2 Estrés replicativo agudo y moderado

El estrés replicativo puede ser clasificado en estrés replicativo agudo y estrés replicativo moderado en función de su intensidad y sus consecuencias (Bohly et al, 2019; Wilhelm et al, 2019).

Estrés replicativo agudo

El estrés replicativo agudo induce cambios en la coreografía replicativa que son detectables a través del ensayo de estiramiento de fibras (Wilhelm et al, 2019) y está asociado a la acumulación de ADNsc, DSBs y marcadores de ADN dañado. Los marcadores de ADN dañado incluyen la fosforilación de la serina 824 (Ser824) en la proteína KAP1, las fosforilaciones de las Ser4 y Ser8 en RPA32 o la fosforilación en la Ser139 en la variante de la histona H2A, H2AX (γ H2AX) (Forment & O'Connor, 2018; Pilie et al, 2019; Zeman & Cimprich, 2014).

γ H2AX es uno de los indicadores de daño al ADN más utilizados en laboratorios de investigación y en la clínica (Cleaver, 2011; Pouliliou & Koukourakis, 2014; Redon et al, 2012). La organización subnuclear de γ H2AX varía dependiendo de la cantidad de ADN dañado que gatilla su fosforilación. Se reportan dos tipos de cúmulos de esta histona fosforilada: focos discretos subnucleares o marcación uniforme e intensa en todo el núcleo (pan-nuclear). (Cleaver, 2011). Los focos discretos de γ H2AX revelan daños discretos al ADN; γ H2AX modificaría la cromatina en estos puntos de manera de aumentar la

accesibilidad de proteínas de reparación o remodelación. En cambio, la distribución pan-nuclear de γ H2AX es un indicador de la llamada “catástrofe replicativa”. La catástrofe replicativa se refiere a rupturas masivas de todas las horquillas de ADN y se asocia por lo tanto a la acumulación excesiva de ADNsc y DSBs (Buisson et al, 2015; Duda et al, 2016; Gonzalez Besteiro et al, 2019; Murfuni et al, 2013; Sakurikar et al, 2016; Techer et al, 2016; Toledo et al, 2013). La catástrofe replicativa no se observa como la ruptura gradual de horquillas, sino como la aparición repentina y pan-nuclear de cientos de DSBs localizados en fábricas replicativas activas. Dado el daño masivo al ADN al cual se asocia, la catástrofe replicativa es incompatible con la supervivencia celular (Toledo et al, 2017; Toledo et al, 2013).

Estrés replicativo moderado

A diferencia del estrés replicativo agudo, el estrés replicativo moderado no causa cambios en la coreografía replicativa (o al menos no causa cambios detectables mediante la técnica de estiramiento de fibra), no induce la formación de DSBs ni la acumulación pan-nuclear del marcador de daño al ADN γ H2AX (Bohly et al, 2019; Wilhelm et al, 2019). Sin embargo, el estrés replicativo moderado puede derivar en la acumulación de secuencias de ADN que no llegaron a ser duplicadas en fase S o, también llamadas, UR-DNA (del inglés *under-replicated DNA*). Estos UR-DNA no activan al *checkpoint* en S y son transmitidos a la fase G2, y luego a la mitosis (Lemmens & Lindqvist, 2019; Lezaja & Altmeyer, 2021; Moreno et al, 2016). Los UR-DNA se acumulan en regiones del genoma de difícil duplicación como son las zonas con baja frecuencia de orígenes replicativos (Bhowmick & Hickson, 2017; Ozer & Hickson, 2018). Una secuencia pobre en orígenes tiene una mayor probabilidad de no ser completamente duplicada si una horquilla replicativa se atasca. En capítulos previos mencionamos que una horquilla replicativa que se atasque puede ser resuelta por la activación de orígenes dormidos cercanos en donde una de las dos horquillas del nuevo bucle replicativo bi-direccional podrá converger con la horquilla atascada y resolverla (**Fig. 1.8**). Sin embargo, si dos horquillas adyacentes se atascan y no hay un origen intermedio que pueda activarse para resolverlas, la secuencia de ADN entre ambas horquillas se mantendrá sin duplicar hasta el final de la fase S. Muchas zonas de difícil

duplicación han sido identificadas en el genoma: los sitios frágiles comunes (CFS, del inglés *common fragile sites*), los centrómeros y los telómeros (Durkin & Glover, 2007; Ozer & Hickson, 2018). Dada la dificultad en la duplicación de estas secuencias de ADN se supone que, incluso en condiciones normales caracterizadas por un bajo nivel de estrés replicativo, una célula humana puede entrar a mitosis con algunas de dichas regiones sub-duplicadas (Minocherhomji et al, 2015).

En el caso en que las secuencias de UR-DNA se mantengan sin resolver a lo largo de la mitosis (existe un mecanismo de reparación de UR-DNA en mitosis, ver sección 1.4.3), estas se manifestarán como puentes ultrafinos (UFBs, por sus siglas en inglés *Ultra Fine Bridges*) en las anafases (Bizard & Hickson, 2018; Burrell et al, 2013; Moreno et al, 2016). Los UFBs son finas cadenas de ADN desprovistas de histonas que unen ambos polos de una célula anáfase (Fig. 1.12); los UFBs son tan delgados que no pueden ser identificados por tinciones clásicas de ADN como DAPI. Las translocasas PICH y BLM (cuya inmunotinción permite la detección de los UFBs) se posicionan a lo largo del UFB para permitir la segregación equitativa del ADN no-duplicado (Chan et al, 2007; Falquet & Rass, 2019). Si esto no ocurre, los UFBs se rompen por tensión cuando las cromátidas hermanas se separan al final de la anafase.

El daño provocado por la ruptura de un UFB es transmitido a las células hijas y protegido por dos “cuerpos nucleares de 53BP1” (53BP1-NB, del inglés *53BP1 nuclear body*) en fase G1 (Fernandez-Vidal et al, 2017; Harrigan et al, 2011; Lukas et al, 2011) (Fig. 1.12). Los 53BP1-NBs son complejos proteicos formados por la proteína 53BP1 (cuya función canónica está vinculada a la reparación de DSBs) y otras proteínas de la DDR. Los 53BP1-NBs protegen al UR-DNA dañado del ataque de las nucleasas. Esta protección permite que el UR-DNA dañado llegue a la fase S de las células hijas sin ser degradado, lo que implica que el UR-DNA tiene una segunda oportunidad para duplicarse. Esta duplicación “desfasada” la dirigen la proteína RIF1, el complejo Shieldin y RAD52. RIF1 y el complejo Shieldin son reclutados al 53BP1-NB en la fase G1 para retrasar la activación de los orígenes cercanos a la zona dañada hasta la fase S tardía. El retraso hasta la fase S tardía asegura que sea la proteína

RAD52 la que interaccione con el 53BP1-NB, y no su homóloga RAD51 cuya actividad induciría un proceso recombinogénico genotóxico. RAD52 es una recombinasa que cataliza la reparación acoplada a la replicación del UR-DNA. Así, RAD52, como parte del 53BP1-NB, completa la duplicación del UR-DNA heredado de la célula madre (Spies et al, 2019).

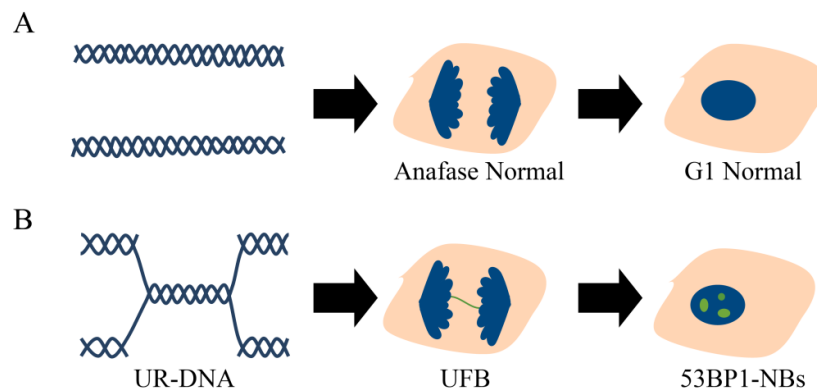


Fig. 1.12. El UR-DNA que no se resuelve en mitosis induce un UFB en anafase y 53BP1-NBs en G1. Una célula que haya duplicado completamente su genoma presenta una anafase y dos células hijas en G1 normales (A). En cambio, las secuencias de ADN sin duplicar (UR-DNA) que se mantienen en la mitosis y no logran resolverse se manifiestan en la anafase como puentes ultrafinos o UFBs (B). La tensión ocasionada por la separación de los cromátidas hermanas termina cortando a los UFBs provocando un daño que se transmite a las células hijas. Este ADN dañado se cubre por los llamados “cuerpos nucleares de 53BP1” o 53BP1-NBs (B).

1.5.3 MiDAS: la última oportunidad de sintetizar el ADN sin duplicar en mitosis

Como mencionamos en el capítulo previo, el estrés replicativo puede aumentar la frecuencia de secuencias de ADN sin duplicar al final de la fase S (UR-DNA). Ese UR-DNA pasa a mitosis donde puede ser resuelto por un proceso llamado “Síntesis de ADN en mitosis” o “MiDAS” (por sus siglas en inglés, *Mitotic DNA Synthesis*) (Bergoglio et al, 2013; Franchet & Hoffmann, 2019; Lezaja & Altmeyer, 2021; Minocherhomji et al, 2015; Ozer & Hickson, 2018). No necesariamente la activación de MiDAS va a completar la duplicación del UR-DNA. En los casos en que queden secuencias aun sin duplicar al final de la mitosis, el UR-DNA se manifiesta como un UFB en anafase, que a su vez resulta en dos 53BP1-NBs en G1 (ver también sección 1.5.2).

MiDAS es, en esencia, la duplicación del UR-DNA durante la mitosis. MiDAS es un proceso que está aún poco comprendido ya que hay pocos estudios al respecto y los mismos están principalmente restringidos a estudios con el inhibidor de las ADN-pols, afidicolina (APH) (Ozer & Hickson, 2018). El modelo actual indica que MiDAS no resulta de la mera continuación en mitosis de la replicación semi-conservativa convencional que tiene lugar en la fase S. En cambio, MiDAS podría representar una forma de replicación conservativa inducida por un corte en el ADN (BIR, por sus siglas en inglés *Break Induced Replication*) (Bhowmick et al, 2016; Minocherhomji et al, 2015; Ozer & Hickson, 2018). BIR es una vía de reparación de DSBs en donde uno de los extremos del DSB invade por microhomología a otra secuencia de ADN, y una ADN-pol sintetiza el ADN dañado tomando como templado la cadena de ADN invadida (Lai et al, 2017; Minocherhomji et al, 2015). Durante MiDAS, el DSB depende de la endonucleasa MUS81-EME1, que reconoce y corta al UR-DNA. RAD52 cataliza la invasión e interacción por microhomología del extremo 3' del UR-DNA cortado con otras regiones del genoma, dando lugar a la formación de un bucle tipo D. La subunidad catalítica de la ADN-Pol δ (POLD3) se posiciona en el extremo 3' del UR-DNA cortado e inicia la replicación del ADN. A medida que avanza la síntesis del ADN, el bucle replicativo se desplaza en esa misma dirección de síntesis. Finalmente, la cadena de ADN naciente se usa como molde para que otra ADN-pol se posicione y sintetice en sentido contrario (**Fig. 1.13**). MiDAS es un proceso de síntesis conservativa dado que la doble cadena hija resultante (cadena amarilla y naranja de la **Fig. 1.13**) no tiene cadena parental (cadena violeta de la **Fig. 1.13**) (Bhowmick et al, 2016; Minocherhomji et al, 2015).

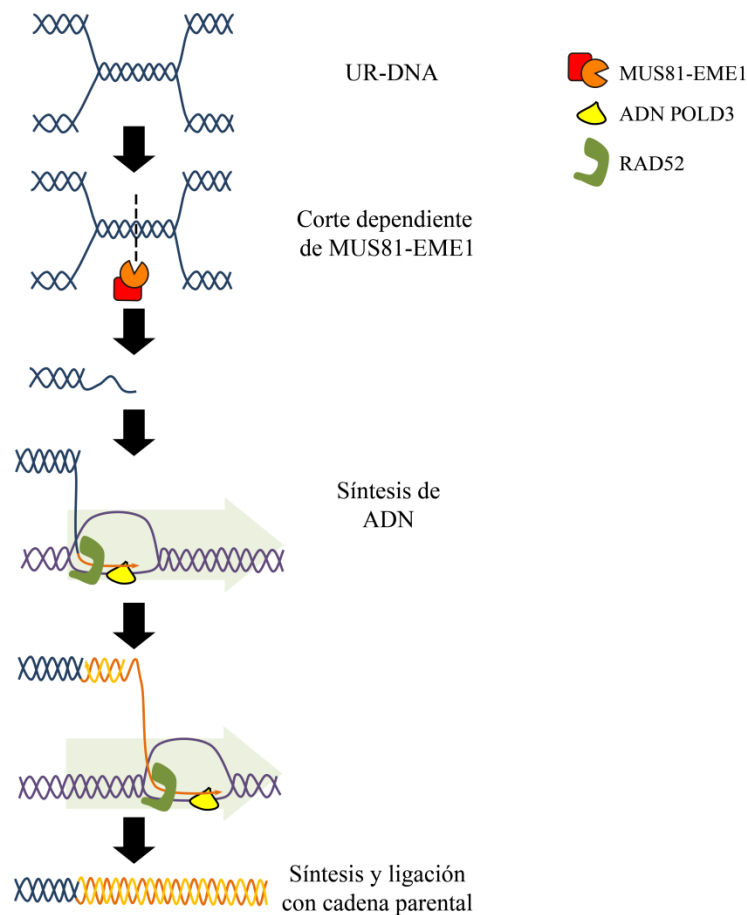


Fig. 1.13. Modelo de síntesis de ADN en mitosis. Según el modelo de MiDAS, las secuencias de ADN sin duplicar que entran a mitosis (UR-DNA) son sustrato de la endonucleasa MUS81-EME1. Luego, RAD52 permite que una de las cadenas liberadas por el corte (color naranja) interaccione por microhomología con otra secuencia de ADN (color violeta) produciendo un bucle tipo D. POLD3 se posiciona en el extremo 3' de la cadena que forma el bucle e inicia la replicación del ADN (la cadena de ADN sintetizada por POLD3 se representa en color naranja; la flecha verde indica la dirección de la síntesis). Finalmente, la cadena de ADN naciente (naranja) es usada como molde para la síntesis de su cadena complementaria (esta cadena complementaria se representa en color amarillo).

1.5.4 Las células tumorales y la inestabilidad genómica

La mayoría de las células cancerosas acumulan cambios genéticos a una velocidad elevada y se dice que son genómicamente inestables. La inestabilidad genómica reagrupa sustituciones de pares de bases, inserciones y deleciones, cambios en el número total de cromosomas y/o modificaciones en la estructura de los mismos (Andor et al, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011; Russo et al, 2015; Siri et al, 2021).

La inestabilidad cromosómica es un subtipo de inestabilidad genómica propia de la mayoría de los tumores sólidos (Vargas-Rondon et al, 2017). La inestabilidad cromosómica se define como una tasa persistentemente alta de

pérdida y/o ganancia de cromosomas enteros y/o fragmentos de cromosomas (Bakhoun & Cantley, 2018; Lepage et al, 2019; Siri et al, 2021). La inestabilidad cromosómica se divide principalmente en dos grupos: la inestabilidad cromosómica estructural y la inestabilidad cromosómica numérica (Bayani et al, 2008; Siri et al, 2021). La inestabilidad cromosómica numérica se refiere a la pérdida o ganancia de cromosomas completos, lo que conduce a aneuploidía. La aneuploidía se define como un complemento cromosómico anormal por adición o eliminación de cromosomas. Por otro lado, la inestabilidad cromosómica estructural se refiere a reordenamientos cromosómicos como inversiones, amplificaciones, deleciones, o translocaciones entre cromosomas no homólogos. Mientras que la aparición de la inestabilidad cromosómica numérica generalmente se asocia a errores en la segregación cromosómica (Cahill et al, 1998; Kops et al, 2005; Russo et al, 2015; Siri et al, 2021), la inestabilidad cromosómica estructural tiene su origen principalmente en el estrés replicativo, los DSBs, los errores en la reparación del ADN dañado o las disfunciones teloméricas (Bailey et al, 2004; Bayani et al, 2007; Burrell et al, 2013; Russo et al, 2015; Siri et al, 2021). Cualquiera de los dos tipos de inestabilidad cromosómica puede conducir a la muerte celular y/o a un incremento en la misma inestabilidad cromosómica como parte de una retroalimentación positiva.

1.5.5 Técnicas para la medición de inestabilidad cromosómica

La etapa del ciclo celular más adecuada para identificar células con inestabilidad cromosómica es la mitosis, etapa en la cual la condensación cromosómica está en su punto máximo. Dentro de las técnicas más utilizadas en los laboratorios de investigación para identificar inestabilidad cromosómica podemos mencionar a la medición de aberraciones cromosómicas, medición de aberraciones anafásicas y a la medición de micronúcleos en fase G1. A continuación, detallaré cada una de estas técnicas.

Medición de aberraciones cromosómicas

Para visualizar de manera directa las aberraciones cromosómicas, los cromosomas en metafase se tiñen con colorantes inespecíficos de ADN como Giemsa. Por un lado, esta técnica permite medir aneuploidía por cuantificación

del número de cromosomas por célula individual. Por otro lado, esta técnica permite cuantificar cambios estructurales en los cromosomas como *gaps* (secciones de ADNsc), *breaks* (cortes de ADN doble cadena) y *exchanges* (entrecruzamiento entre dos cadenas de ADN de cromosomas distintos) (Oostra et al, 2012). En resumen, la tinción con Giemsa de los cromosomas metafásicos permite determinar si una célula posee inestabilidad cromosómica numérica y/o estructural.

Medición de aberraciones anafásicas

Las aberraciones anafásicas incluyen los puentes cromosómicos, los cromosomas rezagados y los cromosomas acéntricos (Bizard & Hickson, 2018; Gisselsson, 2008). Una de las técnicas que permite identificar estas aberraciones es la tinción de anafases con colorantes inespecíficos de ADN como DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

Los puentes cromosómicos son puentes de ADN entre cromátidas hermanas y se observan como un material nuclear que “une” ambos polos de una célula anafásica. Los puentes cromosómicos pueden deberse a errores en la separación de las cromátidas hermanas, o a una fusión cromosómica producto de la reparación incompleta o errónea del ADN.

Los cromosomas rezagados y los cromosomas acéntricos son cromosomas que no se alinearon correctamente en el ecuador de la célula anafásica y fragmentos de cromosomas sin centrómero, respectivamente. Los cromosomas rezagados pueden deberse a cromosomas que no se unieron adecuadamente al huso mitótico, y los cromosomas acéntricos resultan, en general, de DSBs no reparados que fraccionan al cromosoma en dos secciones, de manera que una de las secciones indefectiblemente no estará asociada al centrómero. Los cromosomas rezagados y los cromosomas acéntricos se observan como un material nuclear localizado en el ecuador de una célula anafásica, no se pueden diferenciarse mediante la tinción de anafases con DAPI y se los suele cuantificar en conjunto.

Medición de micronúcleos

Las aberraciones anafásicas pueden culminar en cuerpos extra-nucleares compuestos de cromosomas completos y/o fragmentos de

cromosomas llamados micronúcleos (**Fig. 1.14**). Los procesos por los que cada tipo de aberración anáfasis culminan en un micronúcleo son distintos: los puentes cromosómicos se parten formando fragmentos de ADN; los cromosomas rezagados no están unidos al huso mitótico al igual que los cromosomas acéntricos (por no contener el centrómero) lo que impide que las cromátidas se separen hacia ambos polos de la célula anafásica. En todos los casos, solo una de las células hijas heredará el cromosoma entero y/o el fragmento de cromosoma formando los micronúcleos. Los micronúcleos pueden ser detectados con marcadores de ADN inespecíficos como DAPI en células en G1 (Bizard & Hickson, 2018; Hoffelder et al, 2004; Siri et al, 2021; Utani et al, 2010).

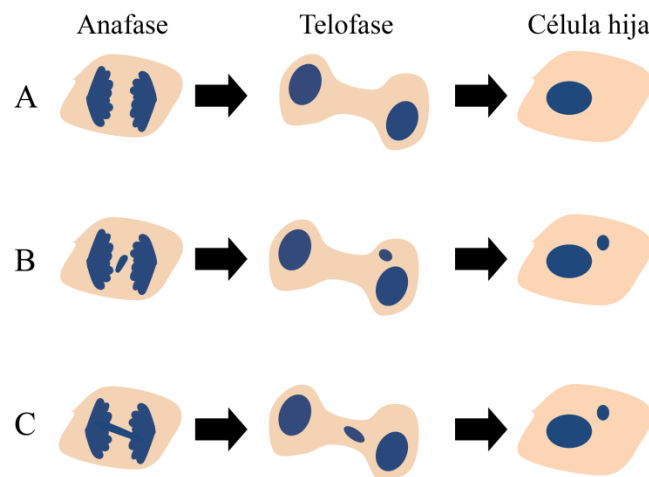


Fig. 1.14. Las anafases aberrantes producen micronúcleos. Una anafase normal no induce micronúcleos en las células hijas (A). En contraposición, los cromosomas rezagados o acéntricos (B) y los puentes cromosómicos (C) de células anafásicas producen micronúcleos en las células hijas. Los cromosomas rezagados y acéntricos son cromosomas o fragmentos de cromosomas que no están unidos al huso mitótico y se localizan en el ecuador de una célula anafásica. Los puentes cromosómicos pueden deberse a errores en la separación de las cromátidas, o a una fusión.

1.5.6 La inestabilidad cromosómica es la base de la microevolución tumoral

El cáncer es una enfermedad dinámica en donde la composición genómica de cada una de las células tumorales cambia por la inestabilidad cromosómica. La heterogeneidad clonal describe la observación de estos cambios genómicos en donde la células tumorales pueden expresar distintos

perfiles morfológicos y fenotípicos, que incluyen estructura celular, expresión génica, metabolismo, proliferación y potencial metastásico (Bakhoun & Cantley, 2018; Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Sansregret et al, 2018; Targa & Rancati, 2018).

Según el modelo de marco de selección y evolución clonal o microevolución (*Bakhoun & Cantley, 2018; Cahill et al, 1999; Meacham & Morrison, 2013; Nowell, 1976*), la heterogeneidad clonal describe cómo los tumores varían su composición genética a lo largo del tiempo y se adaptan a diferentes condiciones para sobrevivir. Este modelo de microevolución tumoral escrito originalmente por *Peter Nowell* en 1976 se basa en la hipótesis de que la iniciación tumoral se produce de manera no estocástica, comenzando por un cambio en una célula no tumoral que le confiere una ventaja de crecimiento selectivo y conduce a su proliferación descontrolada. Posteriormente, la inestabilidad cromosómica de la población tumoral en expansión crea una diversidad genética adicional que está sujeta a presiones de selección evolutiva, lo que resulta en la aparición secuencial de poblaciones cada vez más genéticamente anormales y heterogéneas. Este modelo de evolución tumoral diferencia la evolución lineal de la evolución ramificada. La evolución lineal describe la evolución como la adquisición sucesiva de mutaciones que confieren una ventaja de crecimiento y/o supervivencia, con clones secuenciales que albergan estas mutaciones ventajosas superando a los clones ancestrales. La evolución ramificada denota la aparición y propagación divergente de múltiples poblaciones de células tumorales subclonales que comparten un ancestro común. La evolución de las células tumorales puede ser lineal o ramificada. Sin embargo, se postula que la evolución ramificada es la que más probablemente contribuya a la heterogeneidad clonal.

1.6 Tratamientos quimioterapéuticos y tolerancia

1.6.1 Las quimioterapias aprovechan los altos niveles de estrés replicativo propios de las células tumorales

El progreso constante de nuestros conocimientos sobre la biología y la progresión tumoral conducirán gradualmente a mejores tratamientos para combatir el cáncer. En la actualidad existe una gran diversidad de tratamientos oncológicos: radioterapias, quimioterapias, cirugías, terapias hormonales o inmunoterapias, entre otros. Las quimioterapias (como las radioterapias) aprovechan los altos niveles de estrés replicativo de las células tumorales.

El estrés replicativo es incompatible con la sobrevivencia si supera un cierto umbral. Las quimioterapias buscan que las células tumorales superen ese umbral, de manera de desencadenar catástrofe replicativa y muerte celular (Dobbelstein & Sorensen, 2015; Forment & O'Connor, 2018; Pilie et al, 2019; Ubhi & Brown, 2019; Zhang et al, 2016). Como efecto adverso, las células normales que estén en división también aumentarán sus niveles de estrés replicativo. Sin embargo, estas células no superarán dicho umbral y en consecuencia no verán afectada su sobrevivencia porque, a diferencia de las células tumorales, parten de un nivel de estrés replicativo basal inferior (**Fig. 1.15**). Es decir, aumentar el estrés replicativo en todas las células del paciente podría inducir una muerte celular selectiva de células tumorales.

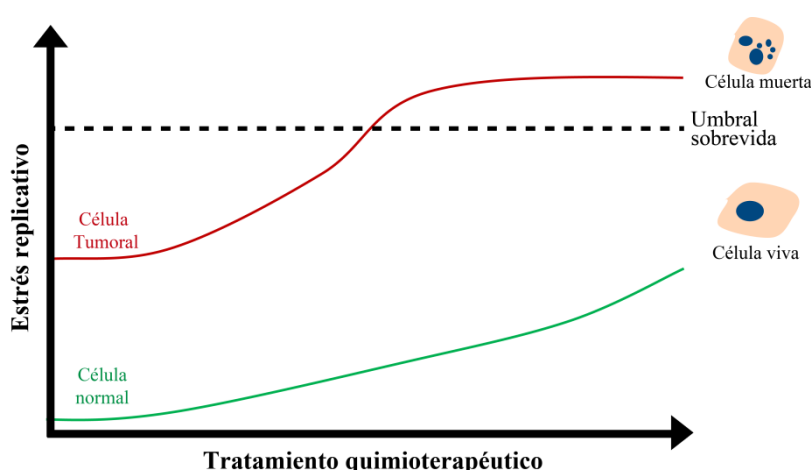


Fig. 1.15. El estrés replicativo de una célula tumoral llega a niveles mayores que los de una célula normal bajo tratamientos quimioterapéuticos. Gráfico que ilustra cómo el aumento del estrés replicativo provocado por un tratamiento quimioterapéutico desencadena la muerte de células tumorales y no de las normales. Las células tumorales parten de un nivel de estrés replicativo basal superior, de manera que superar el umbral de estrés replicativo incompatible con la vida (línea punteada) requiere menor estrés replicativo exógeno.

1.6.2 La evolución de las quimioterapias

Para sobrellevar el elevado nivel de estrés replicativo y evitar la muerte, las células tumorales se vuelven “adictas” a los mecanismos de reparación y tolerancia de la Respuesta al Daño del ADN o DDR. Las quimioterapias clásicas utilizan drogas con grandes efectos adversos que afectan a las células tumorales y normales por igual. Por otro lado, las quimioterapias de nueva generación, aprovechan la dependencia molecular hacia la DDR que tienen las células tumorales para diferenciarlas de las células normales. Esta mayor selectividad sobre las células tumorales permitió desarrollar tratamientos quimioterapéuticos con bajos efectos adversos en comparación con las terapias clásicas (Falzone et al, 2018; Sudhakar, 2009). A esta nueva generación de quimioterapias se la conoce como terapia dirigida.

Las quimioterapias clásicas (desarrolladas principalmente entre la segunda guerra mundial y la década del ´80) incluyen agentes alquilantes, antimitóticos y antimetabólicos (Kitao et al, 2018; Malhotra & Perry, 2003). Los agentes alquilantes catalizan una unión covalente entre dos guaninas consecutivas en una cadena de ADN, inhibiendo la replicación del ADN y la transcripción del ARN. Los agentes alquilantes más utilizados son la dacarbazina y los compuestos platinados (como el cisplatino). Los agentes antimitóticos afectan la estabilidad de los microtúbulos e impiden la formación normal del huso mitótico. Las drogas antimitóticas más utilizadas en quimioterapia son los taxanos que impiden la polimerización microtubular o los “alcaloides de la vinca” que impiden la despolimerización microtubular. Por último, las drogas antimetabólicas imitan la estructura de los metabolitos fisiológicos de las cadenas enzimáticas esenciales para la síntesis de purinas, lo que da como resultado la inhibición de la duplicación del ADN. Las drogas antimetabólicas más utilizadas son los análogos de folato (aminopterina), los análogos de purina (mercaptopurina) y los análogos de pirimidina (fluorouracilo o gemcitabina).

Las quimioterapias dirigidas inhiben proteínas específicas en la promoción de los tumores. De esta manera, estos nuevos inhibidores selectivos afectan exclusivamente a las células cancerosas, siendo mínimos los efectos secundarios sobre las células normales (Falzone et al, 2018; Lange et al,

2014). El blanco de estas drogas puede ser diferente incluso entre personas que tengan el mismo tipo de cáncer. Identificar la droga adecuada puede involucrar una biopsia o cirugía del tumor para analizar cuál molécula blanco sería ideal inhibir. Con esto se intenta encontrar el tratamiento más eficaz, específico y con menores efectos adversos en las células normales. Dentro de las terapias dirigidas se encuentran los tratamientos con drogas inhibitorias de proteínas de DDR. Los inhibidores de DDR bloquean las vías críticas de reparación del ADN de las que dependen estos cánceres para crecer y dividirse (Brandsma et al, 2017; Minchom et al, 2018). Las principales proteínas involucradas en la DDR sobre las que se está evaluando nuevas terapias son: ATR, ATM, CHK2, WEE1 y CHK1 (más información del inhibidor de CHK1 en sección 1.7.8).

1.6.3 Estrategias oncológicas para aumentar el estrés replicativo

En vistas de los tipos de quimioterapias descriptos previamente, podemos enumerar tres estrategias para aumentar el estrés replicativo de tal modo que las células tumorales superen el umbral de resistencia y mueran (Kitao et al, 2018; Pilie et al, 2019; Qiu et al, 2018). Una primera estrategia es utilizar quimioterapias clásicas (**Fig. 1.16**), una segunda estrategia es utilizar quimioterapias modernas (terapias dirigidas) en donde se inhibe a proteínas que participan en la DDR (**Fig. 1.16**), y una tercera estrategia es la combinación de las dos anteriores (**Fig. 1.16**). El uso de drogas quimioterapéuticas clásicas es cada vez menor debido a los efectos adversos que generan. Por su parte, las terapias dirigidas tienen menores efectos adversos, aunque también puedan ser menos eficaces que las quimioterapias clásicas. La estrategia que combina a las quimioterapias clásicas con las modernas es la que presenta una mayor eficacia. Además, esta combinación presenta menores efectos adversos que quimioterapias clásicas debido a la menor concentración en la que se utilizan estas drogas. Por esta razón, la estrategia que combina la quimioterapia clásica con la moderna es la más investigada en los ensayos clínicos actuales.

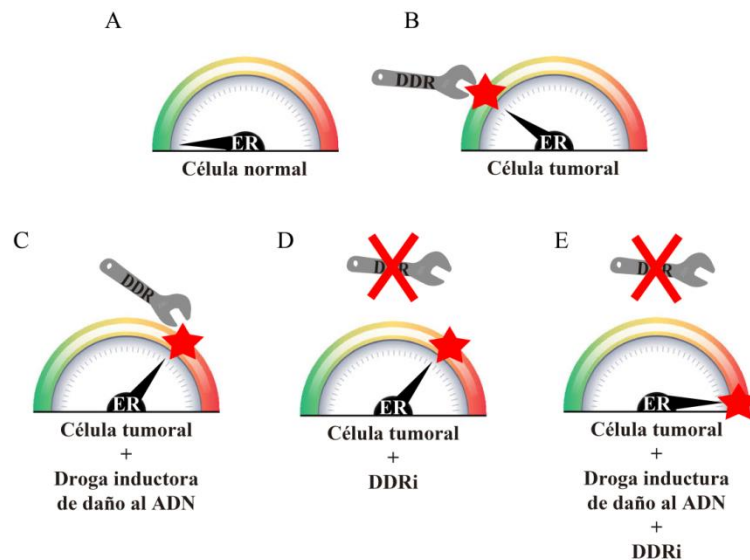


Fig. 1.16. Diferentes estrategias farmacológicas para aumentar el estrés replicativo. Modelo que ilustra los niveles de estrés replicativo en una célula normal (A), una tumoral (B), y tumorales tratadas con drogas inductoras de daño al ADN (C), drogas que inhiben a DDR (DDRI) (D), o su combinación (E).

1.6.4 Las células tumorales se pueden volver tolerantes al tratamiento

La inestabilidad cromosómica que resulta del alto estrés replicativo inducido por el tratamiento oncológico puede beneficiar o perjudicar la efectividad de ese mismo tratamiento. Por un lado, el aumento de la inestabilidad cromosómica puede ser un “talón de Aquiles” que las terapias utilicen para aumentar la muerte de células tumorales y exacerbar su eficacia. Sin embargo, por otro lado, este aumento de la inestabilidad cromosómica también puede dificultar la erradicación de un tumor. Como mencionamos previamente, una tasa demasiado elevada de mutaciones como consecuencia de la inestabilidad cromosómica tiende a transformar a células cancerosas en poblaciones genómicamente heterogéneas. Gracias a esta heterogeneidad, muchos tumores desarrollan tolerancia a las drogas quimioterapéuticas dado que, estocásticamente, una variante de la célula tumoral original se puede volver resistente al tratamiento (Andor et al, 2017; Pilie et al, 2019; Wilhelm et al, 2020). El desarrollo de esta tolerancia está inequívocamente vinculada a la recaída del paciente.

Esta dualidad que existe respecto de las drogas oncológicas nos permite presentarlas como “armas de doble filo”. Por un lado, inducen muerte tumoral a partir de los niveles insostenibles de estrés replicativo e inestabilidad cromosómica que inducen. Pero al mismo tiempo, esa inestabilidad puede ser

la “herramienta” necesaria que permita al tumor volverse tolerante al tratamiento (**Fig. 1.17**). Por eso se considera que las quimioterapias son potenciales impulsores de malignidad. Nosotros proponemos que optimizar estas terapias, a tal modo de inducir muerte en células tumorales, sin que las que sobrevivan desarrollen inestabilidad cromosómica, es esencial para abordar este problema clínico.

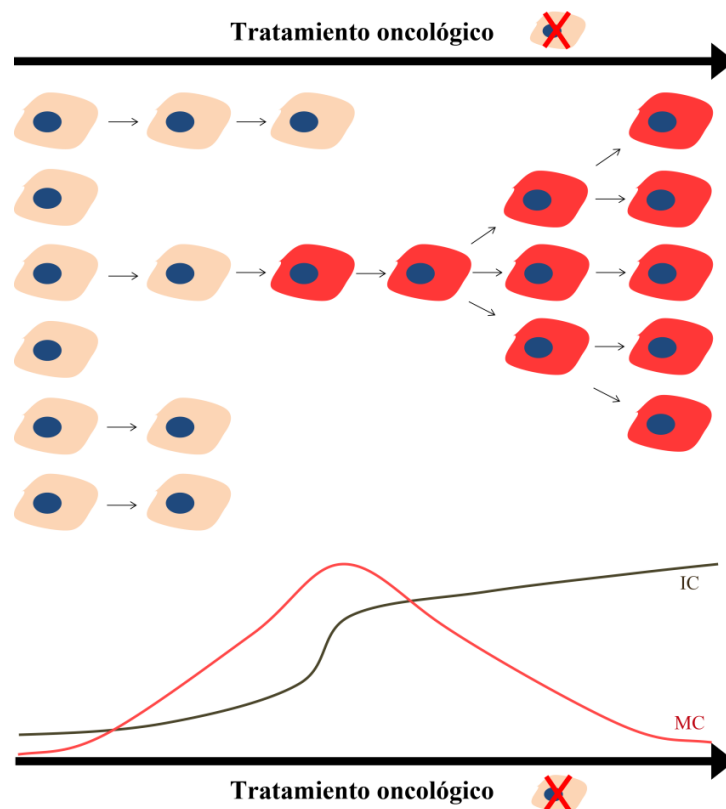


Fig. 1.17. Modelo de un tratamiento oncológico inductor de muerte celular e inestabilidad cromosómica. Este modelo plantea que la inestabilidad cromosómica, que induce heterogeneidad clonal, puede producir un clon resistente al tratamiento. Este clon puede comenzar a duplicarse descontroladamente, disminuyendo la eficacia del tratamiento y provocando la recaída del paciente. Las células color rosa claro representan a las células originales del tumor. Las células rojas representan a clones resistentes al tratamiento. En el gráfico de líneas: la línea negra (IC) representa al aumento de la inestabilidad cromosómica a lo largo del tratamiento, y la línea roja (MC) representa al aumento de la muerte celular tumoral a causa del tratamiento oncológico hasta la generación del clon resistente que puede continuar su duplicación incluso bajo el tratamiento original (la muerte de células tumorales disminuye).

1.7 CHK1: un esperanzador blanco terapéutico para tratamientos oncológicos

1.7.1 La activación de la vía ATR-CHK1

La quinasa de chequeo 1 o CHK1 (por sus siglas en inglés, *Checkpoint Kinase 1*) es una serina/treonina quinasa central en la DDR (Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015; Gottifredi et al, 2001). La pérdida homocigota de CHK1 es letal en la vida embrionaria temprana, lo que demuestra el papel crítico que desempeña en la homeostasis y supervivencia de células con una alta tasa de división (Liu et al, 2000; Takai et al, 2000). Esta quinasa de 476 aminoácidos está constituida por 4 dominios principales: un dominio quinasa, un dominio de interacción con ATR, un dominio de unión a cromatina y un dominio regulatorio altamente conservado en el C-terminal (Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015).

La vía molecular de activación de CHK1 inicia con una horquilla replicativa atascada (ver también sección 1.3.1). Como se describió previamente, el atascamiento de las horquillas en barreras replicativas generan largas extensiones de ADNsc. El ADNsc se cubre inmediatamente con las proteínas protectoras RPA. La proteína ATR se recluta a estos complejos ADNsc-RPA y se activa (Byun et al, 2005; Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015). ATR existe en un complejo heterodimérico estable con la “proteína de interacción de ATR” (ATRIP, por sus siglas en inglés *ATR-interacting protein*) (Cortez et al, 2001). Cuando ATR-ATRIP es reclutado por ADNsc-RPA, el complejo interactúa con la proteína TopBP1, la cual activa a ATR (Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015). Por otra parte, CHK1 interacciona con la proteína claspina (Chini et al, 2006; Kumagai & Dunphy, 2003), la cual aumenta su afinidad para con ATR (Lindsey-Boltz et al, 2009). Una vez activo, ATR-ATRIP fosforila a CHK1 en las Ser317 y Ser345, ubicadas en su dominio regulatorio C-terminal (Walker et al, 2009; Zhao & Piwnicka-Worms, 2001). Una vez fosforilado, CHK1 se libera al nucleoplasma y completa su activación auto-fosforilándose en la Ser296 (Kasahara et al, 2010). A continuación, CHK1 fosforila e inhibe a CDC25A, fosfatasa que activa a CDK2 eliminando su fosfato inhibitorio (Gu et al, 1992; Mailand et al, 2000) (**Fig. 1.18**). Por lo tanto, la activación del *checkpoint* intra-S inhibe a CDK2 y, como consecuencia,

ralentiza la progresión de la fase S creando una ventana temporal en donde se supere la barrera replicativa que dio origen a la horquilla atascada y activó el *checkpoint*.

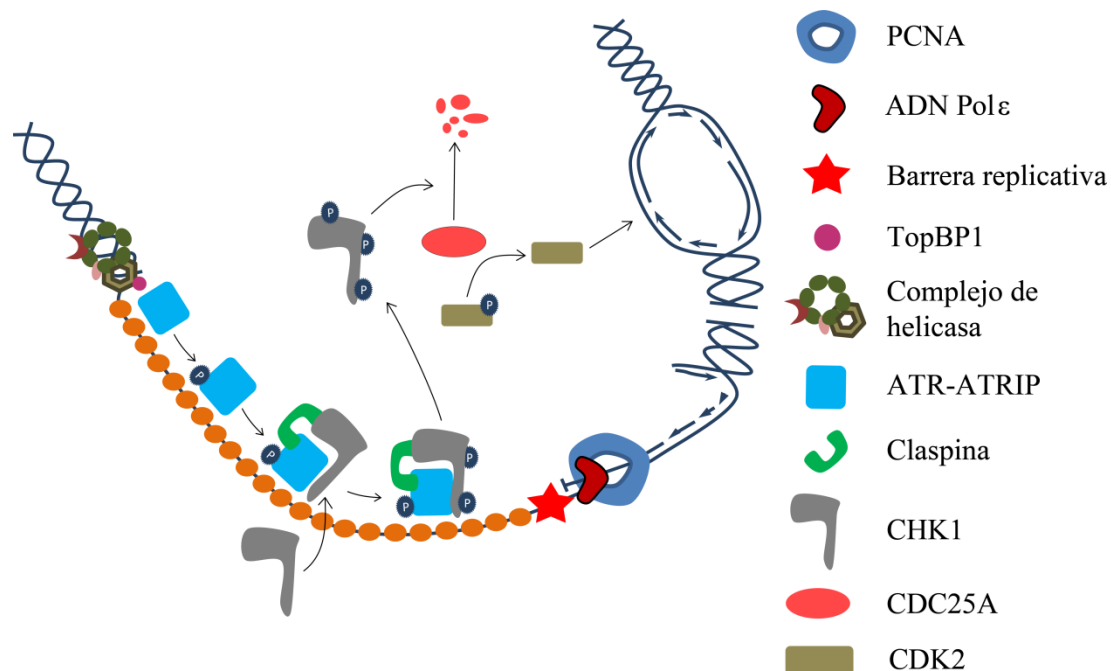


Fig. 1.18. Modelo de activación de CHK1. ATR-ATRIP es reclutado por ADNsc-RPA y activado por TopBP1. Una vez activo, ATR-ATRIP fosforila y activa a CHK1. CHK1 se desprende de la cromatina e inhibe a CDC25A, una fosfatasa que activa a CDK2 eliminando un fosfato inhibitorio. La activación del *checkpoint* intra-S mediada por CHK1 inhibe a CDK2, lo que resulta en una ralentización o freno de la progresión de la fase S.

1.7.2 La función de CHK1 no se circunscribe solamente a la regulación del *checkpoint* intra-S

Originalmente identificada en levaduras como una quinasa central en la activación del *checkpoint* (Walworth et al, 1993), en la actualidad CHK1 se reconoce como un actor central del *checkpoint* intra-S en distintas células eucariotas, incluidos los mamíferos. Los estudios iniciales de CHK1 en células humanas también se focalizaron en su actividad en la regulación del *checkpoint* celular y los consecuentes cambios en la coreografía replicativa (que desarrollaremos más detalladamente en la sección 1.7.3 y 1.7.4). Sin embargo, varios reportes demostraron que la actividad de CHK1 no se limita al rediseño

de la coreografía replicativa, sino que también participa activamente en otros procesos.

CHK1 promueve TLS

La TLS implica que una horquilla replicativa atascada atraviese la barrera replicativa reemplazando a la ADN-pol canónica (ADN-Pol ϵ) por una ADN-pol alternativa (ADN-pol con menor fidelidad). En primer lugar, la actividad de ATR y CHK1 promueve el reclutamiento a cromatina de la ADN-pol de TLS Pol η post-cisplatino (Yamada et al, 2013). En segundo lugar, CHK1 promueve el reclutamiento a cromatina de Pol η post-UV independientemente de su actividad quinasa (Speroni et al, 2012). En tercer lugar, CHK1 potencia la mono-ubiquitinación de PCNA causada por UV, lo que promueve el intercambio de la ADN-pol canónica por la ADN-pol alternativa Pol η (Yang et al, 2008). Esta evidencia que recopilamos de los tres artículos citados revela un vínculo claro entre CHK1 y los eventos de TLS mediados por Pol η .

CHK1 participa en la activación de SAC

El *checkpoint* de mitosis o SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) controla que los cromosomas estén correctamente unidos al huso mitótico, evitando errores en la segregación de las cromátidas hermanas. Este *checkpoint* previene la salida de mitosis incluso si un solo cromosoma no está adherido al huso o lo está incorrectamente, y su activación depende de Aurora B (Zachos et al, 2007), un miembro de la familia Aurora de serina/treonina quinasa que actúa como un regulador maestro de la mitosis. Durante la mitosis, Aurora B se concentra en los cinetocoros (sitios de unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso mitótico), desde donde reconoce los cinetocoros no unidos, o parcialmente unidos, al huso mitótico (Bonner et al, 2019; Krenn & Musacchio, 2015). En estos casos, Aurora B fosforila a BubR1 y la recluta a los cinetocoros. BubR1 forma parte del complejo proteico necesario para que el *checkpoint* de mitosis se active. De este modo, la actividad de Aurora B sostiene la detención mitótica cuando detecta cromosomas incorrectamente unidos al huso (Ditchfield et al, 2003; Gurden et al, 2018; Zachos et al, 2007).

CHK1 favorece la activación del *checkpoint* de mitosis mediante la fosforilación y activación de Aurora B (Zachos et al, 2007). En el artículo

Zachos, 2007, se observó que CHK1 se asocia a cinetocoros en prometafase y se fosforila en células tratadas con taxol (droga que impide la polimerización del huso mitótico). Además se observó que la depleción de CHK1 imposibilita la capacidad de mantener la detención mitótica inducida por esta droga. Esta incapacidad se asoció con una menor actividad de Aurora B y una fosforilación y localización disminuidas de BubR1 en cinetocoros. Además, *in vitro*, CHK1 fosforila directamente a Aurora B y mejora su actividad catalítica. Sobre la base de estos hallazgos, los autores de este artículo proponen que, bajo un tratamiento con taxol, CHK1 favorece la señalización del *checkpoint* en mitosis garantizando una regulación óptima de Aurora B por fosforilación directa.

1.7.3 CHK1 regula la coreografía replicativa en condiciones perturbadas

Los estudios iniciales de CHK1 se focalizaron en su actividad en el *checkpoint* intra-S y su consecuente regulación de la coreografía replicativa (distribución espacial y temporal de los orígenes replicativos activos y velocidad de síntesis en las horquillas replicativas). Dado que las horquillas replicativas pueden atascarse con o sin daño exógeno, la activación del *checkpoint* intra-S puede ocurrir en ambas condiciones. Por lo tanto, CHK1 regula la coreografía replicativa tanto en condiciones no perturbadas (sin daño al ADN) como en condiciones perturbadas (con daño al ADN, inducido por ejemplo por la droga antimetabólica cisplatino o la radiación UV). En esta sección nos focalizaremos en describir la regulación de la coreografía replicativa por CHK1 en condiciones perturbadas y en la sección 1.7.4, en condiciones no perturbadas.

La activación de CHK1 en respuesta a agentes exógenos de daño induce cambios en la coreografía replicativa dado que: 1) inhibe a CDK2 que reprime el cargado de CDC45 al pre-RC; y 2) redirige recursos replicativos a regiones cromosómicas que ya se encuentran duplicando el ADN (Feijoo et al, 2001; Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015). La represión del cargado de CDC45 al pre-RC frena el disparo de orígenes en las fábricas replicativas que todavía no se activaron, mientras que el re-direccionamiento de recursos estimula el disparo de orígenes dormidos dentro de las fábricas replicativas que ya se encuentran activas (regiones del genoma que contienen a las horquillas

atascadas que activaron CHK1) (Blow et al, 2011; Ge et al, 2007). La activación de estos orígenes dormidos tendrá la potencialidad de resolver a las horquillas atascadas cuando una de las horquillas del origen dormido activado se encuentre con una horquilla atascada (ver también sección 1.3.3). Entonces, el cambio en la coreografía replicativa mediada por la activación de CHK1 podrá resolver una horquilla atascada siempre y cuando hayan orígenes dormidos cercanos que activar.

1.7.4 CHK1 regula a la coreografía replicativa en condiciones no perturbadas

Como describimos en la sección anterior, en condiciones perturbadas, CHK1 modifica la coreografía replicativa. Sin embargo, en condiciones no perturbadas (sin daño exógeno al ADN), la coreografía replicativa también está regulada por CHK1 (Moiseeva et al, 2019; Panagopoulos & Altmeyer, 2021; Petermann & Caldecott, 2006). Aunque sea baja, la señalización de CHK1 en este contexto tiene un rol preponderante para que la totalidad del genoma esté duplicado al finalizar la fase S (Moiseeva et al, 2019; Petermann & Caldecott, 2006; Petermann et al, 2006). A continuación vamos a describir cómo CHK1 regula la coreografía replicativa en ausencia de daño al ADN.

Está muy establecido que la inhibición o silenciamiento de CHK1 altera la coreografía replicativa (Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015; Techer et al, 2017). En particular, CHK1 inhibe la activación de los orígenes dormidos en condiciones no perturbadas; por ello, tanto la inhibición como el silenciamiento de CHK1 aumentan el porcentaje de orígenes activos (Maya-Mendoza et al, 2007; Miao et al, 2003; Syljuasen et al, 2005). Además de aumentar el disparo de orígenes, la inhibición o silenciamiento de CHK1 disminuye la velocidad de progresión de horquillas replicativas (Petermann et al, 2010b). Una hipótesis que fue aceptada durante mucho tiempo es que el aumento en el porcentaje de orígenes activos conduciría a un enlentecimiento en la progresión de las horquillas replicativas debido al mayor consumo, y consecuente agotamiento, de factores esenciales de replicación (**Fig. 1.19-Modelo original**)(Petermann et al, 2010b). Sin embargo, en un artículo publicado recientemente por nuestro laboratorio, comprobamos que la disminución en la velocidad de horquillas

replicativas en células deficientes en CHK1 es independiente del mayor porcentaje de orígenes activos (Gonzalez Besteiro et al, 2019). Comprobamos que el silenciamiento de factores claves para el disparo de orígenes replicativos (CDT1 o CDC7) revierte el mayor disparo de orígenes en células deficientes en CHK1, mientras que las horquillas replicativas continúan enlentecidas. Como contraparte, también observamos que al agregar nucleósidos a células deficientes en CHK1 se recupera la velocidad de elongación normal de las horquillas replicativas, mientras que el disparo de orígenes continúa anormalmente elevado. Más aun, identificamos que la menor velocidad de replicación ocurre como consecuencia de que las horquillas replicativas se enfrentan con una serie de barreras replicativas causadas por un anormal exceso en la cromatina de la proteína accesoria de helicasa, CDC45. Por lo tanto, la inhibición o silenciamiento de CHK1 aumenta la frecuencia de disparo de orígenes y disminuye la velocidad de síntesis de horquillas replicativas por mecanismos independientes (**Fig. 1.19-Modelo nuevo**).

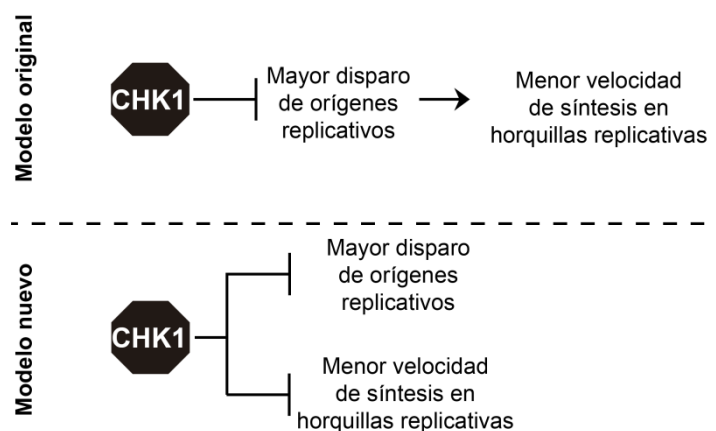


Fig. 1.19. Modelo original y modelo nuevo donde CHK1 regula la coreografía replicativa. La inhibición de CHK1 reduce la velocidad de síntesis de horquillas replicativas y aumenta la frecuencia de disparo de orígenes replicativos. En el modelo original, el aumento de orígenes replicativos consume factores esenciales de replicación y, consecuentemente, baja la velocidad de síntesis en horquillas replicativas. En el modelo nuevo, el aumento en la frecuencia de disparo de orígenes replicativos y la disminución en la velocidad de síntesis de horquillas replicativas ocurren por mecanismos independientes. En el nuevo modelo observamos que la disminución en la velocidad de síntesis ocurre como consecuencia de barreras replicativas causadas por un anormal exceso en la cromatina de CDC45.

1.7.5 CHK1 previene inducción de daño al ADN y muerte celular en condiciones no perturbadas

La alteración en la coreografía replicativa puede inducir daños en al ADN (Forment & O'Connor, 2018; Pilie et al, 2019; Zeman & Cimprich, 2014). Se encuentra muy reportado que el silenciamiento de CHK1 causa daño al ADN en fase S: acumulación de DSBs, ADNsc y marcadores de daño como el γ H2AX con distribución pan-nuclear (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Moiseeva et al, 2019; Murfuni et al, 2013; Sanjiv et al, 2016; Techer et al, 2016). Se postula que las horquillas enlentecidas por la depleción o inhibición de CHK1 se atascan y perduran en el tiempo sin poder activar el *checkpoint* intra-S. Estas horquillas atascadas son cortadas por la endonucleasa MUS81-EME2, generando DSBs asociados a la horquilla replicativa (ver también sección 1.3.3 y 1.4.3) (Techer et al, 2016). Tal como señalamos en las secciones 1.3.3 y 1.4.3, el corte de MUS81-EME2 puede iniciar un proceso de restauración de horquilla llamado *Fork Restart*. Sin embargo, no está claro si los DSBs medidos en células deficientes en CHK1 ocurren dado que el reinicio de la síntesis es superado por la cantidad de daño al ADN que se produce, o porque se supere un umbral que gatille una condición de catástrofe replicativa (ruptura masiva y repentina de todas las horquillas de ADN) (Murfuni et al, 2013; Techer et al, 2016). En resumen, las células inhibidas o deficientes en CHK1 con altos niveles de estrés replicativo acumulan una gran cantidad de ADN dañado en fase S y mueren por catástrofe replicativa (**Fig. 1.20-Modelo original**) (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Sakurikar et al, 2016).

Como mencionamos en el capítulo previo, el nuevo modelo que propusimos en Gonzalez, 2019 demostraba que el mayor disparo de orígenes y la disminución en la velocidad de horquillas replicativas en células deficientes en CHK1 son independientes. En este artículo también mostramos que los DSBs dependen del mayor disparo de orígenes replicativos, y no de la menor velocidad de síntesis de horquillas como se postula en el modelo original. Además, identificamos que estos DSBs provocan la muerte de las células deficientes en CHK1, pero no son la única causa. Otra causa de muerte celular en células deficientes en CHK1 son las barreras replicativas causadas por el exceso de CDC45 en el ADN. CDC45 tiene un rol multicausal en los fenotipos

asociados a células deficientes en CHK1. Por un lado, causa las barreras replicativas que enlentecen a las horquillas, y por otro lado, aumenta el porcentaje de orígenes replicativos activos. Dado que CDC45 participa en los dos mecanismos independientes que ultiman en muerte celular en células deficientes en CHK1, su silenciamiento revierte completamente la muerte (**Fig. 1.20-Modelo nuevo**).

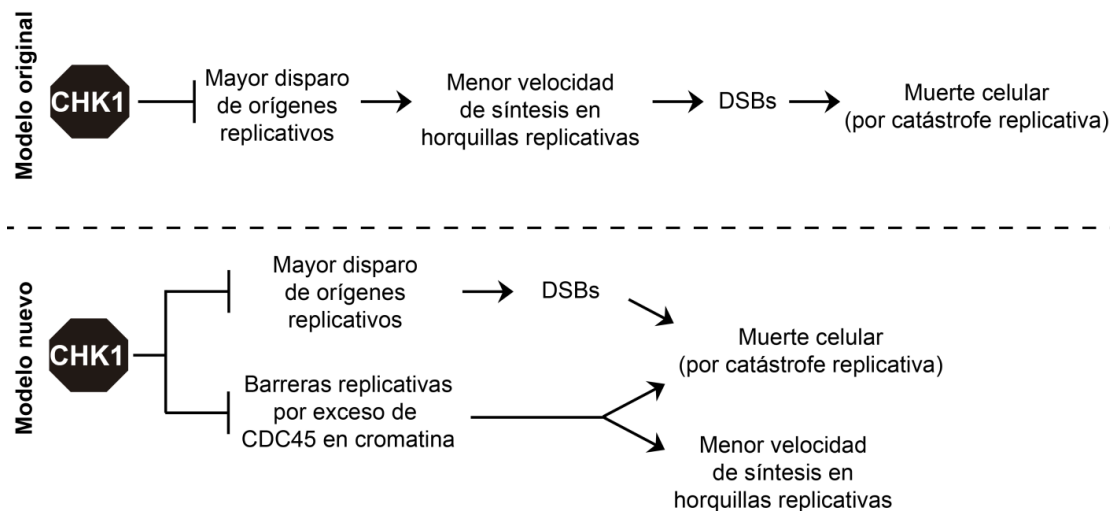


Fig. 1.20. Modelo original y modelo nuevo donde CHK1 regula la inducción de DSBs y la muerte celular. La inhibición de CHK1 induce DSBs y muerte celular. En el modelo original, las horquillas enlentecidas se atascan y perduran en el tiempo resultando en DSBs cuya acumulación causa muerte celular por catástrofe replicativa. En el nuevo modelo, la muerte celular es causada por dos condiciones: los DSBs dependientes del mayor disparo de orígenes replicativos, y la acumulación de barreras replicativas causadas por el exceso de CDC45 en cromatina. El silenciamiento de CDC45 revierte las barreras y el mayor disparo de orígenes, por ello se rescata completamente la muerte celular.

1.7.6 CHK1 previene inducción de ADN sin duplicar al final de la fase S e inestabilidad cromosómica en condiciones no perturbadas

Dado el disparo de orígenes anormalmente elevado, no es de esperar que las células deficientes en CHK1 acumulen secuencias de ADN sin duplicar al finalizar la fase S (UR-DNA) (Moreno et al, 2016). No obstante, se ha demostrado que el silenciamiento de ATR, el regulador maestro de CHK1, induce acumulación de UR-DNA en células que entran en mitosis (Eykelboom et al, 2013). El silenciamiento de ATR también induce MiDAS (Achuthankutty et al, 2019; Bergoglio et al, 2013; Eykelboom et al, 2013; Lai et al, 2017), es decir, utilización del UR-DNA como templado replicativo en mitosis. También se encontró que la inhibición de otras proteínas de DDR

induce UR-DNA y MiDAS (Fernandez-Vidal et al, 2017; Lezaja & Altmeyer, 2021). Por lo tanto es probable (y de hecho lo demostramos en esta tesis) que la inhibición o silenciamiento de CHK1 también provoque UR-DNA y MiDAS.

El UR-DNA tienen el potencial de inducir inestabilidad cromosómica (Bizard & Hickson, 2018; Burrell et al, 2013; Harrigan et al, 2011; Lukas et al, 2011), por lo tanto, otro parámetro que puede estar regulando CHK1 en ausencia de daño al ADN es la estabilidad cromosómica. La literatura sobre el estudio de la contribución de CHK1 a la estabilidad cromosómica es escasa y aislada, y solo existen algunos manuscritos que reportan inducción de inestabilidad cromosómica (en particular acumulación de puentes cromosómicos) luego de la inhibición de CHK1 (Gemble et al, 2016; Petsalaki et al, 2014; Tang et al, 2006). Además, contrariamente a la disponibilidad de artículos que demuestran que el estrés replicativo y el daño al ADN preceden a la muerte celular en células deficientes en CHK1, no hay información sobre el origen de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

1.7.7 Relación entre la estabilidad cromosómica y sobrevida regulada por CHK1

Hasta aquí describimos que la inhibición o silenciamiento de CHK1 induce estrés replicativo, cortes en el ADN (DSBs) y muerte celular, y que estos fenotipos están relacionados entre sí según nuestro nuevo modelo publicado en *Gonzalez, 2019 (Fig. 1.20-Modelo nuevo)*. Sin embargo, no hay, o hay escasa información, sobre el origen del UR-DNA y la inestabilidad cromosómica en células inhibidas o deficientes en CHK1. ¿Cuál podría ser la relación entre estos fenotipos y los parámetros de coreografía replicativa afectados por la deficiencia en CHK1? Estudiando estas relaciones podríamos identificar el origen de la inestabilidad cromosómica.

Como se describió previamente, el origen de la inestabilidad cromosómica es multi-causal (ver también sección 1.5.4). Un posible origen de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 podrían ser los DSBs causados por el estrés replicativo: estos DSBs ocurren en la fase S y si no son reparados a lo largo del ciclo pueden inducir errores en la segregación

de las cromátidas hermanas durante la anafase de la mitosis. En nuestro laboratorio y en otros grupos de investigación demostramos que las células deficientes en CHK1 con muchos DSBs mueren en fase S por catástrofe replicativa (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Murfuni et al, 2013; Sanjiv et al, 2016; Techer et al, 2016). Si las células con muchos DSBs mueren, estos DSBs no podrían ser los causantes de la inestabilidad cromosómica. Esto no significa sin embargo que los DSBs en fase S no sean la causa de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1; otros posibles escenarios son: 1) que la inestabilidad cromosómica ocurra como consecuencia de un nivel moderado de DSBs (**Fig. 1.21**); o 2) que no todas las células con una gran cantidad de DSBs mueran (**Fig. 1.21**).

La acumulación de DSBs es uno de los posibles orígenes de la inestabilidad cromosómica, pero no es el único. A continuación, planteamos otros tres posibles causantes de inestabilidad en células deficientes en CHK1.

- 1) Las barreras replicativas causadas por el exceso de CDC45 en cromatina. En *Gonzalez, 2019* identificamos que estas barreras replicativas pueden ser atravesadas por TLS, más específicamente por la ADN-pol alternativa Pol η . Sin embargo, encontramos que esta TLS no ocurre en células deficientes en CHK1 dado que Pol η se encuentra inhibida por la alta actividad de CDKs. Es posible que esta TLS, incapaz de atravesar la barrera replicativa dependiente de CDC45, resulte en un proceso aberrante que forme estructuras de ADN que induzcan inestabilidad.
- 2) La activación del SAC dependiente de CHK1. Errores en la activación del *checkpoint* de mitosis a causa de la deficiencia en CHK1 (ver también sección 1.7.2) podría resultar en una segregación incorrecta de cromosomas que no se encuentren correctamente unidos al huso mitótico.
- 3) La participación de CHK1 en un mecanismo independiente de los anteriores. CHK1 podría controlar un proceso novedoso que no guarde relación con el daño al ADN producto del estrés replicativo, ni con las barreras causadas por un exceso de CDC45 en cromatina, ni con la activación del SAC (**Fig. 1.21**).

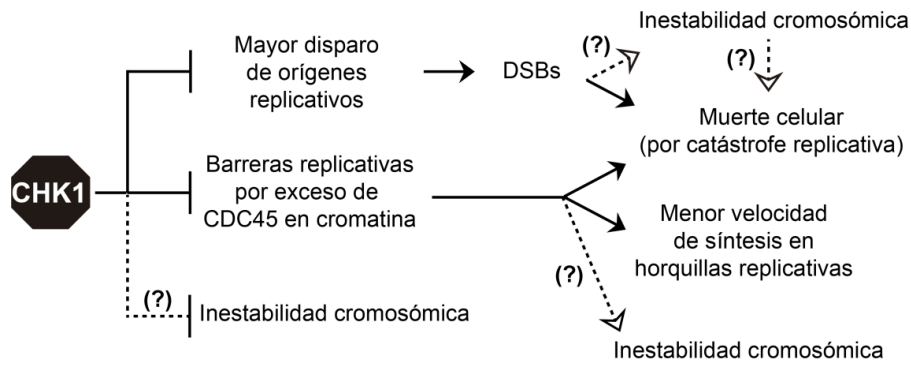


Fig. 1.21. Los DSBs en células deficientes en CHK1 podrían inducir inestabilidad cromosómica. Se desconoce cuál es el origen de la inestabilidad cromosómica (línea punteada) en células deficientes en CHK1. La inestabilidad cromosómica puede ser una antesala a la muerte celular o un proceso completamente independiente. Niveles moderados de DSBs producto del mayor disparo de orígenes replicativos podrían generar inestabilidad cromosómica. Las barreras replicativas por exceso de CDC45 en cromatina son otro posible origen de inestabilidad cromosómica. Dado que la inestabilidad cromosómica es multi-causal también puede desarrollarse por mecanismos independientes de todos los anteriores.

1.7.8 CHK1 y cáncer

Como mencionamos previamente, CHK1 regula a la coreografía replicativa y, por tanto, evita que los niveles de estrés replicativo en células tumorales alcancen valores incompatibles con la supervivencia. Esta presión de selección explica el hecho de que las células tumorales sean “adictas” a CHK1 y que no se detecten pérdidas o mutaciones de esta quinasa en tumores (Bartek & Lukas, 2003; Qiu et al, 2018). Más aun, está demostrado que el aumento de los niveles de CHK1 en células tumorales correlaciona con la supervivencia tumoral a tratamientos oncológicos, resistencia a la terapia y recaída de pacientes en esta enfermedad (Qiu et al, 2018; Zhang & Hunter, 2014).

Dada esta dependencia en CHK1 se desarrollaron numerosos inhibidores de esta quinasa como potenciales drogas anti-cáncer (Qiu et al, 2018). Los inhibidores de CHK1 se reagrupan dentro de las llamadas terapias dirigidas, y en los ensayos clínicos (que actualmente se encuentran en fase I o II) se los utiliza como monodrogas o en conjunto con drogas quimioterapéuticas clásicas (ver también sección 1.6.2 y 1.6.3) (Dent, 2019; Forment & O'Connor, 2018; Pilie et al, 2019; Qiu et al, 2018).

Muchos de los inhibidores de CHK1 (CHK1i) desarrollados inicialmente cerca de los años 2000 (UCN-01, XL844, CBP501, AZD7762, entre otros) se

desestimaron en ensayos clínicos de fase I o fase II (NCT00413686; NCT00234481) por su baja especificidad y actividad cardiotóxica (Qiu et al, 2018). Posteriormente, se han desarrollado inhibidores de CHK1 más específicos y con menores efectos secundarios en pacientes (Dent, 2019; Qiu et al, 2018). Uno de ellos, y el más prometedor, es LY2606368 (Prexasertib[®]) (Dent, 2019; Qiu et al, 2018). Prexasertib es un inhibidor dual de CHK1/CHK2 que inhibe preferentemente a CHK1 (10 veces más) y cuya concentración inhibitoria media máxima (IC50) es menor a 1 nM (King et al, 2015). Este inhibidor se encuentra en ensayos clínicos de fase II (NCT02873975; NCT04032080; NCT03414047; NCT0220351; NCT02778126). Estos ensayos clínicos han demostrado la eficacia de Prexasertib para inhibir el crecimiento tumoral tanto en esquemas de monodroga como de combinación con drogas antimetabólicas como la gemcitabina (ver también sección 1.6.2). Otro de los inhibidores de CHK1 que está en fases clínicas avanzadas es SRA737 (NCT02797964, NCT02797977) (Ditano & Eastman, 2021; Sen et al, 2019). SRA737 es un inhibidor de CHK1 potente (IC50 de 1.4 nM), altamente selectivo (100 veces más selectivo que hacia CHK2) y biodisponible por vía oral. Los ensayos clínicos de este inhibidor de CHK1 se realizaron en conjunto con la droga quimioterapéutica clásica gemcitabina.

1.8 Objetivos

La inhibición o el silenciamiento de CHK1 induce estrés replicativo que a su vez causa cortes en el ADN (DSBs) (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Petermann & Caldecott, 2006; Petermann et al, 2010b). La alta proporción de daño al ADN en células deficientes en CHK1 desencadena catástrofe replicativa, seguida indefectiblemente de muerte celular en fase S. La inhibición o el silenciamiento de CHK1 también induce inestabilidad cromosómica (Gemble et al, 2016; Petsalaki et al, 2014; Tang et al, 2006). Sin embargo, en ninguno de los escasos artículos que la analizan se investiga cuál es el origen de dicha inestabilidad. Dado que la inestabilidad cromosómica puede derivar de los cortes en el ADN en fase S causados por el estrés replicativo (Burrell et al, 2013), en esta tesis vamos a determinar si existe una relación causal entre estos cortes y la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

Existen dos inhibidores de CHK1 que se encuentran en fases clínicas muy avanzadas (LY2606368 y SRA737) (Ditano & Eastman, 2021; Qiu et al, 2018). Por lo tanto, cualquier información molecular nueva es importante para establecer potenciales mejoras en el tratamiento o evaluar sus riesgos. La inestabilidad cromosómica tiende a transformar a células cancerosas en poblaciones genómicamente heterogéneas que potencialmente se vuelvan tolerantes al tratamiento. Esta es una situación muy desventajosa para el paciente, dado que puede recaer en la enfermedad. Si lográramos definir cuál es el origen de la inestabilidad cromosómica en células inhibidas o silenciadas en CHK1 podríamos proponer terapias alternativas e innovadoras.

Los objetivos de este trabajo son:

- ✓ Caracterizar la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.
- ✓ Identificar las bases moleculares de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.
- ✓ Determinar si existe una relación causal entre daño al ADN en fase S e inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.
- ✓ Determinar si existe una relación causal entre muerte celular e inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

2. Resultados



2.1 Estrategia experimental para silenciar o inhibir a CHK1

A lo largo de esta tesis utilizamos a las células U2OS (línea derivada de osteosarcoma) como nuestro modelo principal debido a que son ampliamente usadas en el campo del ciclo celular, de la DDR y de la replicación del ADN. Además estas células presentan núcleos grandes y bien definidos, lo que facilita el análisis por microscopía de proteínas nucleares. También utilizamos a las células HCT116 (línea derivada de adenocarcinoma colorrectal) y PANC-1 (línea derivada de adenocarcinoma de páncreas) dado que, al igual que U2OS, son muy usadas en el campo de la DDR.

Para silenciar/inactivar a CHK1 utilizamos tres métodos distintos: siRNA (siCHK1), shRNA (shCHK1) y un inhibidor de CHK1 (CHKi). Los siRNAs (del inglés *Small Interfering RNA*) son moléculas de ARN doble cadena lineales de 21-23 nucleótidos de largo (Rao et al, 2009). Los siRNAs se introdujeron en las células blanco por transfección utilizando el reactivo JetPrime. Los siRNAs son procesados en el citoplasma formando un siRNA simple cadena que se une por complementariedad de bases al ARN mensajero blanco, guiando su degradación. Los shRNAs (del inglés *Short Hairpin RNA*) son moléculas de ARN en forma de *hairpin* de 42-44 nucleótidos de largo (Rao et al, 2009). Los shRNAs son procesados en el citoplasma para formar siRNA, mediando el silenciamiento génico como se explicó más arriba. A diferencia de los siRNAs, los shRNAs están codificados dentro de un plásmido para ser introducido dentro de las células blanco por transducción lentiviral. El inhibidor de CHK1 (CHK1i) que utilizamos en esta tesis es el Gö6976 (Kohn et al, 2003). Gö6976 es un inhibidor competitivo por ATP. En nuestro laboratorio tenemos mucha experiencia con este inhibidor y sabemos que altera la coreografía replicativa en la misma medida que el siCHK1.

2.2 El silenciamiento de CHK1 desencadena inestabilidad cromosómica

En primer lugar, buscamos identificar si el silenciamiento y/o la inhibición de CHK1 inducen inestabilidad cromosómica. Para ello monitoreamos la proporción de anafases aberrantes (puentes cromosómicos, cromosomas rezagados y/o acéntricos) y el porcentaje de micronúcleos en células en fase G1. Las anafases aberrantes se cuantificaron clasificándolas en puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (ver también sección 1.5.5). Los micronúcleos se midieron específicamente en células binucleares inducidas por citocalasina B (un inhibidor de la citocinesis). El tratamiento con citocalasina B nos permitió distinguir fácilmente a células que no duplicaron su ADN (mononucleadas) de aquellas que transitaron y completaron la fase S bajo nuestro tratamiento de interés (ver también secciones 1.5.5 y 4.9).

Nuestros resultados confirmaron que tanto el silenciamiento por siRNA como la inhibición de CHK1 inducen inestabilidad cromosómica en células U2OS (**Fig. 2.1A-C**). Por otro lado, corroboramos que la depleción de CHK1 por shRNAs también causa un aumento de la inestabilidad cromosómica en las líneas celulares HCT116 y PANC-1 (**Fig. 2.1D y E**). Es decir, demostramos que la depleción o inhibición en CHK1 induce inestabilidad cromosómica.

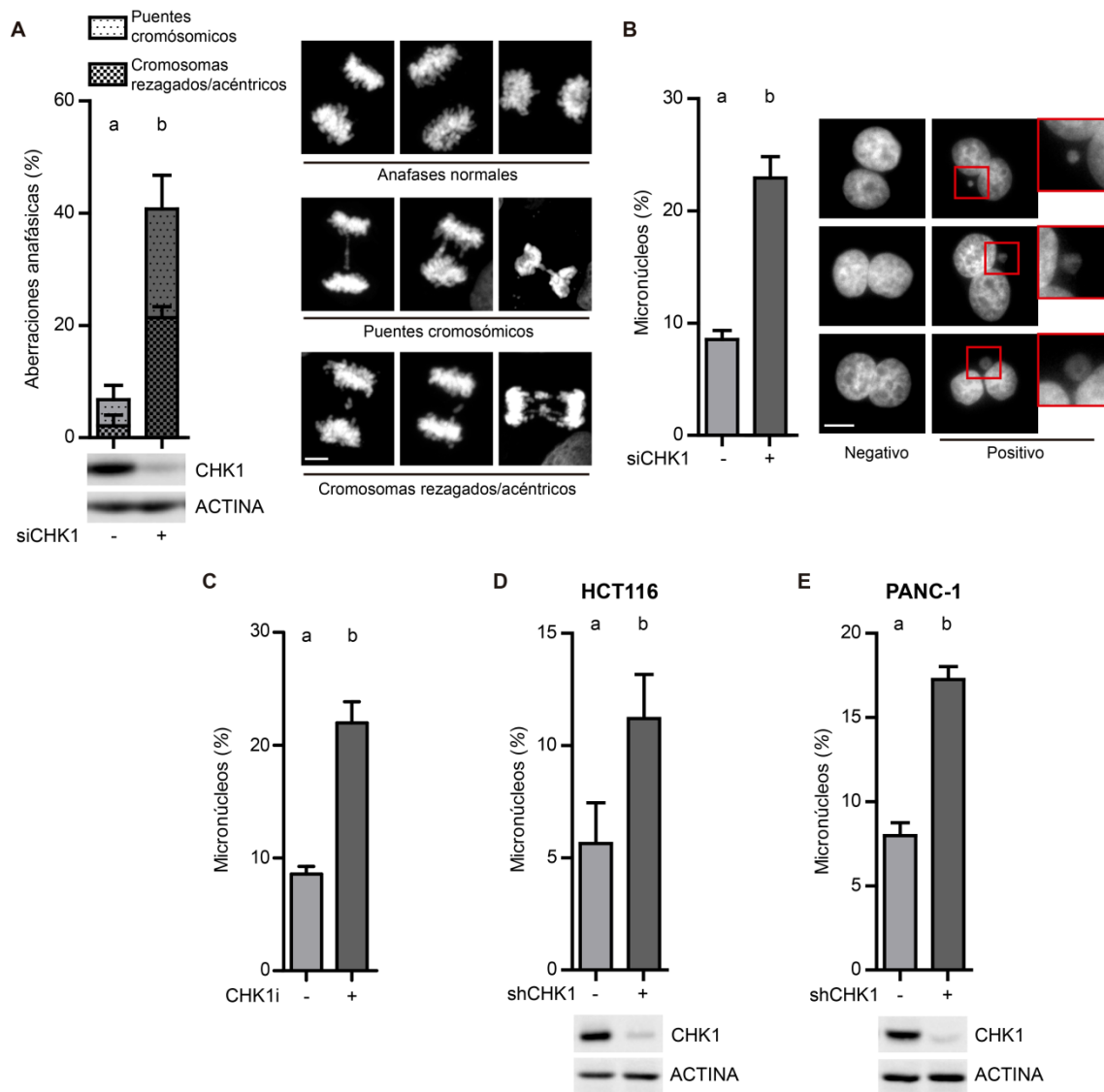


Fig. 2.1. El silenciamiento de CHK1 induce inestabilidad cromosómica. **A)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). Los paneles inferiores muestran un Western-Blot de CHK1 48 hs después de la transfección. Actina se utilizó como control de carga. En las imágenes representativas se muestran anafases normales, anafases con puentes cromosómicos y anafases con cromosomas rezagados o acéntricos. Las imágenes se crearon a partir de un Z-stack con microscopía confocal. Barra de escala: 5 μ m. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos. Las células son binucleadas dado que, habiendo terminado la fase S, fueron retenidas en la etapa previa a la citocinesis. Las imágenes representativas muestran células binucleadas sin micronúcleos (negativo) y con micronúcleos (positivo). Barra de escala: 10 μ m. **C)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos. Se añadió el inhibidor de CHK1, Gö6976 (CHK1i, 1 μ M), 36 hs antes de la fijación. **D)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células HCT116 binucleadas con micronúcleos. Los paneles inferiores muestran un Western-Blot de CHK1 48 hs después de la infección. Actina se utilizó como control de carga. **E)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células PANC-1 binucleadas con micronúcleos. Los paneles inferiores muestran un Western-Blot de CHK1 48 hs después de la infección. Actina se utilizó como control de carga.

2.3 El silenciamiento de CHK1 desencadena catástrofe replicativa

En esta sección evaluamos si la depleción de CHK1 induce cambios en la coreografía replicativa (en la frecuencia de iniciación y/o en la velocidad de la replicación de horquillas) y, como consecuencia, daño al ADN. El ensayo de extensión de fibras de ADN permite visualizar horquillas de replicación individuales y por lo tanto determinar su velocidad y en qué etapa se encuentra cada una de ellas (inicio, progreso o fin de la síntesis). Tal como está descrito en la sección 4.6, para calcular la velocidad se mide (en μm) el trecho de ADN sintetizado por cada horquilla individual en un tiempo determinado, y para calcular el porcentaje de inicio de síntesis (disparo de orígenes replicativos) cuantificamos el porcentaje de fibras tricolores roja-verde-roja y fibras monocolors rojas. Nuestros resultados (Gonzalez Besteiro et al, 2019) confirmaron, en coincidencia con informes bibliográficos (Maya-Mendoza et al, 2007; Petermann et al, 2006; Syljuasen et al, 2005), que el silenciamiento por siRNA de CHK1 reduce la velocidad de síntesis de ADN y aumenta la proporción de orígenes replicativos activos en células U2OS (**Fig. 2.2**). Así pues, confirmamos que las células deficientes en CHK1 tienen una coreografía replicativa alterada.

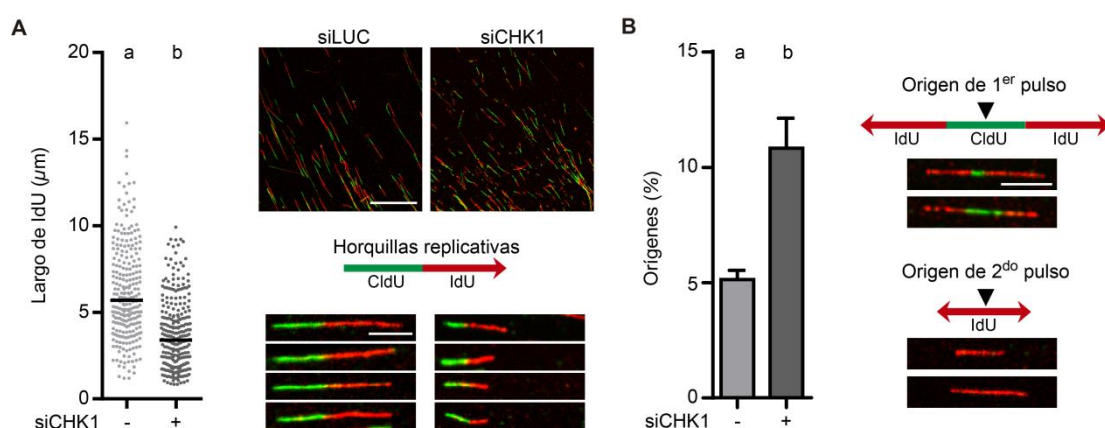


Fig. 2.2. El silenciamiento de CHK1 altera la coreografía replicativa. **A)** Largo de IdU de fibras individuales de células U2OS. La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana. Las imágenes representativas muestran campos de fibras (arriba) y fibras individuales (abajo); barras de escala: 25 y 5 μm , respectivamente. **B)** Porcentaje de disparo de orígenes (media $\pm$ DE) calculado a partir de las mismas imágenes utilizadas para cuantificar el largo de IdU en A. Las imágenes representativas muestran orígenes (flechas negras) que se activaron durante el primer pulso (CldU) o el segundo pulso (IdU). Barra de escala: 5 μm .

La coreografía replicativa alterada de células deficientes en CHK1 depende del exceso de CDC45, un cofactor de la helicasa que genera barreras replicativas e induce el disparo de orígenes (**Fig. 2.3**, *González Besteiro, 2019*). Dado que los defectos en la coreografía replicativa en células deficientes en CHK1 generan daño masivo al ADN, esperamos que el silenciamiento de CDC45 evite la acumulación masiva de ADN dañado y la consecuente catástrofe replicativa. En esta tesis utilizamos Western-Blot e inmunofluorescencia para cuantificar marcadores de daño al ADN y catástrofe replicativa. Por Western-Blot monitoreamos los marcadores de daño al ADN γ H2AX, fosfo-RPA32 ser4/8 y fosfo-KAP1 ser824; mientras que por inmunofluorescencia identificamos núcleos de células con distribución pan-nuclear de γ H2AX. También evaluamos el daño al ADN de forma directa, mediante la técnica de COMETA neutro que detecta DSBs (ver también sección 4.7). Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de CHK1 induce tinción pan-nuclear de γ H2AX (un indicador de catástrofe replicativa), fosforilación de RPA32 (ser4/8) y KAP1 (ser824) (marcadores de daño que correlacionan con la tinción pan-nuclear de γ H2AX (Forment & O'Connor, 2018; Pilie et al, 2019; Zeman & Cimprich, 2014)), y una alta proporción de DSBs por célula (fenotipo asociado a catástrofe replicativa) de manera dependiente de CDC45 (**Fig. 2.4**). En conclusión, el silenciamiento de CDC45 normaliza la coreografía replicativa alterada en células deficientes en CHK1 y evita, en consecuencia, la catástrofe replicativa.

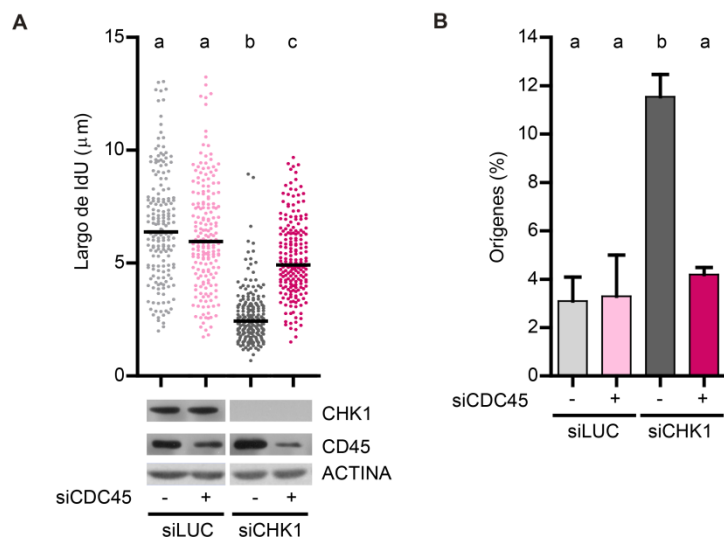


Fig. 2.3. La coreografía replicativa alterada depende de CDC45 en células deficientes en CHK1. **A)** Largo de IdU de fibras individuales de células U2OS. La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana. Los paneles inferiores muestran un Western-Blot de CHK1 y CDC45 48 hs después de la infección. Actina se utilizó como control de carga. **B)** Porcentaje de disparo de orígenes (media $\pm$ DE) calculado a partir de las mismas imágenes utilizadas para cuantificar el largo de IdU en A.

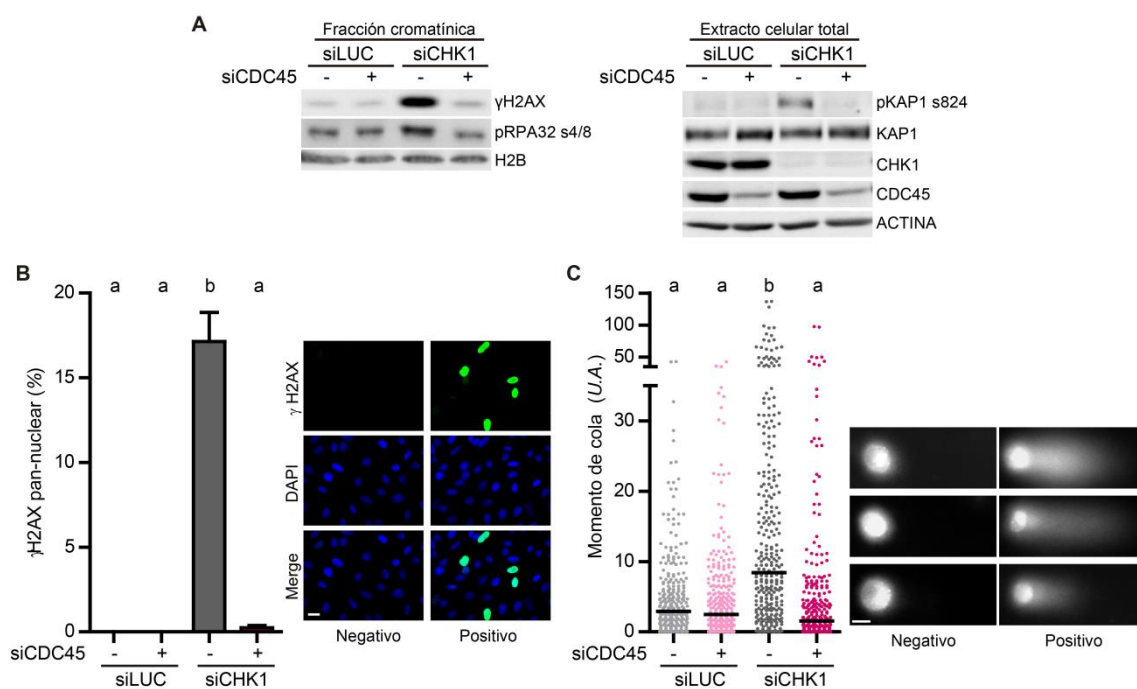


Fig. 2.4. La catástrofe replicativa es dependiente de CDC45 en células deficientes en CHK1. **A)** Western-blot de γH2AX , fosfo-RPA32 ser4/8, fosfo-KAP1 ser824 y KAP1 (como control interno de fosfo-KAP1 ser824) en células U2OS. El panel izquierdo muestra la fracción cromatínica obtenida luego de una extracción con buffer CSK; el panel derecho muestra el extracto celular total. CDC45 y CHK1 se revelaron como control de silenciamiento. Actina y H2B se usaron como controles de carga. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS con tinción pan-nuclear de γH2AX . Las imágenes representativas muestran campos de células negativas y positivas para γH2AX pan-nuclear. Barra de escala: 20 μm . **C)** Cuantificación por cometa neutro de DSBs por "momento de cola" en células U2OS (U.A.: unidades arbitrarias). A mayor largo e intensidad de cola, mayor momento de cola, lo que representa una mayor fragmentación de ADN (ver también sección 4.7). La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana. Las imágenes representativas muestran cometas negativos (sin DSBs) y positivos (con DSBs). Barra de escala: 10 μm .

2.4 La catástrofe replicativa y la inestabilidad cromosómica ocurren por vías independientes

En esta sección analizaremos si la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 tiene su origen en el daño masivo al ADN que cuantificamos previamente. Para ello, silenciamos a CDC45 (revierte el daño al ADN) en células deficientes en CHK1 y medimos el porcentaje de células con aberraciones anafásicas y micronúcleos. Interesantemente, y en completa oposición a su capacidad de revertir la acumulación de ADN dañado, el silenciamiento de CDC45 no revirtió la inestabilidad cromosómica causada por la depleción de CHK1 en células U2OS (**Fig. 2.5**). Esta independencia entre catástrofe replicativa e inestabilidad cromosómica también se observó en células HCT116 y PANC-1 al silenciar CHK1 (**Fig. 2.6A-B**). En estas líneas celulares utilizamos al siCDC45 como herramienta dado que también comprobamos que su silenciamiento revierte la menor velocidad de duplicación en células deficientes en CHK1 (**Fig. 2.6C-D**). Concluimos entonces que el daño al ADN producto de la coreografía replicativa alterada asociada al exceso de CDC45 no es el origen de la inestabilidad cromosómica (**Fig. 2.7**).

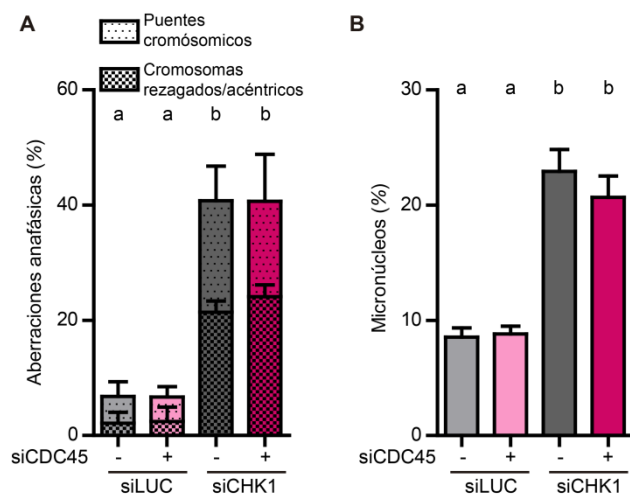


Fig. 2.5. La inestabilidad cromosómica es independiente de CDC45 en células deficientes en CHK1.
A) Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos.

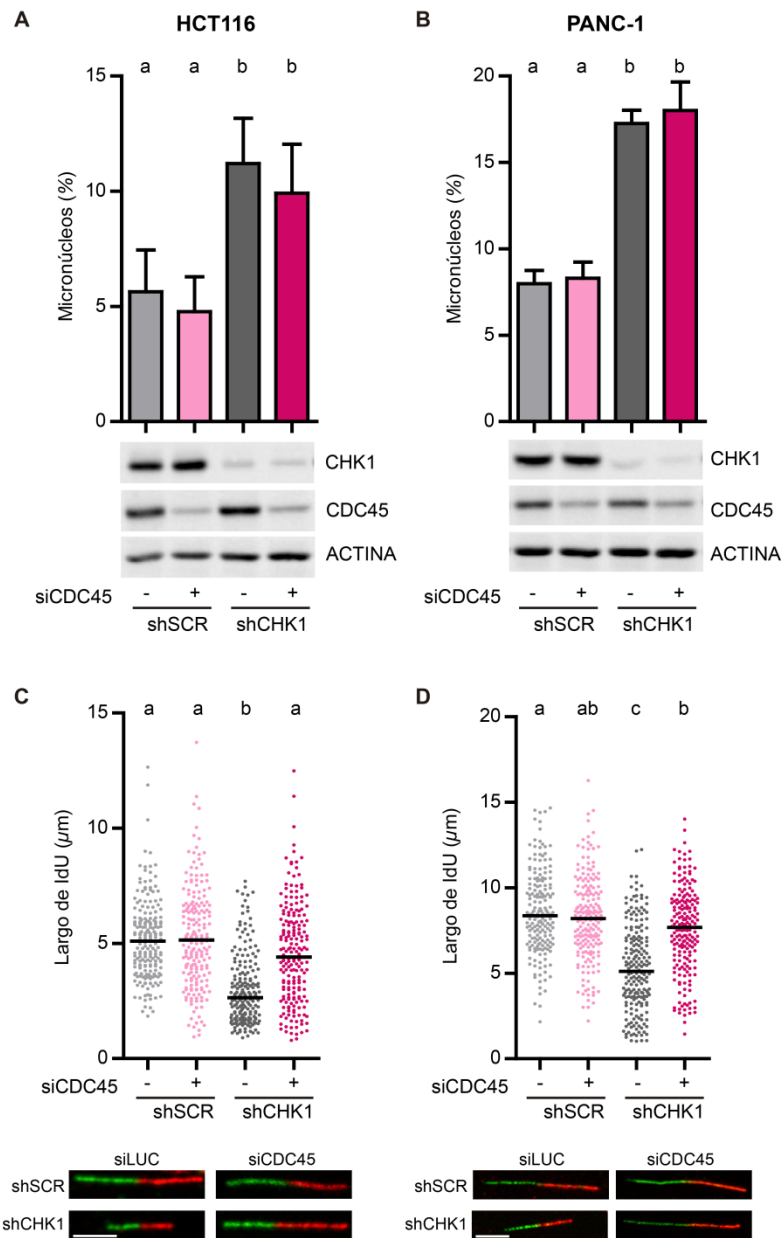


Fig. 2.6. La catástrofe replicativa, no así la inestabilidad cromosómica, es dependiente de CDC45 en células HCT116 y PANC-1 deficientes en CHK1. A y B) Porcentaje (media $\pm$ DE) de células HCT116 (A) y PANC-1 (B) binucleadas con micronúcleos. Los paneles inferiores muestran un Western-Blot de CHK1 y CDC45 48 hs después de la transfección. Actina se utilizó como control de carga. **C y D)** Largo de IdU de fibras individuales de células HCT116 (C) y PANC-1 (D). La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana. Las imágenes muestran fibras individuales representativas. Barras de escala de 5 μ m.

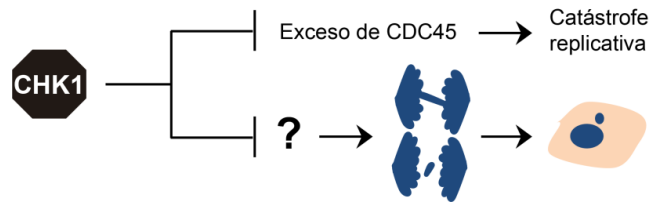


Fig. 2.7. Modelo I. El silenciamiento de CHK1 induce catástrofe replicativa e inestabilidad cromosómica por vías independientes. La catástrofe replicativa se identificó por la inducción de γ H2AX pan-nuclear que se sabe correlaciona con otros marcadores de daño al ADN (fosfo-RPA32 ser4/8 y fosfo-KAP1 ser824) y con acumulación de DSBs. La inestabilidad cromosómica se identificó por la inducción de aberraciones anafásicas y micronúcleos. Si bien el daño al ADN asociado al exceso de CDC45 (un cofactor de la helicasa) en cromatina precede a la catástrofe replicativa, este mecanismo molecular no explica la acumulación de inestabilidad genómica. En las siguientes secciones revelaremos cuál es el origen de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

2.5 La endonucleasa MUS81 desencadena inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

Las **Figs. 2.5** y **2.6** demuestran que la inestabilidad cromosómica y la catástrofe replicativa son variables independientes, lo que implica que el daño al ADN durante fase S no es la causa de la inestabilidad cromosómica. El daño al ADN en fase S (medido como γ H2AX pan-nuclear y los marcadores de daño asociados), y los DSBs en particular, dependen de la endonucleasa MUS81 (**Fig. 2.8** y (Forment & O'Connor, 2018; Murfuni et al, 2013; Techer et al, 2016)). Por lo tanto, nos sorprendimos al observar que el aumento de aberraciones anafásicas y micronúcleos en células deficientes en CHK1 también dependen de esta endonucleasa (**Fig. 2.9**). En las células HCT116 y PANC-1 el silenciamiento de MUS81 también previno la aparición de micronúcleos provocados por el silenciamiento de CHK1 (**Fig. 2.10**). Es decir que, aunque la inestabilidad cromosómica y la catástrofe replicativa sean variables independientes en células deficientes en CHK1, ambas dependen de la misma endonucleasa, MUS81.

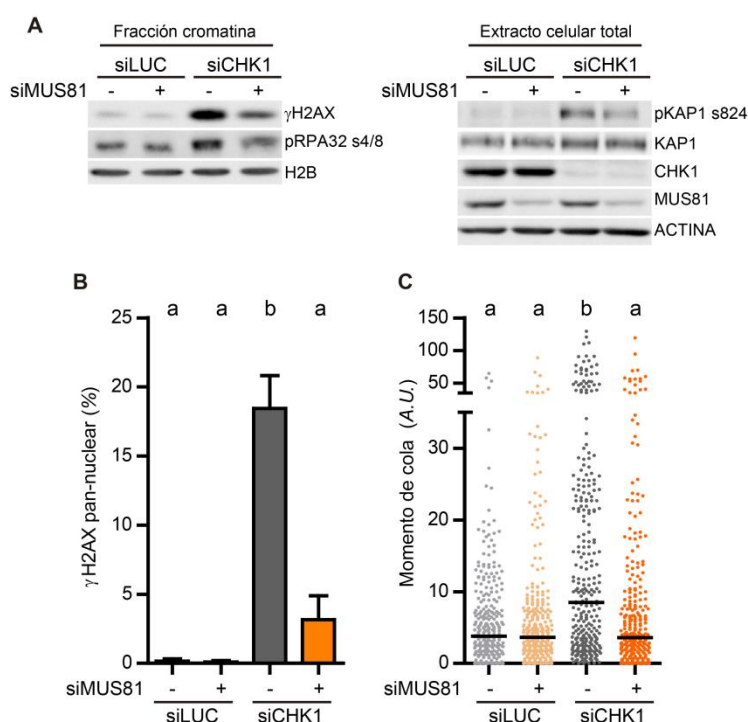


Fig. 2.8. El daño al ADN es dependiente de MUS81 en células deficientes en CHK1. **A)** Western-blot de γ H2AX, fosfo-RPA32 ser4/8, fosfo-KAP1 ser824 y KAP1 (como control interno de fosfo-KAP1 ser824) en células U2OS. El panel izquierdo muestra la fracción cromatínica obtenida luego de una extracción con buffer CSK; el panel derecho muestra el extracto celular total. MUS81 y CHK1 se revelaron como control

de silenciamiento. Actina y H2B se usaron como controles de carga. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS con tinción pan-nuclear de γ H2AX. **C)** Cuantificación por cometa neutro de DSBs por “momento de cola” en células U2OS (U.A.: unidades arbitrarias). La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana.

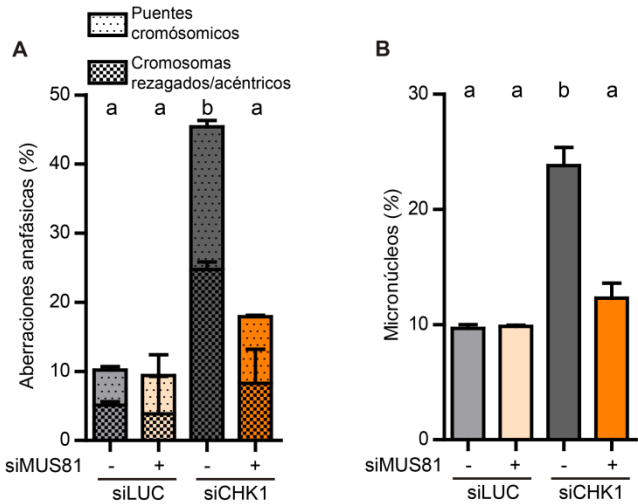


Fig. 2.9. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MUS81 en células deficientes en CHK1. **A)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos.

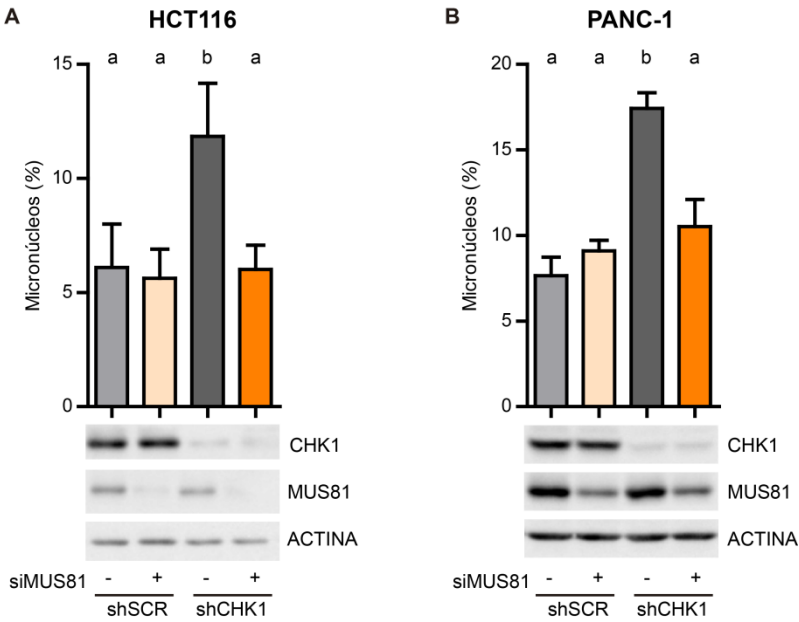


Fig. 2.10. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MUS81 en células HCT116 y PANC-1 deficientes en CHK1. Porcentaje (media $\pm$ DE) de células HCT116 (A) y PANC-1 (B) binucleadas con micronúcleos.

Los datos de las **Fig. 2.8 y 2.9** sugieren que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 está precedida por DSBs, dado que el silenciamiento de la endonucleasa MUS81 revierte esta inestabilidad. Sin embargo, los ensayos de COMETA neutro en las secciones anteriores no revelaron un vínculo entre los DSBs y la inestabilidad cromosómica (**Fig. 2.4C y 2.5**). Entonces, la inestabilidad cromosómica parecería depender de DSBs que no son detectados por el ensayo de COMETA neutro. Esto podría deberse a la baja sensibilidad de la técnica de COMETA neutro, que no tiene la suficiente resolución como para detectar menos de 50 DSBs por célula (Olive & Banath, 2006). Esto sugiere que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 surge de una cantidad limitada de DSBs (no detectable por COMETA neutro).

En resumen, nuestros resultados confirmaron que la catástrofe replicativa se asocia a una alta cantidad de DSBs, y sugieren que la inestabilidad cromosómica se asocia a una baja cantidad de DSBs (indetectables por la técnica de COMETA neutro).

2.6 Los DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis desencadenan inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

MUS81 es miembro de una familia de endonucleasas de estructura que procesa uniones de *Holliday* o intermediarios replicativos, generando DSBs (**Fig. 1.10**). Esta endonucleasa forma complejos heterodiméricos estables con las subunidades no catalíticas EME1 y EME2, que le confieren la capacidad de reconocer estructuras de ADN específicas y circunscriben el accionar de MUS81 a diferentes fases del ciclo (Ciccía et al, 2003; Ciccía et al, 2007). Mientras que la formación del complejo MUS81-EME1 se restringe a la mitosis, el complejo MUS81-EME2 solo se forma en fase S. Según nuestros resultados del capítulo anterior, MUS81 funciona en dos vías distintas en células silenciadas en CHK1, una asociada a catástrofe replicativa y otra asociada a inestabilidad cromosómica (**Fig. 2.8 y 2.9**). Por esto, nos planteamos la hipótesis de que esas dos funciones de MUS81 requieren de EME1 o EME2 de manera diferencial.

En línea con esta hipótesis, observamos que la acumulación pan-nuclear de γ H2AX y los DSBs medidos por COMETA neutro dependen de EME2, pero no de EME1. Sin embargo, y en total contraposición, el aumento de las aberraciones anafásicas y micronúcleos dependió de EME1, pero no de EME2 (**Fig. 2.11**). Estos resultados se ratificaron silenciando a EME1 y EME2 con otros siRNAs (**Fig. 2.12**). Es decir, el accionar de MUS81-EME2 conduce a catástrofe replicativa, mientras que el accionar de MUS81-EME1 conduce a inestabilidad cromosómica.

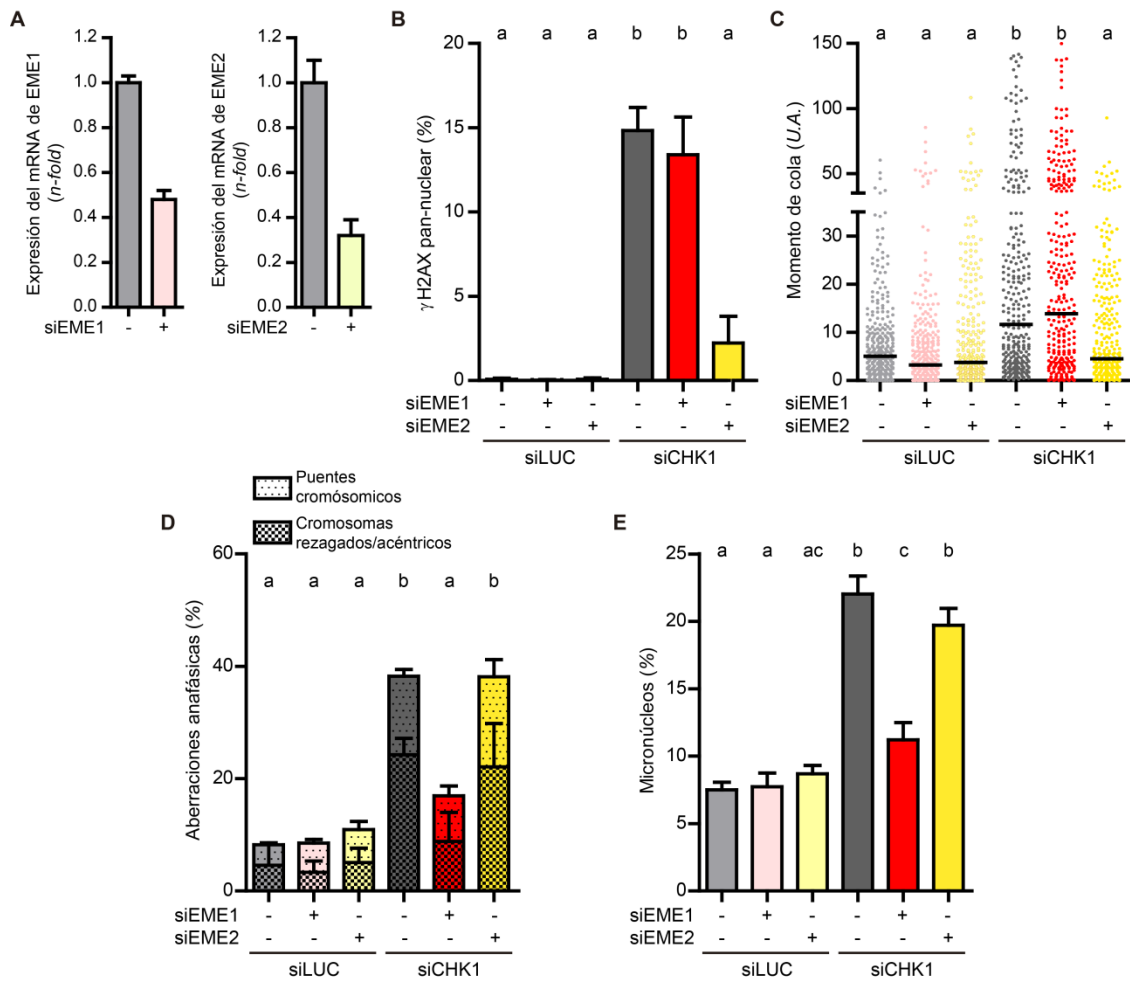


Fig. 2.11. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MUS81-EME1, no así de MUS81-EME2, en células deficientes en CHK1. **A)** PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de EME1 y EME2 normalizada al control de carga GAPDH en células U2OS. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS con tinción pan-nuclear de γ H2AX. **C)** Cuantificación por cometa neutro de DSBs por "momento de cola" en células U2OS (U.A.: unidades arbitrarias). La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana. **D)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). **E)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos.

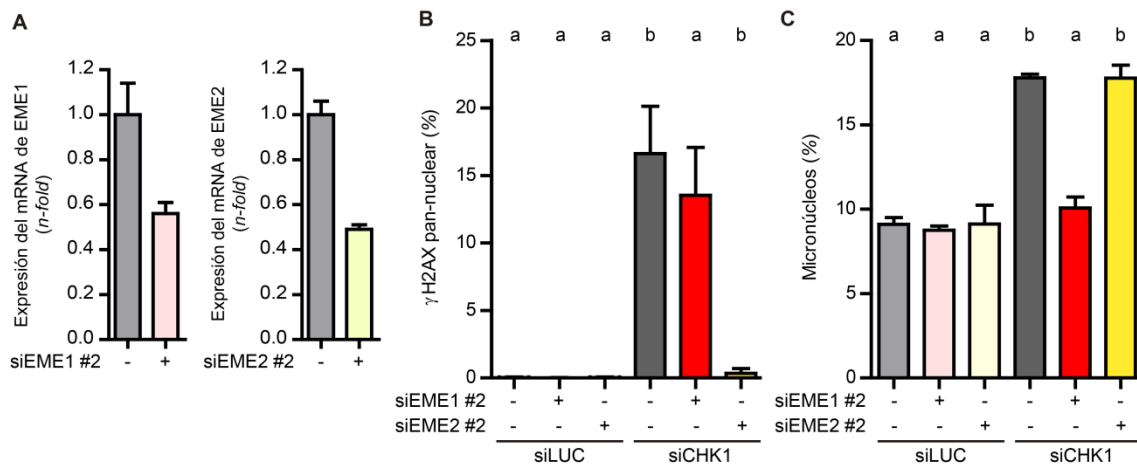


Fig. 2.12. Ratificación de la Fig. 2.11 con otros siRNAs para EME1 y EME2. **A)** PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de EME1 y EME2 normalizada al control de carga GAPDH en células U2OS. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS con tinción pan-nuclear de γ H2AX. **C)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos.

Las **Figs. 2.11D-E** y **2.12C** sugieren que MUS81-EME1 genera DSBs en células mitóticas, dado que MUS81-EME1 es una endonucleasa y su actividad se restringe a la mitosis por fosforilación CDK1-dependiente de EME1 (Matos et al, 2011; Wyatt et al, 2013). A continuación, procedimos a comprobar que MUS81-EME1 provoca DSBs en células deficientes en CHK1, y que lo hace en mitosis. Los DSBs mitóticos se pueden visualizar directamente como rupturas en cromosomas metafásicos teñidos con giemsa, o indirectamente como focos del marcador de daño al ADN γ H2AX en células mitóticas (Naim et al, 2013; Ying et al, 2013). De acuerdo con nuestra hipótesis, observamos que el silenciamiento de CHK1 aumenta la frecuencia de cortes en cromosomas metafásicos y de focos mitóticos de γ H2AX (**Fig. 2.13**). Además comprobamos que la inducción de DSBs mitóticos depende de EME1, pero no de CDC45 o EME2 (**Fig. 2.13**). Es decir, MUS81-EME1 genera DSBs en mitosis que conducen a inestabilidad cromosómica.

En conjunto, nuestros resultados proporcionan una clara evidencia de que los DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis desencadenan inestabilidad cromosómica. En contraposición, los DSBs dependientes de MUS81-EME2 en fase S conducen a catástrofe replicativa (**Fig. 2.14**).

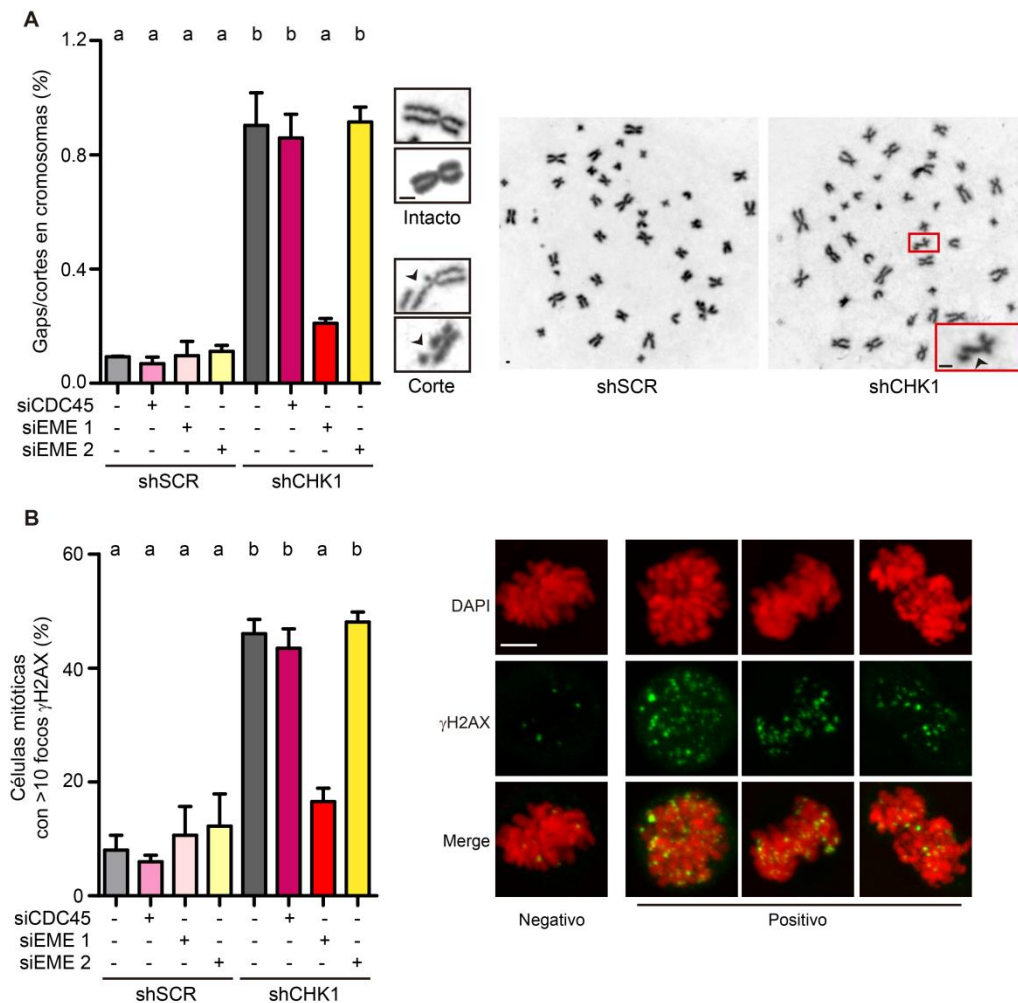


Fig. 2.13. MUS81-EME1 produce DSBs mitóticos en células deficientes en CHK1. A) Porcentaje de cromosomas mitóticos con rupturas (media $\pm$ DE) en células HCT116. Las imágenes representativas muestran cromosomas intactos o con corte. Las imágenes de la derecha muestran extensiones de cromosomas de una metafase control (obtenida a partir de células transducidas con shSCR) o deficiente en CHK1 (obtenida a partir de células infectadas con shCHK1). En todos los casos la barra de escala es de 1 μ m. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células mitóticas U2OS con más de 10 focos de γ H2AX. Las imágenes representativas muestran mitosis con más de 10 focos de γ H2AX (positiva) o con menos de 10 focos de γ H2AX (negativa). Las imágenes se crearon a partir de un Z-stack con microscopía confocal. Barra de escala: 5 μ m.

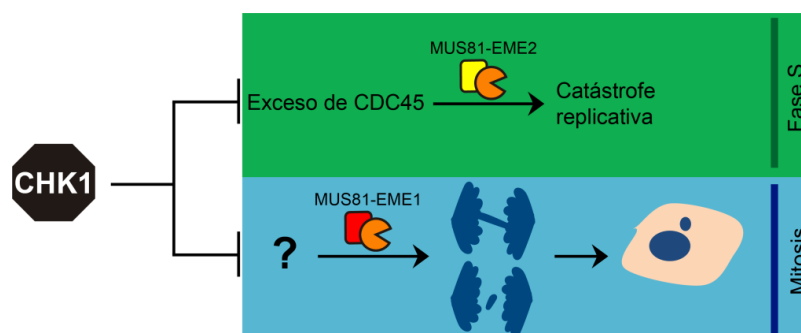


Fig. 2.14. Modelo II. Los DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis desencadenan inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1. Independientemente, los DSBs dependientes de MUS81-EME2 en fase S desencadenan catástrofe replicativa.

2.7 MUS81-EME1 corta intermediarios replicativos de la síntesis de ADN en mitosis en células deficientes en CHK1

Nuestros datos indican que los DSBs mitóticos dependientes de MUS81-EME1 son un disparador de inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1. En aparente contradicción con nuestros resultados, los artículos científicos publicados hasta la fecha establecen que los cortes dependientes de MUS81-EME1 protegen la integridad del genoma (Minocherhomji et al, 2015; Naim et al, 2013; Ying et al, 2013) porque representan el primer paso de un proceso de síntesis llamado síntesis de ADN en mitosis o MiDAS (**Fig. 1.13**) (Bergoglio et al, 2013; Minocherhomji et al, 2015), el cual completa la duplicación de las secuencias de ADN no replicadas en fase S (UR-DNA). Para lograr comprender esta contradicción, buscamos comprender cuál es el sustrato de esta endonucleasa que explica la inducción de inestabilidad cromosómica. Teniendo en cuenta que MUS81-EME1 puede reconocer y cortar intermediarios replicativos (Ciccia et al, 2003) y que la síntesis de ADN puede tener lugar en la mitosis, hipotetizamos que, a diferencia del modelo actual de MiDAS en el que el sustrato de MUS81-EME1 es el UR-DNA, el sustrato de MUS81-EME1 en células deficientes en CHK1 son los intermediarios replicativos que se forman durante la síntesis de ADN en mitosis. Mientras que el corte MUS81-EME1 dependiente de UR-DNA habilita la resolución por MiDAS de ese UR-DNA (y protege la estabilidad genómica), los cortes MUS81-EME1 dependientes de las estructuras replicativas en mitosis dañarían al ADN e inducirían inestabilidad cromosómica.

Para evaluar esta hipótesis primero tuvimos que identificar si el silenciamiento de CHK1 induce MiDAS. Para detectar MiDAS se realizó un pulso con el análogo de timidina EdU por 1 hora (Garribba et al, 2018) y se analizó su incorporación al ADN de células metafásicas por inmunofluorescencia (ver también sección 4.11). Se considera que una célula metafásica tiene MiDAS cuando posee al menos un foco de EdU. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de CHK1 aumenta el porcentaje de células mitóticas con focos de EdU (**Fig. 2.15**); también observamos que los focos de EdU en mitosis co-localizan con FANCD2, un marcador de MiDAS (Bergoglio et al, 2013; Minocherhomji et al, 2015). Este resultado nos permite

concluir que el silenciamiento de CHK1 induce síntesis de ADN en mitosis o MiDAS.

La literatura sobre MiDAS está principalmente restringida a estudios con el inhibidor de las ADN-pol afidicolina (APH). Dado que el MiDAS inducido por APH es dependiente de un corte generado por MUS81 (**Fig. 2.16A**), se propuso que MiDAS es similar a BIR (*Break Induced Replication*), un mecanismo de reparación de DSBs que involucra síntesis de ADN conservativa (Bhowmick et al, 2016; Di Marco et al, 2017; Minocherhomji et al, 2015). En contraposición, nosotros observamos que MiDAS inducido por la depleción de CHK1 es independiente de MUS81 (**Fig. 2.16B**). Con el fin de confirmar que MiDAS inducido por la depleción de CHK1 es independiente de un corte previo, silenciamos a SLX4, la proteína de andamiaje para MUS81. Al igual que el silenciamiento de MUS81, la depleción de SLX4 no impidió la síntesis en mitosis inducida por siCHK1 (**Fig. 2.16C y D**) pero revirtió la inducción de γ H2AX pan-nuclear y micronúcleos de células deficientes en CHK1 (validando el siRNA elegido para silenciar a SLX4) (**Fig. 2.16E y F**). En resumen, el MiDAS inducido por la depleción de CHK1 no tiene el mismo inicio molecular que el MiDAS inducido por APH; en particular, el MiDAS en células deficientes en CHK1 es independiente de MUS81 y, por lo tanto, probablemente no requiere de un corte para su iniciación.

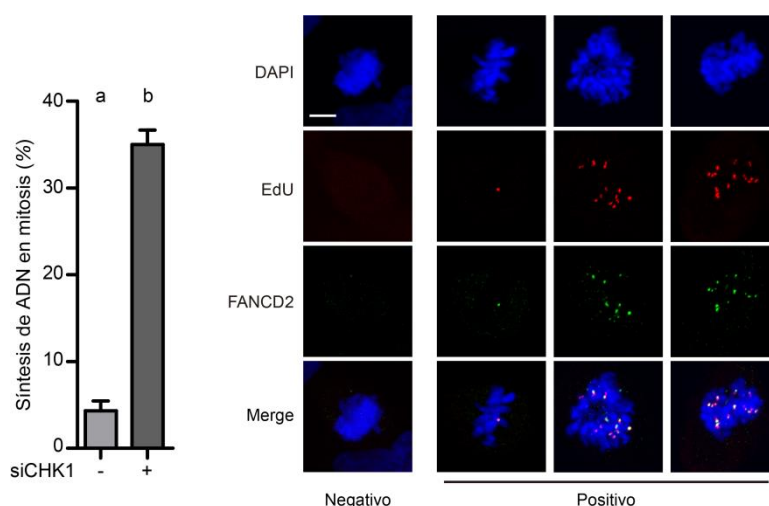


Fig. 2.15. El silenciamiento de CHK1 induce MiDAS. Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. Las imágenes representativas muestran células mitóticas sin MiDAS (negativo) y con MiDAS (positivo). Se considera que una célula tiene MiDAS cuando una metafase posee al menos un foco de EdU. Las imágenes se crearon a partir de un Z-stack con microscopía confocal. Barra de escala: 5 μ m

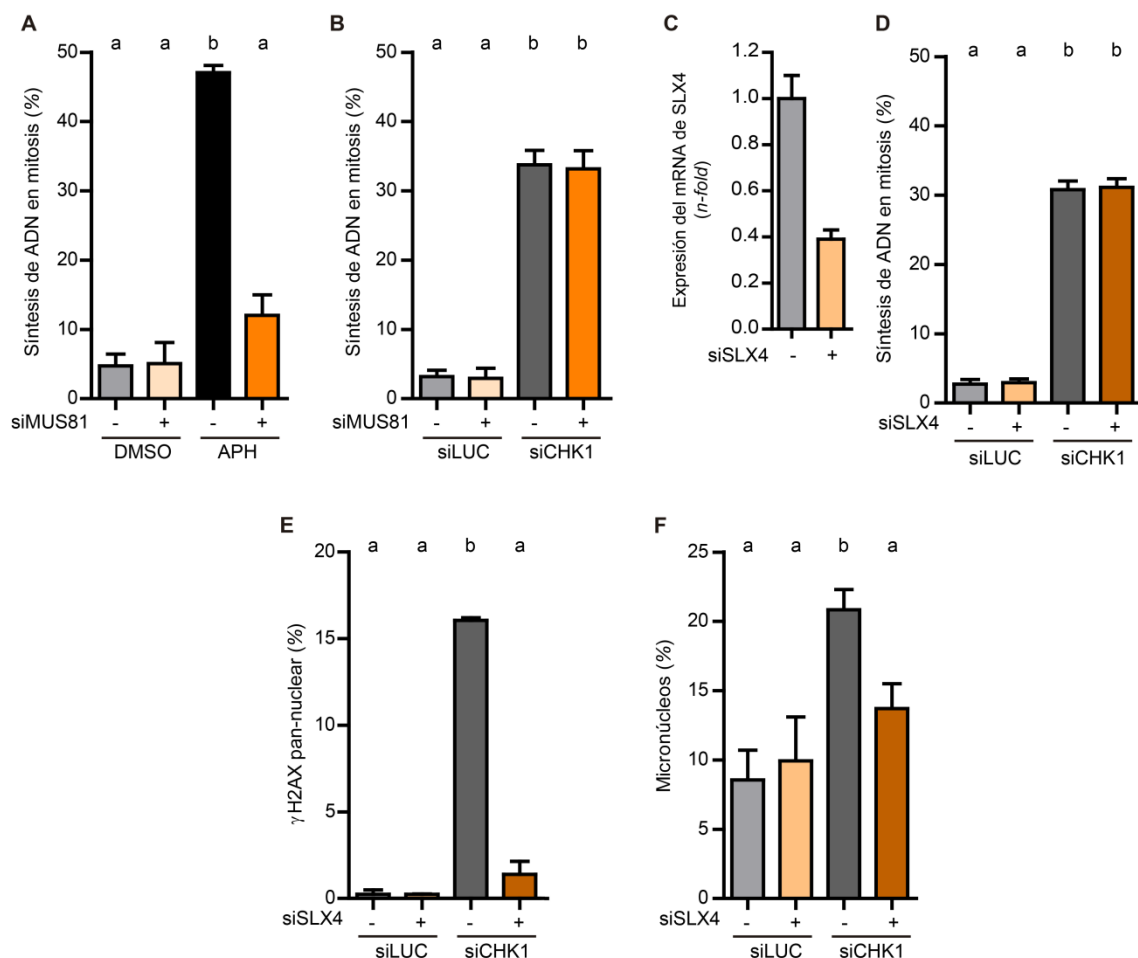


Fig. 2.16. MiDAS es independiente de MUS81 en células deficientes en CHK1. **A)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. La afidicolina (APH) fue agregada 24 hs antes de la fijación a una concentración de 0.2 μ M. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. **C)** PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de SLX4 normalizada al control de carga GAPDH de células U2OS. **D)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. **E)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS con tinción pan-nuclear γ H2AX. **F)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos.

Los resultados de la **Fig. 2.16** nos muestran que, en realidad, el MiDAS inducido por la falta de CHK1 no es un proceso similar a BIR como se plantea en el MiDAS inducido por APH. Por lo tanto, planteamos que el MiDAS inducido por la falta de CHK1 puede no ser una síntesis conservativa como se plantea en el modelo similar a BIR. La síntesis de ADN en mitosis puede ocurrir en una de los cromátidas hermanas o en ambas, representando síntesis conservativa o semi-conservativa, respectivamente (Garribba et al, 2018; Minocherhomji et al, 2015; Ozer et al, 2018). Los primeros artículos en describir al MiDAS inducido por APH mostraron que la incorporación de EdU en cromosomas metafásicos de células tratadas con APH ocurre principalmente en solo una de

sus cromátidas (*Bhowmick, 2016 y Ozer, 2018*), lo que indica síntesis conservativa y valida el modelo actual que propone que MiDAS es un proceso similar a BIR (ver también sección 1.5.3). Sin embargo, posteriormente se pusieron en duda estos resultados al mostrar que, en realidad, la mayoría de los cromosomas metafásicos de células tratadas con APH incorporan el EdU en ambas cromátidas (*Chappidi et al, 2020*), lo que indica síntesis semi-conservativa. De hecho, mis resultados con el MiDAS inducido por APH concuerdan en esta observación en donde los focos de EdU están mayoritariamente en ambas cromátidas (**Fig. 2.17A**). Esto no invalida completamente el hecho de que el MiDAS inducido por APH sea un proceso similar a BIR dado que depende de un corte previo para desarrollarse, sin embargo, plantea una incongruencia que debería ser atendida.

Con el fin de evaluar si el MiDAS inducido por la depleción de CHK1 se trata de una síntesis conservativa o semi-conservativa, medimos MiDAS en extensiones de cromosomas metafásicos teñidos con DAPI. Como esperábamos, los focos de EdU sólo se detectaron en células con depleción de CHK1, no así en la condición control (de la que se espera una finalización de la replicación en fase S y no en mitosis). Nuestros resultados con siCHK1 mostraron que la gran mayoría de los cromosomas metafásicos que incorporan EdU lo hacen con un patrón consistente con la replicación semi-conservativa (**Fig. 2.17A**). En conjunto, la síntesis de ADN en mitosis inducida por la depleción de CHK1 es independiente de un corte previo dependiente de MUS81-EME1 y es semi-conservativa, con lo cual descartamos que el MiDAS inducido por la falta de CHK1 sea un proceso similar a BIR.

La replicación semi-conservativa en cromosomas metafásicos podría ser una continuación del avance de las horquillas replicativas de fase S hacia mitosis, anulando la necesidad de una ruptura como sustrato inicial para MiDAS. Esta noción está en línea con nuestra observación de que MiDAS en células deficientes en CHK1 es independiente de SLX4 y MUS81 (**Fig. 2.16B y D**) y sugiere que los cortes provocados por MUS81-EME1 en cromosomas metafásicos podrían ocurrir sobre estructuras replicativas una vez iniciado MiDAS. Para evaluar esta hipótesis analizamos si existe una co-localización entre los DSBs y los focos de EdU en cromosomas metafásicos (**Fig. 2.17B**).

Identificamos que todas las rupturas coinciden con focos de EdU, pero los focos de EdU se detectaron con frecuencia en sitios intactos, sin rupturas (**Fig. 2.17B**). Esto confirma nuestra hipótesis que los DSBs en mitosis ocurren luego del inicio de MiDAS. Además, y conforme a la **Fig. 2.13** donde observamos que MUS81-EME1 genera los DSBs en mitosis, es importante destacar que la frecuencia de DSBs EdU-positivos se redujo abruptamente luego del silenciamiento de EME1 (**Fig. 2.17C**). En resumen, proponemos que la deficiencia de CHK1 provoca DSBs dependientes de MUS81-EME1 en sitios de síntesis de ADN semi-conservativa durante la mitosis.

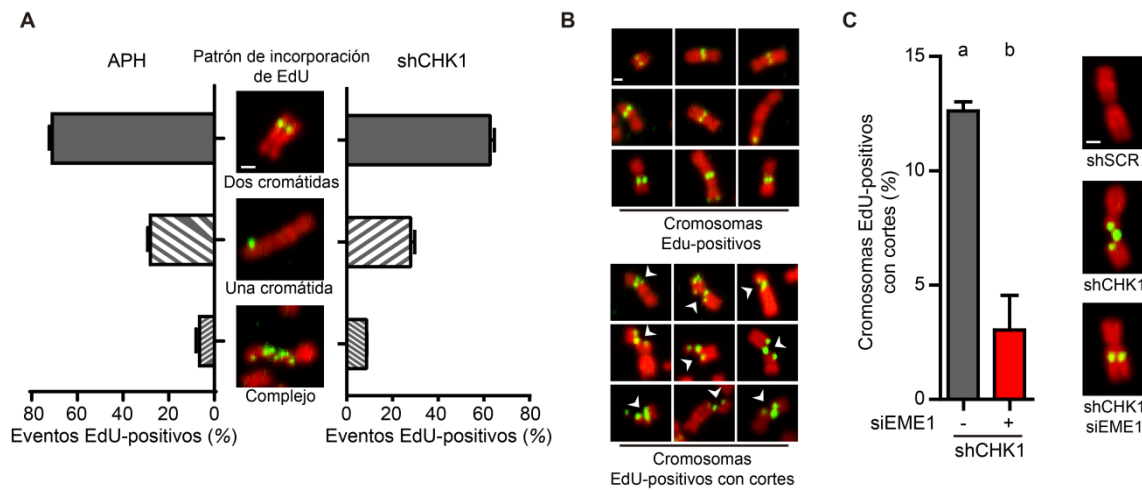


Fig. 2.17. Los cortes de MUS81-EME1 en cromosomas metafásicos de células deficientes en CHK1 ocurren en sitios de síntesis de ADN semi-conservativa. A) Porcentaje (media $\pm$ DE) e imágenes representativas de cromosomas de HCT116 (DAPI, rojo) con patrones de incorporación de EdU (verde) semi-conservativo (dos cromátidas), conservativo (una cromátida) y complejo. La afidicolina (APH) fue agregada 24 hs antes de levantar la muestra a una concentración de 0.2 μ M. Las figuras representativas corresponden a cromosomas metafásicos de células deficientes en CHK1 (shCHK1). Barra de escala: 1 μ m. **B)** Figuras representativas de cromosomas metafásicos de células HCT116 deficientes en CHK1 (shCHK1) con focos de EdU, intactos o con cortes. Sólo se muestran cromosomas de células deficientes en CHK1, ya que las muestras control no exhibieron incorporación de EdU. Los DSBs DAPI-negativos se marcan con flechas blancas. Barra de escala: 1 μ m. **C)** Porcentaje de cromosomas EdU-positivos con DSBs (media $\pm$ DE). Las imágenes muestran cromosomas representativos de la condición control (shSCR), de la condición deficiente en CHK1 (shCHK1) y de la condición deficiente en CHK1 y EME1 (shCHK1 siEME1). Barra de escala: 1 μ m.

2.8 La síntesis de ADN en mitosis causa inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

Nuestros datos sugieren que el MiDAS inducido por la depleción de CHK1 causa los DSBs en mitosis y la consecuente inestabilidad cromosómica. Para confirmar esta hipótesis, medimos DSBs en mitosis (identificados como focos del marcador de daño γ H2AX) e inestabilidad cromosómica luego del silenciamiento de POLD3 y RAD52, dos factores esenciales para MiDAS (Bhowmick et al, 2016; Minocherhomji et al, 2015). Primero corroboramos que el MiDAS en células deficientes en CHK1 dependa de POLD3 y RAD52 (**Fig. 2.18A y B**). Luego comprobamos que, en células deficientes en CHK1, el silenciamiento de POLD3 o RAD52 revierte el daño al ADN en células mitóticas, las aberraciones anafásicas y los micronúcleos, lo que sugiere fuertemente que MiDAS induce estos fenotipos (**Fig. 2.18C-E**). Para descartar que la reversión de estos fenotipos se deba a posibles efectos de POLD3 y RAD52 en fase S, medimos daño al ADN en fase S (medido como células con γ H2AX pan-nuclear) y velocidad de horquillas individuales luego del silenciamiento de POLD3 o RAD52. Confirmamos que el silenciamiento de POLD3 o RAD52 no revirtió ninguna de estas variables (**Fig. 2.19**). Junto con los datos de la (**Fig. 2.18A y B**), estos resultados sugieren fuertemente que la reversión del daño al ADN en mitosis y de la inestabilidad cromosómica observada al silenciar POLD3 o RAD52 está asociada a la inhibición de MiDAS. En conclusión, los intermediarios replicativos generados durante MiDAS (dependiente de POLD3 y RAD52) son cortados por MUS81-EME1, causando inestabilidad cromosómica.

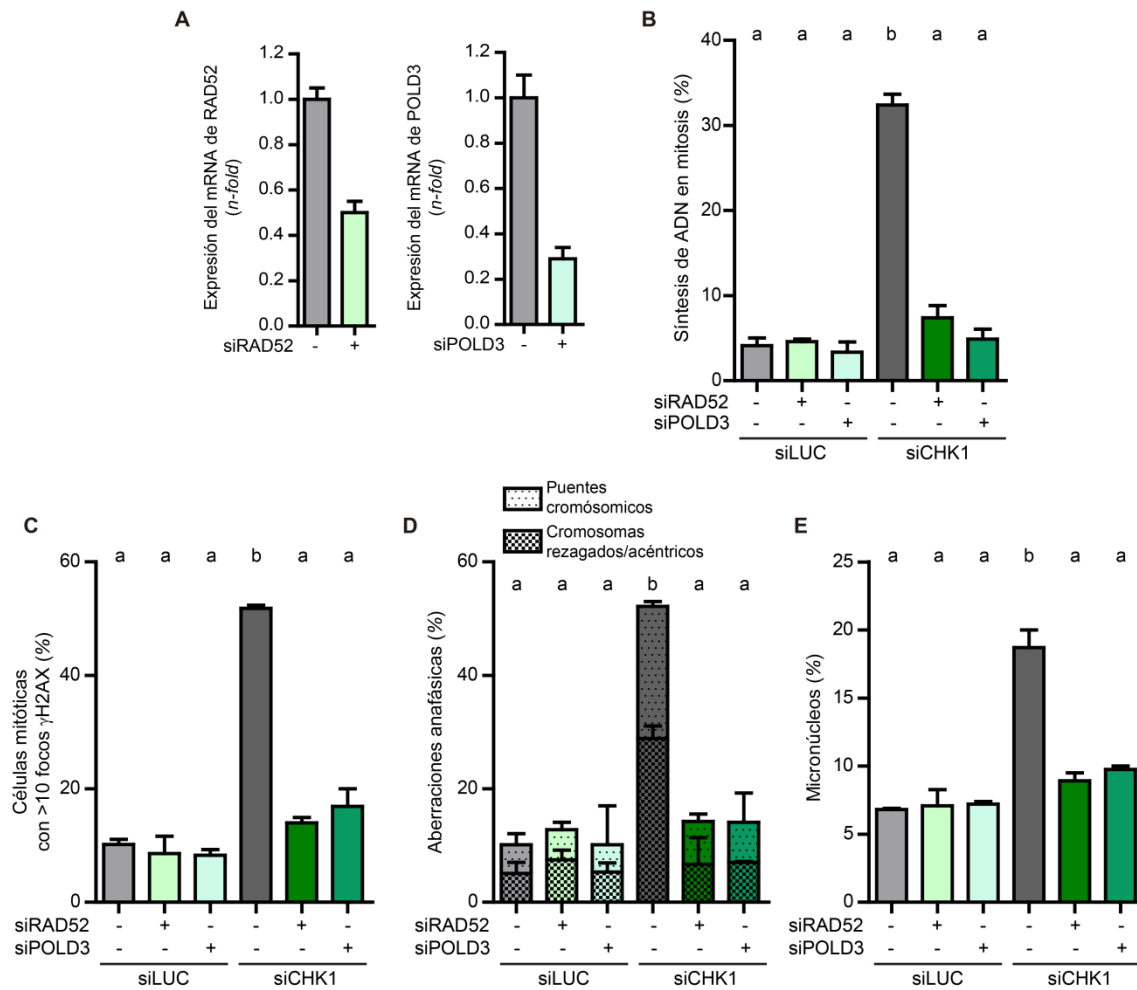


Fig. 2.18. La inestabilidad cromosómica es dependiente de MiDAS en células deficientes en CHK1. **A)** PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de RAD52 y POLD3 normalizada al control de carga GAPDH de células U2OS. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. **C)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células mitóticas U2OS con más de 10 focos de γ H2AX. **D)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). **E)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos.

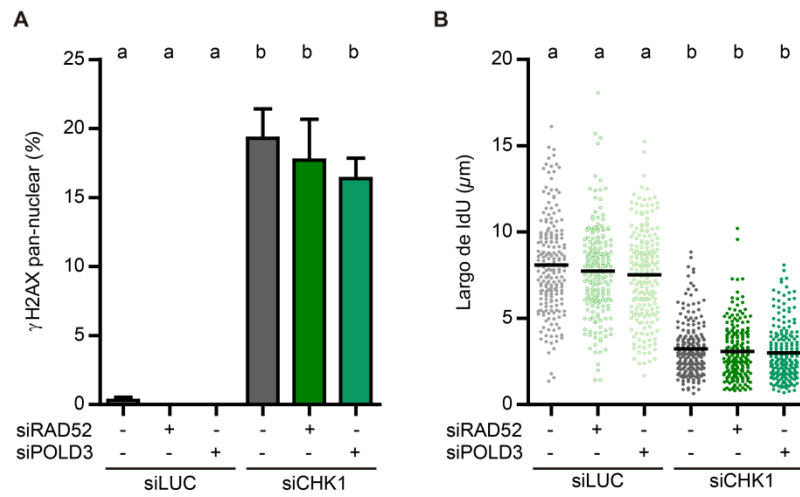


Fig. 2.19. El daño al ADN y el enlentecimiento de horquillas replicativas en fase S es independiente del MiDAS inducido por la depleción de CHK1. A) Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS con tinción pan-nuclear de γ H2AX. **B)** Largo de IdU de fibras individuales de células U2OS. La barra sobre la distribución de puntos indica la mediana.

2.9 La deficiencia de nucleótidos durante la síntesis en mitosis desencadena inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

MiDAS permite completar la duplicación del ADN más allá de la fase S y, por lo tanto, se espera que resguarde la estabilidad cromosómica (Bergoglio et al, 2013; Minocherhomji et al, 2015; Ozer et al, 2018). En aparente contraposición, demostramos que MiDAS es perjudicial para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1.

La disponibilidad de nucleótidos en células deficientes en CHK1 es restringida (Buisson et al, 2015; Gonzalez Besteiro et al, 2019; Pfister et al, 2015; Techer et al, 2016); sin embargo todavía se desconoce cómo esta escasez afecta a la duplicación del ADN. Dado que los nucleótidos son reactivos esenciales para cualquier síntesis de ADN, su restricción en células deficientes en CHK1 podría afectar tanto la síntesis en fase S como en mitosis. Nosotros hipotetizamos que la baja disponibilidad de nucleótidos podría limitar la síntesis en mitosis (MiDAS) en células deficientes en CHK1 y generar intermediarios replicativos propensos a ser cortados por MUS81-EME1, causando en última instancia inestabilidad cromosómica. En efecto, encontramos que el porcentaje de células deficientes en CHK1 con MiDAS aumenta al añadir nucleósidos (**Fig. 2.20A**). Este resultado sugiere que la baja disponibilidad de nucleótidos limita MiDAS en células deficientes en CHK1.

Nosotros planteamos que esta síntesis sub-óptima y/o incompleta por la baja disponibilidad de nucleótidos es incapaz de finalizar la duplicación de las secuencias de ADN no replicadas en fase S (UR-DNA) antes que termine la mitosis de células deficientes en CHK1. Los UR-DNA que no culminan su duplicación podrían ser procesados por MUS81-EME1, generando DSBs e inestabilidad cromosómica. En efecto, observamos que la suplementación con nucleósidos suprimió los DSBs en mitosis (identificados como focos de γ H2AX), las aberraciones anafásicas y los micronúcleos en células deficientes en CHK1 (**Fig. 2.20B-D**).

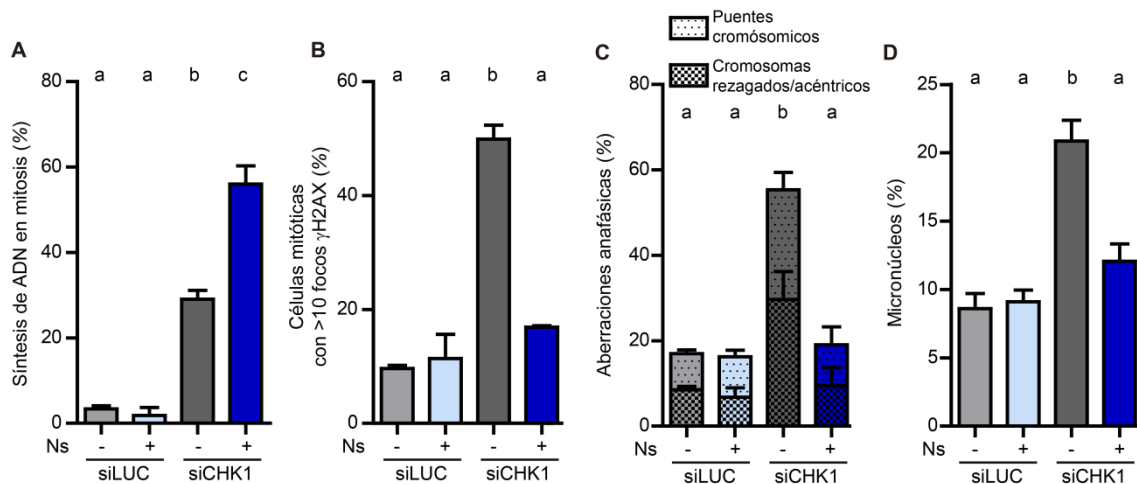


Fig. 2.20. La deficiencia de nucleótidos durante la síntesis de ADN en mitosis conduce a inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1. **A)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. Los nucleósidos (Ns) fueron agregados 24 hs antes de la fijación. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células mitóticas U2OS con más de 10 focos de γ H2AX. Los Ns fueron agregados 24 hs antes de la fijación. **C)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). **D)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS binucleadas con micronúcleos. Los Ns fueron agregados 24 hs antes de la fijación.

Para corroborar el vínculo entre la baja disponibilidad de nucleótidos, el MiDAS sub-óptimo y la inestabilidad cromosómica, combinamos afidicolina (APH) e hidroximetilurea (HU). La APH es un inhibidor de las ADN-pol que impide que la totalidad del genoma se duplique en fase S y, como consecuencia, induce UR-DNA y MiDAS (Lukas et al, 2011; Minocherhomji et al, 2015). La HU inhibe a la ribonucleótido reductasa (RNR), la enzima que cataliza la conversión de ribonucleótidos (rNTPs) a desoxirribonucleótidos (dNTPs) y cuya inhibición provoca un escenario de nucleótidos limitantes (Petermann et al, 2010a; Skoog & Bjursell, 1974; Skoog & Nordenskjold, 1971). Mientras que la APH induce un MiDAS que tiene lugar en presencia de nucleótidos suficientes, la combinación de APH y HU mimetizan a las células deficientes en CHK1: por un lado, APH induce MiDAS, por otro, HU baja la disponibilidad de nucleótidos. El resultado esperado para la combinación APH y HU sería una acumulación de células que inician MiDAS pero que no pueden completarlo dado el escenario de nucleótidos limitantes. En efecto, el MiDAS inducido por APH tiene características diferenciales al MiDAS inducido por APH en un contexto de nucleótidos limitados por HU (**Fig. 2.21 A-B**). De hecho, el MiDAS de APH y HU se asemeja notoriamente al MiDAS inducido por la falta de CHK1 a dos niveles: 1) a nivel molecular, ya que inicia independientemente de MUS81 (**Fig.**

2.21A); y 2) a nivel funcional, ya que induce aberraciones anafásicas de manera dependiente de MUS81 (**Fig. 2.21B**). Es decir, al igual que el MiDAS inducido por el silenciamiento de CHK1, el MiDAS inducido por APH y HU no requiere de un corte previo para iniciar la síntesis, y provoca intermediarios replicativos que son procesados por MUS81-EME1, generando inestabilidad cromosómica. Por lo tanto, la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 no es específica de esta condición; sino que MiDAS, aunque sea considerado un protector de la estabilidad cromosómica, podría actuar como un impulsor de inestabilidad en condiciones de nucleótidos insuficientes (**Fig. 2.22**).

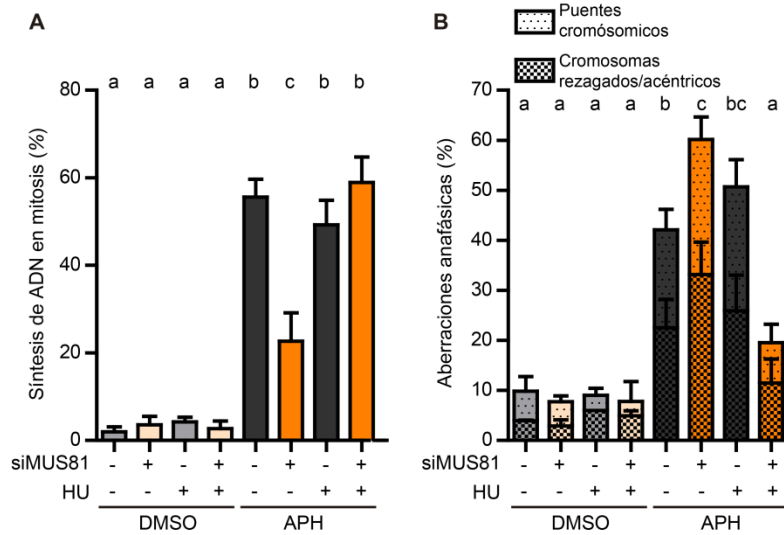


Fig. 2.21. La baja disponibilidad de nucleótidos causa un MiDAS sub-óptimo que desencadena inestabilidad cromosómica dependiente de MUS81. A) Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS mitóticas con focos de EdU. La afidicolina (APH) e hidroxiurea (HU) fueron agregadas 24 hs antes de la fijación. La APH se usó a 0.2 μ M y la HU a 100 μ M. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS anafásicas con puentes cromosómicos y cromosomas rezagados/acéntricos (se utilizó el porcentaje total de anafases aberrantes para calcular la estadística). La afidicolina (APH) e hidroxiurea (HU) fueron agregadas 24 hs antes de la fijación. La APH se usó a 0.2 μ M y la HU a 100 μ M.

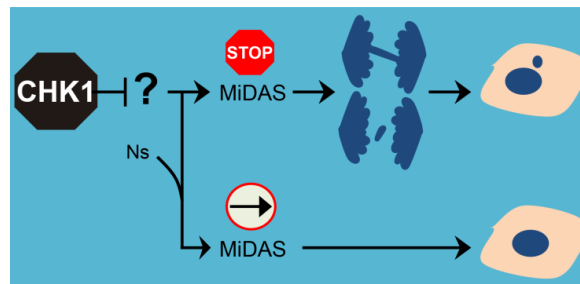


Fig. 2.22. Modelo III. La baja disponibilidad de nucleótidos (Ns) restringe la finalización de la síntesis de ADN en mitosis e impulsa inestabilidad cromosómica.

2.10 La baja disponibilidad de nucleótidos impide que las secuencias de ADN no replicadas en fase S se dupliquen en la mitosis

Nuestros datos indican que MiDAS está limitado por la baja disponibilidad de nucleótidos en células deficientes en CHK1 y que, como consecuencia, la duplicación del UR-DNA no puede finalizar en mitosis. En los casos en que queden secuencias aun sin duplicar al final de la mitosis, el UR-DNA se manifiesta como puentes ultrafinos (UFBs) en anafase, que a su vez resultan en cuerpos nucleares de 53BP1 (53BP1-NBs) en G1 (Falquet & Rass, 2019; Fernandez-Vidal et al, 2017; Harrigan et al, 2011; Lukas et al, 2011) (ver también sección 1.5.2). Es decir, los UFBs y los 53BP1-NBs revelan UR-DNA que escapa de MiDAS y persiste hasta la anafase y G1, respectivamente. Para explorar si en células deficientes en CHK1 quedan secuencias aun sin duplicar al final de la mitosis, analizamos la inducción de estos marcadores de UR-DNA y su dependencia de la concentración de nucleósidos. Observamos que el silenciamiento de CHK1 induce acumulación de UFBs y 53BP1-NBs, los cuales son revertidos mediante la adición de nucleósidos (**Fig. 2.23**). Por lo tanto, la administración de nucleósidos contrarresta el UR-DNA, probablemente porque facilita su duplicación en mitosis.

Al facilitar MiDAS, el agregado de nucleósidos podría impedir que los intermediarios replicativos se atasquen y sean cortados por MUS81-EME1, evitando, en última instancia, una segregación cromosómica defectuosa. Otra manera de promover una correcta segregación cromosómica en células deficientes en CHK1 es inhibir MiDAS; en este caso, MUS81-EME1 no tendría intermediario replicativo que cortar. A pesar de las similitudes a nivel de segregación cromosómica, es probable que agregar nucleósidos e inhibir MiDAS afecten diferencialmente al mantenimiento de la estabilidad genómica porque la capacidad de cada tratamiento de completar la síntesis del UR-DNA es diferente: mientras que el agregado de nucleósidos completa la síntesis del UR-DNA, la inhibición de MiDAS no debería resolver el UR-DNA. Para corroborar esta hipótesis, inhibimos MiDAS silenciando a RAD52 en células deficientes en CHK1 y medimos los marcadores de UR-DNA. Si bien el silenciamiento de RAD52 revierte la inestabilidad cromosómica en células

deficientes en CHK1 (de la misma manera que lo hace la suplementación con nucleósidos (**Fig. 2.18D-E** y **2.20C-D**)), no evitó la acumulación de 53BP1-NBs e incluso aumentó la frecuencia de UFBs en células deficientes en CHK1 (**Fig. 2.23**). Entonces, si bien la inhibición de MiDAS impide la formación de intermediarios replicativos atascados en mitosis y su consecuente corte por MUS81-EME1, no resuelve el problema inicial que es la acumulación de secuencias de ADN sin duplicar al final de la fase S (UR-DNA).

Uno de los posibles orígenes del UR-DNA es el daño al ADN en fase S que resulta en horquillas atascadas. Si dos horquillas vecinas se atascan y no hay un origen replicativo dormido intermedio que pueda activarse para resolverlas, la secuencia de ADN entre ambas horquillas se mantendrá sin duplicar hasta el final de la fase S (ver también sección 1.5.2). Nuestros datos sugieren que el daño al ADN en fase S no conduce a UR-DNA en células deficientes en CHK1 dado que el daño al ADN en fase S y la inestabilidad cromosómica (cuyo origen son los UR-DNA) son variables independientes. Para corroborar esta hipótesis silenciamos a CDC45 y medimos los marcadores de UR-DNA. Debido a que el silenciamiento de CDC45 revierte el daño al ADN en fase S (**Fig. 2.4**), pero no resuelve los DSBs en mitosis ni la inestabilidad cromosómica (**Fig. 2.13** y **2.5**), no esperamos que resolviera el UR-DNA. En efecto, observamos que el silenciamiento de CDC45 no revirtió ninguno de los marcadores de UR-DNA (**Fig. 2.23**), lo que confirma que la acumulación de secuencias de ADN sin duplicar en mitosis no deriva del daño en fase S dependiente de CDC45.

En conjunto, nuestros resultados indican que el UR-DNA (que no resulta de la acumulación de daño en fase S) es el causante de las aberraciones anafásicas y los micronúcleos en células deficientes en CHK1. La síntesis de ADN en mitosis o MiDAS es el proceso mediante el cual las células intentan duplicar el UR-DNA en la mitosis. Sin embargo, la baja disponibilidad de nucleótidos en células deficientes en CHK1 limita el accionar de MiDAS, de manera que los intermediarios replicativos se atascan, pudiendo así ser reconocidos por la endonucleasa MUS81-EME1, la cual corta esos intermediarios replicativos atascados en mitosis, desencadenando aberraciones anafásicas y micronúcleos. El agregado de nucleósidos permite

que MiDAS resuelva el UR-DNA, evitando el atascamiento de los intermediarios replicativos y así los cortes de la endonucleasa. Inhibir MiDAS también impide los cortes porque MUS81-EME1 no tiene intermediario replicativo que reconocer; sin embargo, el UR-DNA continuará a lo largo de la mitosis y concluirá como un daño heredable a las futuras células hijas.

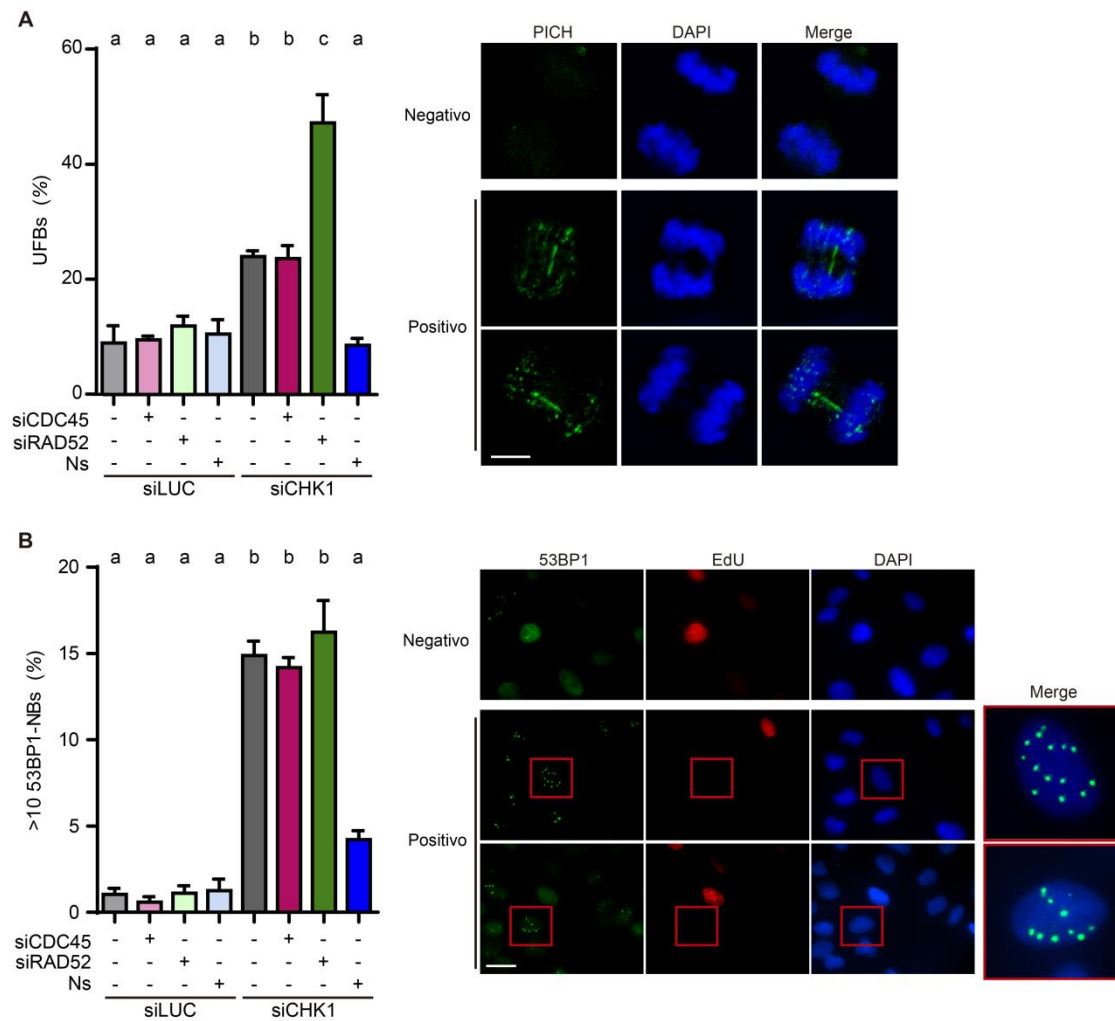


Fig. 2.23. La deficiencia de nucleótidos durante MiDAS impide que el UR-DNA se duplique completamente en células deficientes en CHK1. A) Porcentaje (media $\pm$ DE) de células anafásicas U2OS con UFBs (detectados por inmunofluorescencia para PICH). Los nucleosidos (Ns) se agregaron 24 hs antes de la fijación. Las imágenes representativas muestran anafases sin UFBs (PICH-negativo) y con UFBs (PICH-positivo). Barra de escala: 5 μ m. **B)** Porcentaje (media $\pm$ DE) de células U2OS en G1 (EdU-negativas; las células Edu-positivas se consideran están en fase S y por lo tanto se excluyen del análisis) con más de 10 53BP1-NBs. Se agregaron Ns 24 hs antes de la fijación. Las imágenes representativas muestran campos de células con menos de 10 53BP1-NBs (negativo) y con más de 10 53BP1-NBs (positivo). Barra de escala: 10 μ m.

2.11 La inestabilidad cromosómica no compromete la supervivencia de las células deficientes en CHK1

El daño al ADN en fase S puede desencadenar inestabilidad cromosómica y/o muerte celular. Además la inestabilidad cromosómica y la muerte celular pueden estar relacionados entre sí dado que niveles intermedios de DSBs en fase S pueden inducir inestabilidad cromosómica como una antesala a la muerte (Siri et al, 2021). Nosotros y otros grupos de investigación demostramos que la catástrofe replicativa es el desencadenante de la muerte en células deficientes en CHK1 (Forment & O'Connor, 2018; Sakurikar et al, 2016; Sanjiv et al, 2016); al mismo tiempo, los resultados en esta tesis muestran una clara disección entre la catástrofe replicativa y la inestabilidad cromosómica (**Fig. 2.5 y 2.6**). Por esta razón, postulamos que la inestabilidad cromosómica no precede a la muerte celular en células deficientes en CHK1. De hecho, revertir la inestabilidad cromosómica mediante el silenciamiento de RAD52 (**Fig. 2.18D-E**) o la suplementación con nucleósidos (**Fig. 2.20C-D**) no mejoró la sobrevivencia de las células deficientes en CHK1 (**Fig. 2.24**). Además, el silenciamiento de CDC45, que no revierte la inestabilidad cromosómica (**Fig. 2.6**), fue suficiente para revertir totalmente la muerte celular tras la depleción de CHK1 (**Fig. 2.24 y** (Gonzalez Besteiro et al, 2019)). Estos resultados demuestran claramente que la inestabilidad cromosómica no es la causa de la muerte celular en células deficientes en CHK1.

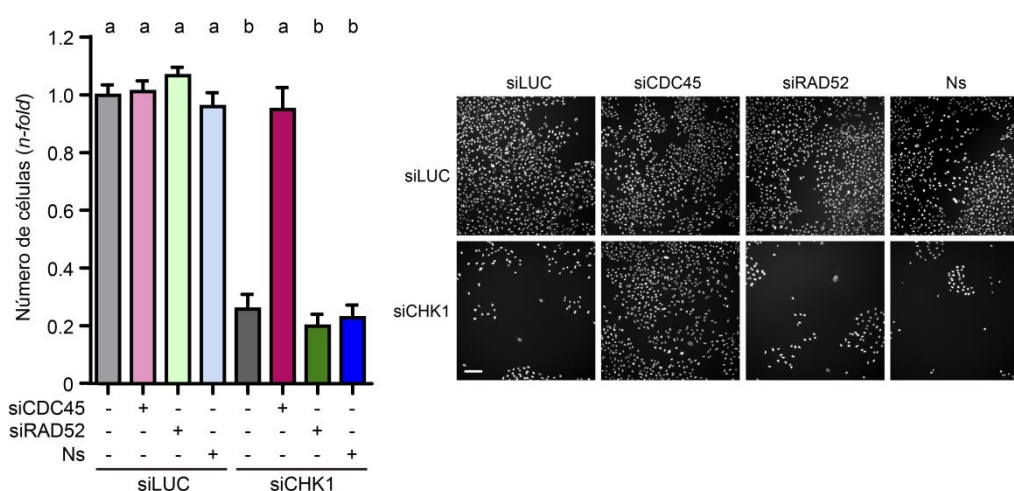


Fig. 2.24. La muerte celular es independiente de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1. Sobrevida celular expresada como el número total de células normalizado a siLuc (n-fold). Los nucleosidos (Ns) se agregaron 120 hs antes de la fijación. La cuantificación se realizó 6 días después de la transfección. Se cuantificó por número total de núcleos con el equipo InCell. Las imágenes muestran campos celulares representativos. Barra de escala: 500 μ m.

3. Discusión



3.1 La depleción o inhibición de CHK1 induce inestabilidad cromosómica

A pesar de los numerosos artículos que caracterizan a las células deficientes o inhibidas en CHK1, apenas unos pocos muestran que la inhibición de CHK1 induce inestabilidad cromosómica. Esta tesis muestra contundentemente que la depleción o inhibición de CHK1 induce inestabilidad cromosómica en hasta 3 líneas celulares tumorales humanas. Mostramos por primera vez que la deficiencia en CHK1 desencadena la acumulación de cromosomas rezagados y/o cromosomas acéntricos, y de micronúcleos. Además confirmamos informes anteriores que muestran que la inactivación de CHK1 induce puentes cromosómicos (Petsalaki et al, 2014; Tang et al, 2006). A lo largo de esta tesis identificamos una estrecha correlación entre las aberraciones anafásicas y los micronúcleos; nuestros datos concuerdan con la bibliografía que postula que las aberraciones anafásicas pueden culminar en micronúcleos porque los mismos surgen de errores en la segregación de las cromátidas hermanas durante la anafase (Bizard & Hickson, 2018; Hoffelder et al, 2004; Utani et al, 2010; Wilhelm et al, 2019).

Las aberraciones anafásicas pueden tener múltiples orígenes; uno de estos gatillos moleculares, que consideramos (y comprobamos) en células deficientes en CHK1, son los cortes al ADN (DSBs). Un DSB que no es reparado puede resultar en un cromosoma acéntrico, esto es, un fragmento de cromosoma sin centrómero que no se puede alinear en el ecuador de la célula. Un DSB también puede resultar en un puente cromosómico como resultado de una fusión cromosómica producto de su reparación incompleta o errónea (Bizard & Hickson, 2018; Gisselsson, 2008). En esta tesis confirmamos que CHK1 evita la acumulación de DSBs que derivan en aberraciones anafásicas y micronúcleos; CHK1 es por lo tanto un actor central en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica.

3.2 La depleción de CHK1 induce catástrofe replicativa dependiente de CDC45

A diferencia de la escasa cantidad de artículos científicos que mencionan el rol de CHK1 en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, está muy descripto que su inhibición o silenciamiento induce estrés replicativo que causa daños en el ADN y, finalmente, muerte celular (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Moiseeva et al, 2019; Murfuni et al, 2013; Sakurikar et al, 2016; Techer et al, 2016). El estrés replicativo es una alteración de la coreografía replicativa medida como cambios en la velocidad de horquillas replicativas y/o en el porcentaje de orígenes replicativos activos. El modelo aceptado (**Fig. 1.20**) hasta nuestro artículo publicado en 2019 (Gonzalez Besteiro et al, 2019) era que la disminución en la velocidad de horquillas replicativas causaba DSBs en fase S. En *González Besteiro, 2019*, demostramos que la acumulación de DSBs en células deficientes en CHK1 es independiente de la disminución en la velocidad de horquillas -la acumulación de DSBs en células deficientes en CHK1 es, en cambio, dependiente del mayor disparo de orígenes replicativos (**Fig. 1.20**)-. En particular observamos que normalizar el disparo de orígenes (sin revertir la disminución en la velocidad de horquillas) por inhibición de CDC7 o CDT1 (proteínas que participan en el licenciamiento de orígenes) revertía los DSBs en células deficientes en CHK1, descartando que la disminución en la velocidad de horquillas replicativas causen los DSBs en fase S.

Los DSBs inducen muerte en las células deficientes en CHK1, pero en *González Besteiro, 2019* observamos que no son la única causa. Otra causa de muerte celular en células deficientes en CHK1 son las barreras replicativas causadas por el exceso de CDC45 en la cromatina. Por esta razón, dado que CDC45 actúa en las dos vías que inducen muerte celular -altera la coreografía replicativa y crea las barreras replicativas-, utilizamos su silenciamiento para evaluar la inducción de catástrofe replicativa en células deficientes en CHK1. La catástrofe replicativa implica muerte celular y se refiere a una ruptura masiva de todas las horquillas de ADN que resultan en abundante ADN simple cadena (ADNsc) y DSBs (Buisson et al, 2015; Duda et al, 2016; Toledo et al, 2013).

En esta tesis, observamos una inducción de catástrofe replicativa en células deficientes en CHK1. La catástrofe replicativa fue identificada como la presencia de células con distribución pan-nuclear del marcador de daño γ H2AX que también correlaciona con la presencia de abundantes DSBs (medidos directamente por COMETA neutro e indirectamente por marcadores moleculares de daño identificados por Western-Blot). Observamos que el silenciamiento de CDC45 revirtió completamente la catástrofe replicativa junto con todos los marcadores de daño al ADN y los DSBs medidos por COMETA neutro. En resumen, en esta tesis identificamos que el silenciamiento de CDC45 en células deficientes en CHK1 revierte la coreografía replicativa alterada, el daño al ADN en fase S y la catástrofe replicativa.

3.3 Una cantidad limitada de DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis inducen inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

Uno de los posibles inductores de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 son los DSBs de fase S. Las células con DSBs medidos por COMETA neutro correlacionan con células con distribución pan-nuclear de γ H2AX, y por lo tanto, creemos, reflejan células con catástrofe replicativa. Entonces, si las células deficientes en CHK1 con catástrofe replicativa dependiente de CDC45 están asociadas a la muerte, los DSBs medidos por COMETA neutro no pueden ser el origen de la inestabilidad cromosómica. En otras palabras, no puede haber inestabilidad cromosómica medida como aberraciones anafásicas ni micronúcleos si las células con los DSBs que la inducen mueren en una etapa previa. En esta tesis, nuestros resultados confirman esta observación ya que los niveles de inestabilidad cromosómica de las muestras siCHK1 y siCHK1-siCDC45 son similares entre sí. Por lo tanto, el daño al ADN en fase S no sería el promotor de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 (**Fig. 3**). Más aún, estos datos muestran que ni el mayor disparo de orígenes, ni las barreras replicativas causadas por el exceso de carga de CDC45 al ADN (ambos fenotipos que se revierten al silenciar CDC45) son el origen de la inestabilidad.

Aunque concluimos que el daño masivo al ADN no es la causa de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1, una posibilidad es que niveles intermedios de daño al ADN, que no sean lo suficientemente elevados como para inducir muerte celular por catástrofe replicativa, causen inestabilidad cromosómica. De hecho, en esta tesis identificamos que la inestabilidad cromosómica es dependiente de los DSBs provocados por MUS81 en mitosis. Este resultado desafía nuestros propios pronósticos dado que previamente habíamos identificado que la inestabilidad cromosómica en células siCHK1-siCDC45 es independiente de los DSBs medidos por COMETA neutro. Entonces, ¿por qué los DSBs provocados por MUS81 que inducen inestabilidad cromosómica no fueron identificados por la técnica de COMETA neutro en células siCHK1-siCDC45? La técnica de COMETA neutro no tiene suficiente resolución como para detectar menos de 50 DSBs por célula (Olive &

Banath, 2006), por lo que suponemos que los DSBs provocados por MUS81 que inducen inestabilidad cromosómica son escasos. En conclusión, proponemos que una única endonucleasa (MUS81) lidera la inducción de: 1) los DSBs detectables por COMETA neutro derivados del mayor disparo de orígenes replicativos y asociados a catástrofe replicativa, y 2) los DSBs indetectables por COMETA neutro asociados a inestabilidad cromosómica.

Al profundizar en los mecanismos por los cuales la misma endonucleasa (MUS81) produce DSBs que inducen catástrofe replicativa e inestabilidad cromosómica por separado, identificamos que EME1 y EME2, las subunidades no catalíticas de MUS81, participan de manera diferencial en ambos procesos. La interacción de MUS81 con EME1 o EME2 es una condición necesaria para que esta endonucleasa adquiera actividad catalítica y pueda reconocer determinadas estructuras de ADN. Además, EME1 y EME2 circunscriben el accionar de MUS81 a diferentes fases del ciclo. EME1 circunscribe la actividad de MUS81 a la mitosis, y EME2 a la fase S. Nuestros resultados revelaron que los DSBs dependientes de MUS81-EME1 en mitosis desencadenan inestabilidad cromosómica, mientras que los DSBs dependientes de MUS81-EME2 en fase S conducen a catástrofe replicativa (**Fig. 3**). Concluimos entonces que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 surge de unos pocos DSBs causados por la endonucleasa MUS81-EME1 en mitosis.

3.4 La entrada a mitosis prematura podría ser la causa de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

Hasta aquí identificamos que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 se origina por DSBs en mitosis. ¿Podemos excluir otros inductores de inestabilidad cromosómica? Una posibilidad que planteamos en la sección 1.7.7 de esta tesis es que, considerando el rol de CHK1 en el *checkpoint* de mitosis o SAC (Zachos et al, 2007), la inestabilidad cromosómica se induzca por errores en el ensamblaje del huso mitótico controlado por SAC (Gonzalez Besteiro et al, 2019). Este mecanismo de inducción de inestabilidad estaría asociado a errores en la segregación cromosómica como consecuencia de cromosomas enteros que no se alinean correctamente en el huso mitótico de una célula metafásica. Es decir, este mecanismo de inducción de inestabilidad cromosómica sería independiente del daño al ADN. Sin embargo, hay dos razones por las cuales descartamos esta hipótesis. En primer lugar, si la inestabilidad dependiese de errores en la segregación cromosómica como consecuencia de cromosomas mal alineados, esto provocaría los llamados cromosomas rezagados en las anafases aberrantes y no explicaría la presencia de los puentes cromosómicos que observamos en casi el 50% de los casos (ver también sección 1.5.5). En segundo lugar, el hecho de que los DSBs preceden a la segregación errónea de los cromosomas hermanos en células mitóticas deficientes en CHK1 favorece la noción de que la inestabilidad cromosómica no es inducida por un error en el control de SAC dado que este no sería el causante de los DSBs. En conjunto, nosotros descartamos que la inestabilidad cromosómica guarde relación con la actividad de CHK1 en el *checkpoint* de mitosis.

Otro posible origen de la inestabilidad cromosómica es que una desregulación en fase S induzca los DSBs en mitosis que asociamos a esta inestabilidad. Sin embargo, si la desregulación en fase S fuera el origen de los DSBs mitóticos que preceden a la inestabilidad cromosómica, ¿por qué no se resuelve al revertir la coreografía replicativa alterada medida por la técnica de estiramiento de fibra de ADN cuando silenciemos a CDC45? Para responder a esta pregunta es preciso recordar que la coreografía replicativa alterada define al estrés replicativo (Forment & O'Connor, 2018; Gaillard et al, 2015), y que el

estrés replicativo se puede clasificar en estrés replicativo agudo y estrés replicativo moderado en función de su intensidad y consecuencias (ver también sección 1.5.2) (Bohly et al, 2019; Wilhelm et al, 2019; Wilhelm et al, 2020). El estrés replicativo agudo se manifiesta como alteraciones en la coreografía replicativa visibles por el ensayo de estiramiento de fibra, DSBs en fase S y/o expresión de marcadores de daño al ADN (como γ H2AX pan-nuclear). El estrés replicativo moderado se puede manifestar como pequeños cambios en la coreografía replicativa que escapan al límite de detección de la técnica de estiramiento de fibras, una baja o nula inducción de daño al ADN y una baja o nula activación del *checkpoint* (ver también sección 1.5.2). Por todo esto, el estrés replicativo moderado puede provocar que regiones del genoma no terminen de duplicarse al finalizar la fase S. La finalización de la fase S con ADN aun sin duplicar implica el traspaso de secuencias de ADN no replicadas a mitosis. Estas secuencias, llamadas UR-DNA, tienen el potencial de inducir inestabilidad cromosómica (Bizard & Hickson, 2018; Burrell et al, 2013; Harrigan et al, 2011; Lukas et al, 2011). En esta tesis confirmamos que el silenciamiento de CHK1 induce UR-DNA e inestabilidad cromosómica independientemente de la coreografía replicativa alterada o del daño al ADN en fase S (esto es, independientemente del silenciamiento de CDC45). Estos resultados sugieren que el origen de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 podría ser producto de una desregulación en fase S que sea independiente a la coreografía replicativa alterada o que sea producto de cambios sutiles en la coreografía replicativa que escapan al límite de detección de la técnica de estiramiento de fibras. En resumen, proponemos que la inestabilidad cromosómica de células deficientes en CHK1 se origina en un estrés replicativo moderado que provoca UR-DNA (**Fig. 3**).

¿Cuál podría ser el origen del UR-DNA que induce la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1? Una posibilidad son las horquillas replicativas atascadas dado que si dos horquillas vecinas se atascan y no hay un origen replicativo intermedio que pueda activarse para resolverlas, la secuencia de ADN entre ambas horquillas se mantendrá sin duplicar hasta el final de la fase S, generando UR-DNA (Durkin & Glover, 2007; Ozer & Hickson, 2018). Sin embargo, los resultados de esta tesis sugieren que las horquillas

replicativas atascadas no son las inductoras del UR-DNA en células deficientes en CHK1 dado que con el silenciamiento de CDC45, condición donde según *Gonzalez, 2019* las barreras replicativas se revierten, continua la presencia de UR-DNA. Otro posible origen del UR-DNA es una entrada a mitosis prematura como consecuencia de una fase S que finalizó antes de que todo el ADN del genoma se haya duplicado. De hecho, las células deficientes en CHK1 muestran una activación temprana de los reguladores mitóticos CDK1 y PLK1, lo cual se asocia con un inicio prematuro de la mitosis (*Enomoto et al, 2009; Lemmens et al, 2018; Tang et al, 2006*). Este potencial inicio mitótico prematuro podría evaluarse de manera directa mediante un seguimiento *in vivo* del ciclo celular por microscopía, que nos permitiría determinar los tiempos exactos de cada fase del ciclo. De hecho, éste será uno de los próximos experimentos que abordaré en nuestro laboratorio.

El concepto de entrada a mitosis prematura y su correlación con la inestabilidad cromosómica recuerda al modelo propuesto para células deficientes en WEE1, otra de las quinasas clave en la regulación del *checkpoint* intra-S (*Duda et al, 2016*). Al igual que el silenciamiento de CHK1, el silenciamiento o inhibición de WEE1 aumenta la actividad de CDKs y acelera la entrada a mitosis. Sin embargo, existen diferencias significativas en las consecuencias de esa entrada a mitosis prematura que debemos recalcar. La entrada a mitosis prematura en células con WEE1 inhibido o silenciado produce: 1) una activación prematura de MUS81-EME1, que corta aberrante y masivamente intermediarios replicativos “sanos” que provenían de la fase S, y 2) una condensación prematura de los cromosomas. Como resultado, la entrada a mitosis prematura en células inhibidas o silenciadas en WEE1 se manifiesta como una pulverización cromosómica (*Beck et al, 2012; Duda et al, 2016*). En contraposición, en células deficiente en CHK1, la entrada a mitosis prematura no parece promover las mismas condiciones que en células deficientes en WEE1 dado que no muestran signos de pulverización cromosómica. Entonces, aunque el silenciamiento de WEE1 o CHK1 aceleren la entrada a mitosis, la causa por la cual se genera la inestabilidad cromosómica no es la misma.

3.5 El daño al ADN ocasionado por MUS81-EME1 en mitosis es el impulsor de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1

En esta tesis demostramos que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 ocurre como consecuencia de la acumulación de regiones del genoma que no terminaron de duplicarse en fase S y pasaron a mitosis (UR-DNA). La duplicación de estos UR-DNA en mitosis (MiDAS) comienza por un DSB generado por MUS81-EME1, una endonucleasa que, por lo tanto, evita errores en la segregación cromosómica y la consecuente inestabilidad cromosómica (Bergoglio et al, 2013; Minocherhomji et al, 2015). En esta tesis, observamos que en células deficientes en CHK1 hay inducción de MiDAS en conjunto con inestabilidad cromosómica, lo que implica que MiDAS no puede evitar el desarrollo de inestabilidad cromosómica en ausencia de CHK1. Además demostramos que el disparador de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 son los cortes dependientes de la endonucleasa MUS81-EME1 en los intermediarios replicativos mitóticos (**Fig. 3**). Por lo tanto, nuestros experimentos realizados en células deficientes en CHK1 revelan que MUS81-EME1 no solo es prescindible para la iniciación de MiDAS, sino que también procesa aberrantemente el UR-DNA que inició la duplicación en mitosis.

Los primeros artículos científicos que describieron a MiDAS postularon que este mecanismo recapitula el proceso de BIR (*Break Induced Replication*), un mecanismo de reparación que inicia con un corte e involucra síntesis de ADN mayoritariamente conservativa (Bhowmick et al, 2016; Minocherhomji et al, 2015; Ozer & Hickson, 2018). Sin embargo, los datos de esta tesis y los recientemente publicados en Chappidi, 2020 demuestran que MiDAS es un proceso de replicación mayoritariamente semi-conservativo. Por lo tanto, MiDAS no sería un proceso similar a BIR, a pesar del involucramiento de dos efectores moleculares de BIR (RAD52 y POLD3) (Bhowmick et al, 2016; Minocherhomji et al, 2015).

Habiendo demostrado que MiDAS es semi-conservativo e independiente del corte de MUS81-EME1 en células deficientes en CHK1, postulamos que la

síntesis en mitosis observada en células deficientes en CHK1 es simplemente la continuación de la síntesis en fase S. Las horquillas replicativas de fase S asociadas a los UR-DNA podrían transmitirse a mitosis y continuar sintetizando ADN en esta fase sin la necesidad de un corte previo. De acuerdo a esta hipótesis, los autores de *Eykelenboom, 2013* observaron que el silenciamiento de ATR (el regulador maestro de CHK1) induce la acumulación de intermediarios replicativos mitóticos que co-localizan con PCNA, la proteína que actúa a modo de abrazadera deslizante y mantiene unidas las proteínas del replisoma a la horquilla replicativa en fase S. Esto favorece nuestra observación de que la síntesis en mitosis asociada a la inhibición del *checkpoint* intra-S (células deficientes en ATR o CHK1) es una continuación de la síntesis semi-conservativa que comienza en las horquillas replicativas de fase S.

3.6 La escasez de nucleótidos atasca a los intermediarios replicativos en mitosis, los cuales son reconocidos y procesados por MUS81-EME1 en células deficientes en CHK1

Los intermediarios replicativos en fase S, es decir, las horquillas replicativas, son propensas a atascarse (frenarse y no poder avanzar en la síntesis del ADN) (Byun et al, 2005; Walter & Newport, 2000). Asimismo, las horquillas atascadas son reconocidas y cortadas, *in vitro* y en fase S, por la endonucleasa MUS81. Nosotros proponemos que los intermediarios replicativos mitóticos en células deficientes en CHK1 también podrían atascarse y ser blanco de nucleasas. Es decir, postulamos que al igual que MUS81-EME2 reconoce y corta horquillas replicativas atascadas en fase S (Techer et al, 2016), MUS81-EME1 reconoce y corta intermediarios replicativos atascados en mitosis.

¿Por qué los intermediarios replicativos en mitosis en células deficientes en CHK1 se estarían atascando? Una de las características de las células deficientes en CHK1 es que la disponibilidad de nucleótidos está restringida (Buisson et al, 2015; Gonzalez Besteiro et al, 2019; Pfister et al, 2015; Techer et al, 2016). En esta tesis demostramos que agregar nucleósidos a células deficientes en CHK1 duplica el porcentaje de metafases con MiDAS y resuelve el daño al ADN en células metafásicas, que es el inductor de la inestabilidad cromosómica. Proponemos entonces que agregar nucleósidos impide que los intermediarios replicativos en mitosis se atasquen, de manera que continúan sintetizando y no son reconocidos por MUS81-EME1 (**Fig. 3**).

Es importante aclarar que el agregado de nucleósidos a células deficientes en CHK1 también promueve la elongación de las horquillas en fase S (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Pfister et al, 2015; Techer et al, 2016). Por lo tanto, ¿por qué podemos decir que la inestabilidad cromosómica resulta de la baja disponibilidad de nucleótidos durante MiDAS y no durante la síntesis en fase S? Si la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 fuera el resultado del enlentecimiento de las horquillas replicativas, promover la elongación de las mismas debería de resolver esta inestabilidad. Sin embargo, en esta tesis demostramos que la reversión del enlentecimiento de horquillas

mediante el silenciamiento de CDC45 no resuelve la inestabilidad cromosómica. También corroboramos, con experimentos propios no publicados en esta tesis, que la inestabilidad cromosómica es independiente del enlentecimiento de horquillas utilizando otra herramienta para promover su elongación (la sobre-expresión de GFP-Pol η). Estos resultados favorecen la noción de que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 se origina por la baja disponibilidad de nucleótidos durante MiDAS, y no durante la fase S.

3.7 La inestabilidad cromosómica no es la causa de la muerte celular en células deficientes en CHK1

En esta tesis concluimos que el daño masivo al ADN en fase S producto del silenciamiento de CHK1 induce catástrofe replicativa, pero no inestabilidad cromosómica. Siendo la catástrofe replicativa una condición asociada a la muerte celular en fase S, no nos sorprendió la falta de conexión causal entre la inestabilidad cromosómica (que se manifiesta luego de la fase S) y la muerte en células deficientes en CHK1 (**Fig. 3**). Esto es particularmente llamativo ya que en células que carecen de otras proteínas de DDR, como ATR, WEE1 o ETAA1, se ha establecido que los fenotipos que nosotros disociamos de muerte celular en células deficientes en CHK1 (como las variaciones en la disponibilidad de dNTPs, el inicio temprano de la mitosis antes de que se complete la duplicación del ADN, y las anafases aberrantes) preceden a la muerte celular (Achuthankutty et al, 2019; Eykelenboom et al, 2013; Lopez-Contreras et al, 2015). Consideramos dos escenarios que podrían explicar el hecho de que la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 no induzca muerte celular. En primer lugar, las lesiones de ADN protegidas por los 53BP1-NBs podrían repararse durante la siguiente fase S (Spies et al, 2019), lo que permitiría la supervivencia celular. Sin embargo, nuestro modelo postula que no todo el UR-DNA de células deficientes en CHK1 produce 53BP1-NBs. En segundo lugar, la inestabilidad cromosómica de células deficientes en CHK1 podría ser lo suficientemente tenue como para no afectar la supervivencia celular. En este caso, la inestabilidad cromosómica podría acumularse a lo largo de las generaciones (Bizard & Hickson, 2018) y, con ella, el riesgo de morir y/o de adquirir tolerancia al tratamiento quimioterapéutico.

La tolerancia al tratamiento puede desarrollarse a partir de células tumorales que adquieren alteraciones genéticas progresivamente como consecuencia de la inestabilidad cromosómica (ver también sección 1.5.6). Sin embargo, la inestabilidad cromosómica también puede gatillar una gran cantidad de alteraciones genéticas en un único proceso mutagénico masivo llamado cromotripsis (Marcozzi et al, 2018; Rode et al, 2016). La cromotripsis, si bien se limita a uno o muy pocos cromosomas o sub-regiones cromosómicas, conduce a la generación de múltiples reordenamientos como

consecuencia de la formación de DSBs. Los fragmentos de ADN producto de estos DSBs se reparan y se unen de forma aleatoria derivando en dos posibles escenarios: 1) la célula tumoral muere a causa de la gran cantidad de alteraciones genéticas, o 2) las células que sobreviven a este evento tan drástico probablemente obtienen una gran ventaja de selección debido a su genoma muy reordenado. Varios trabajos recientes han demostrado que las anafases aberrantes y los micronúcleos (el tipo de inestabilidad cromosómica acumulada tras el silenciamiento de CHK1) gatillan estos reordenamientos cromosómicos severos y rápidos (Crasta et al, 2012; Koltsova et al, 2019; Ly & Cleveland, 2017). Por ejemplo, se postula que los micronúcleos pueden sufrir una replicación asincrónica que induzca muchos intermediarios replicativos no resueltos, que a su vez generen los DSBs que causan la cromotripsis (Crasta et al, 2012; Ly & Cleveland, 2017).

Entonces, tanto si hay eventos de cromotripsis como si las alteraciones genéticas se acumulan en el tiempo progresivamente, la inestabilidad cromosómica en una generación puede causar muerte celular en las generaciones subsiguientes. Por tanto, existe la posibilidad de que la falta de relación causal entre inestabilidad cromosómica y muerte que medimos en células deficientes en CHK1 se deba al corto tiempo transcurrido entre el silenciamiento de CHK1 y la determinación de sobrevida en nuestros experimentos. En estos experimentos a corto plazo observamos que la muerte de las células deficientes en CHK1 es consecuencia de la catástrofe replicativa. En el caso que midiéramos la sobrevida a tiempos más largos podríamos identificar dos escenarios asociados a las consecuencias de la inestabilidad cromosómica que se acumula en células deficientes en CHK1: 1) la célula tumoral muere a causa de la gran cantidad de alteraciones genéticas, o 2) la célula tumoral se “abastece” de la ventaja evolutiva obtenida por la inestabilidad cromosómica (que tiende a transformar células cancerosas en poblaciones genómicamente heterogéneas) y no muere. Cuantificar la sobrevida a largo plazo en células deficientes en CHK1 y en CDC45 respondería a esa inquietud. Como observamos en esta tesis, el silenciamiento de CDC45 revierte la muerte provocada por catástrofe replicativa, pero no la inestabilidad cromosómica. Por lo tanto, las células siCHK1-siCDC45 solo

desarrollan inestabilidad cromosómica y servirían para evaluar si esta inestabilidad induce muerte luego de un tiempo prolongado.

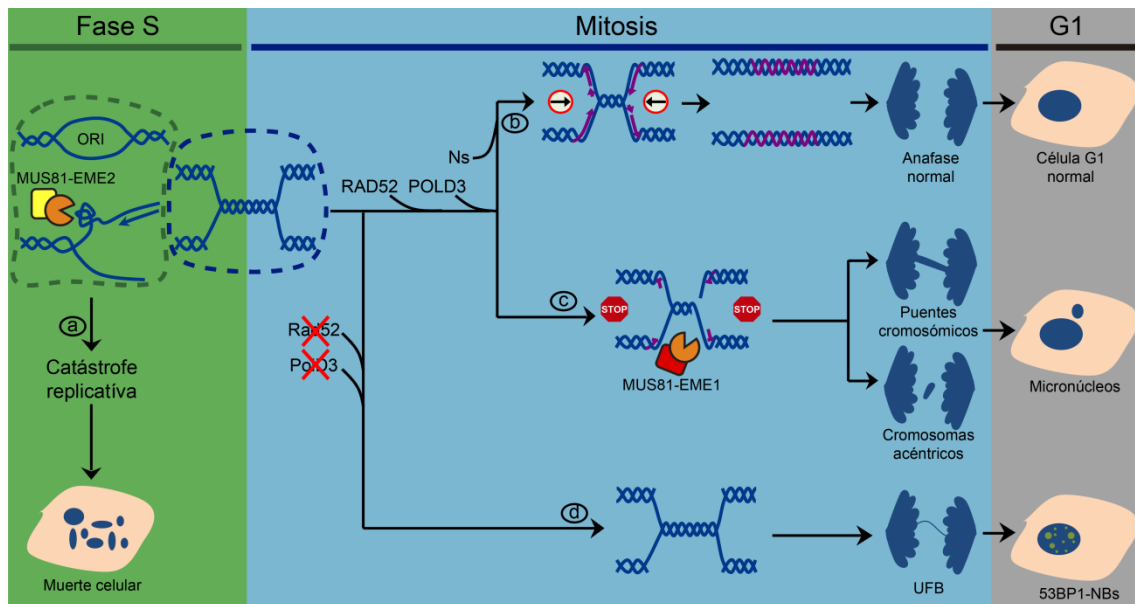


Fig. 3. Fenotipos asociados a la duplicación del ADN en células deficientes en CHK1. El silenciamiento de CHK1 desencadena inestabilidad cromosómica y muerte celular por vías independientes. Durante la fase S, el silenciamiento de CHK1 provoca disparo exacerbado de orígenes, enlentecimiento de horquillas, acumulación de barreras replicativas, y DSBs dependientes de MUS81-EME2 que culminan en muerte celular (a). Independientemente de estos fenotipos en fase S, las células deficientes en CHK1 entran en mitosis con UR-DNA, cuya duplicación se completa en esta fase solo si se suministran nucleósidos (Ns) adicionales (b). De lo contrario, la mayoría de los intermediarios replicativos en mitosis son cortados por MUS81-EME1, lo que conduce a inestabilidad cromosómica (aberraciones anafásicas y sus consecuentes micronúcleos) (c). La restricción de la síntesis de ADN en mitosis por el silenciamiento de RAD52 o POLD3 da como resultado un UR-DNA persistente que se manifiesta como UFBs en la anafase y 53BP1-NBs en las células hijas (d).

3.8 Alternativas al tratamiento oncológico con inhibidores de CHK1 y proyecciones de esta investigación

Un problema de las quimioterapias actuales es que si la célula tumoral no muere durante el tratamiento, la inestabilidad cromosómica acumulada en células viables podría proveer ulteriores ventajas al tumor, incluyendo la adaptación y la tolerancia al tratamiento (Bakhoun & Cantley, 2018; Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Targa & Rancati, 2018). Por esta razón, el desafío consiste en encontrar protocolos que induzcan muerte celular sin inestabilidad cromosómica o, alternativamente, que causen una inestabilidad cromosómica tan aguda que asegure una eficiente muerte celular. En este trabajo demostramos que la muerte celular es independiente de la inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1; esta información podría servir de precedente para el desarrollo de terapias con CHK1i que induzcan muerte celular sin conllevar el riesgo de promover la tolerancia al tratamiento. Es decir, nuestros hallazgos podrían explotarse terapéuticamente mediante la mitigación selectiva de al menos una fuente de inestabilidad cromosómica en las terapias dirigidas a CHK1.

Dos posibles maneras de evitar el desarrollo de inestabilidad cromosómica en células deficientes en CHK1 serían: 1) inhibiendo MiDAS, o 2) prolongando la mitosis de manera de crear una ventana temporal para que MiDAS finalice la duplicación del UR-DNA. La inhibición de MiDAS se podría lograr por ejemplo, mediante el uso de inhibidores de RAD52, una de las proteínas centrales de MiDAS (Sullivan et al, 2016). Sin embargo, actualmente no se encuentran inhibidores de RAD52 para ser utilizados en pacientes y se están desarrollando y evaluando distintos candidatos con diferentes eficacias y efectos adversos. Para prologar la mitosis se podrían utilizar inhibidores de CDK1 o PLK1, dos de los reguladores maestros de la mitosis (Eykelenboom et al, 2013; Schoonen et al, 2019). Dado que la acumulación de inestabilidad cromosómica está dissociada de la muerte inducida por los inhibidores de CHK1, hipotetizamos que la administración de los fármacos arriba mencionados no tendrían efectos negativos sobre la capacidad citotóxica de los inhibidores de CHK1. Cabe destacar que el inhibidor de PLK1 puede tener una mayor probabilidad de éxito dado que los inhibidores de esta quinasa tienen un

reconocido potencial como drogas oncológicas (Liu et al, 2017). En cambio, los CDK1i no son utilizados en la clínica dado el rol central en la proliferación celular que posee esta quinasa (Whittaker et al, 2017).

Como conclusión global, este trabajo desafía la visión simplista de que los defectos en el disparo de orígenes replicativos y/o en la elongación de las horquillas, las anomalías mitóticas, y las alteraciones genómicas se suceden lineal y secuencialmente antes de la muerte celular. Dado el interés clínico en el desarrollo de estrategias terapéuticas que reduzcan la inestabilidad cromosómica sin comprometer la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos, nuestro estudio proporciona una importante prueba de concepto para las terapias dirigidas contra factores de la DDR. Como describimos en la introducción, el análisis molecular del cáncer promete transformar las terapias oncológicas en un futuro cercano. Lamentablemente, existe una frustración comprensible en la sociedad por la lentitud con la cual los conocimientos sobre el cáncer se traducen en terapias efectivas. Sin embargo, existe una acumulación exponencial de conocimientos que brindan una mejor comprensión de la biología celular que regula a los tumores. Gracias a estas nuevas investigaciones se ha logrado mejorar sensiblemente la calidad de vida y la tasa de supervivencia de las personas que sufren esta enfermedad. Así pues, los supervivientes al cáncer y sus familiares han sido importantes abogados defensores de la implementación de una investigación básica y pública que busque superar los límites del conocimiento. A lo largo de este trabajo, logramos “empujar” ese límite del conocimiento. Nuestra intención es que este pequeño avance se sume a otros tantos con el fin de que este límite del conocimiento sea superado cada vez más, y que esto se traduzca en terapias oncológicas más efectivas y eficientes. El conocimiento no tiene límites, dado que la curiosidad humana es ilimitada.

4. Materiales y métodos



4.1 Cultivo Celular

Se utilizaron líneas celulares humanas provenientes de tumores. En todos los casos las líneas celulares se cultivaron en un ambiente de temperatura (37°C), atmósfera de CO₂ (5%) y humedad controladas, a bajo número de pasajes y con controles mensuales para detección de micoplasma. El DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino (Natocor)), estreptomicina (Sigma) y penicilina (Sigma) fue el medio de crecimiento utilizado para todas las líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas fueron:

- U2OS: línea celular derivada de un osteosarcoma humano. Fue obtenida de ATCC (American Type Culture Collection, número de catálogo HTB-96).
- HCT116: línea celular derivada de un adenocarcinoma colorectal humano. Fue obtenida del laboratorio del Doctor B. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, EE.UU.).
- PANC-1: línea celular derivada de un adenocarcinoma pancreático humano. Fue obtenida del laboratorio del Doctor T. Seufferlein (Department of Internal Medicine, University of Ulm, Alemania).

La mayoría de los experimentos se realizaron en placas de 12 o 24 pocillos. En cada experimento se plaqueó una cantidad de células tal de manera de alcanzar una confluencia de entre 80 y 90% (crecimiento exponencial) al momento de finalizar el ensayo. Las transfecciones se realizaron 24 hs post-plaqueo con una confluencia de entre el 50 y 60%. Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células se plaquearon en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro previamente esterilizados.

4.2 Silenciamiento génico

4.2.1 Transfección con siRNA

La transfección con siRNA se realizó 24 hs post-plaqueo y, excepto en los experimentos de sobrevida (que finalizaron a las 120 hs), los ensayos finalizaron a las 48 hs o 72 hs post-transfección (Gonzalez Besteiro et al, 2019;

Mansilla et al, 2016; Vallergera et al, 2015). Se utilizaron los siRNAs (Dharmacon o Eurofins Genomics) en las concentraciones finales detalladas en la **Tabla 1**. Para todos los experimentos de transfección con siRNA se utilizó JetPrime Transfection Reagent y JetPrime Transfection Buffer (Polyplus Transfection) siguiendo las instrucciones del fabricante.

siRNA	Secuencia target (5' a 3')	Concentración (nM)	Referencia
siLuc	CGUACGCGGAUACUUCGA	100	(Speroni et al, 2012)
siCHK1	GAAGCAGUCGCAGUGAAGA	100	(Speroni et al, 2012)
siCDC45	GCAAGACAAGATCACTCAA	10 y 5*	(Gonzalez Besteiro et al, 2019)
siMus81	CAGCCCUUGGUGGAUCGAUA	100	(Pepe & West, 2014)
siEme1	GCUAAGCAGUGAAAGUGA	100	(Naim et al, 2013)
siEme1#2	GCUCAAAGGCUUACAUGUA	100	(Naim et al, 2013)
siEme2	GCGAGCCAGUGGCAAGAG	100	(Pepe & West, 2014)
siEme2#2	UGGAGCCCGAGGAGUUUCU	100	(Pepe & West, 2014)
siRad52	GGAGUGACUCAAGAAUUA	100	(Bhowmick et al, 2016)
siPolD3	GAUAGUGAAGAGGAGCUUA	50	(Kim et al, 2013)
siSLX4	GGAGAAGGAAGCAGAGAAU	100	(Wilson et al, 2013)

Tabla 1. siRNAs utilizados en este trabajo. *10 nM en U2OS y PANC-1, 5 nM en HCT116.

4.2.2 Transducción con shRNA

El silenciamiento por shRNA se realizó por transducción con lentivirus que expresan el shRNA específico para CHK1 (shCHK1) o el shRNA control (shScramble o shSCR). Para obtener lentivirus que expresen shRNA, es necesario clonar las secuencias shCHK1 y shSCR dentro del vector de clonado y expresión lentiviral pLKO.1. El vector control pLKO.1-shSCR fue donado por el laboratorio del doctor Gastón Soria (Centro de Investigaciones en Bioquímica e Inmunología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). El vector pLKO.1-shCHK1 se obtuvo por clonado del inserto que contiene la secuencia codificante para el shCHK1 en el vector pLKO.1 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuencia target del shCHK1 es 5'-GTGGTTTATCTGCAATGGTATT-3' (Gonzalez Besteiro et al, 2019).

Las partículas lentivirales se obtuvieron por transfección de células HEK293T con el plásmido pLKO.1-shCHK1/shSCR y los plásmidos psPAX2 (expresa las proteínas de replicación y regulación viral Gag, Pol, Rev y Tat) y pMD2.G (expresa las proteínas estructurales de envoltura viral VSV-G) (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Mansilla et al, 2016). Los plásmidos se

transfectaron con JetPrime en una relación 1:1:5 (pLKO.1: psPAX2: pMD2.G, usando 1 µg de pLKO.1-shCHK1/shSCR). Los lentivirus tienen un ciclo de replicación lítico, el cual implica destrucción de la célula transfectada y liberación de las partículas virales producidas; el sobrenadante con partículas virales se cosechó 48 hs después de la transfección.

Para la transducción, se preparó una mezcla de infección con DMEM-SFB 10%, polibreno (8 µg/ml) y el medio cosechado conteniendo los lentivirus. El medio de las células se reemplazó con esta mezcla de transducción. Pasadas las 16 hs se cambió el medio por DMEM-SFB 10% fresco. La cantidad de medio cosechado a utilizar se determinó en función de la capacidad de volúmenes crecientes del medio cosechado de reducir la expresión de CHK1: se utilizó de tal modo que se utilice el volumen mínimo suficiente para silenciar completamente a CHK1.

4.3 Western-Blot

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 48 hs post-transfección se obtuvieron los extractos proteicos totales por lisis directa de las células en buffer Laemmli (60mM Tris-HCL pH:6.8, Glicerol 5%, SDS 2%, 100mM DTT, 0.3mM Azul de Bromofenol). Las fracciones cromatínicas se obtuvieron después de una extracción sobre hielo por 1 min con buffer CSK (10 mM Pipes pH 7.5, 100 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl₂) conteniendo tritón X-100 0.1%. En todos los casos, las muestras se expusieron a 99°C durante 8 min para completar la desnaturalización proteica y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 150 V durante 3 hs. La transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa se realizó con amperaje constante a 15 V por 3 hs. Las membranas se bloquearon con leche descremada y se incubaron 16 hs a 4°C con los anticuerpos primarios (ver **Tabla 2**). Luego se lavaron con PBS-Tween 0.1% tres veces 10 min cada vez y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (ver **Tabla 2**) (Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo secundario se lavó con PBS-Tween 0.1% tres veces, 10 min cada vez (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Mansilla et al, 2016; Vallergera et al, 2015). Para el revelado, las membranas se incubaron con ECL (Amersham GE

Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las imágenes se adquirieron con el equipo Image QuantTM LAS4000 (GE Healthcare), que permite la captura y cuantificación de imágenes de Western-blot dentro de un rango lineal.

Anticuerpo	Dilución	Fabricante	Nº de catalogo
α -CHK1	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-8408
α - γ H2AX	1:4000	Millipore	05-636
α -pKAP1 s824	1:4000	Bethyl Laboratories	A300-767A
α -MUS81	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-53382
α -CDC45	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-20685
α -KAP1	1:4000	Bethyl Laboratories	A300-274A
α -pRPA s4/8	1:8000	Bethyl Laboratories	A300-245A
α -H2B	1:2000	Santa Cruz Biotechnology	sc-515808
α -ACTINA	1:20000	Sigma	A2066
α -ratón-HRP	1:10000	Jackson ImmunoResearch	705-035-003
α -conejo-HRP	1:10000	Jackson ImmunoResearch	711-035-152

Tabla 2. Anticuerpos para Western-blot utilizados en este trabajo.

4.4 PCR en tiempo real (qPCR)

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 48 hs post-transfección, se lisó y extrajo el ARN total con TRIzol (Invitrogen) (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Vallergera et al, 2015). Para la retrotranscripción de los ARNm (ARN mensajeros) a DNAc (ADN complementario retrotranscripto) se utilizó la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen) con primers oligo-dT y 1 μ g del ARN total extraído previamente. La qPCR (del inglés, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) se realizó en el equipo Light Cycler 480 System (Roche) utilizando un par de primers específicos para el DNAc de interés (**Tabla 3**) y el kit de reacción comercial 5X Hot FIREPol EvaGreen (Solis BioDyne). El kit comercial se utilizó según las instrucciones del fabricante.

ARN mensajero	Primer Forward (5' a 3')	Primer Reverse (5' a 3')	Referencia
GAPDH	AGCCTCCCGCT TCGCTCTCT	GAGCGATGTGGCTCGGCTGG	Vallergera, 2015
Eme1	CTCATCCCTGAGGGCTAGAA	AGTTGAAA GAGTGGCGGGA	Lemacon, 2017
Eme2	AGGTGGAAGAGGCCCTGGTA	CCCTGCTGTGCAGAAGGAGA	Diseño propio
PolD3	ACCTC CTTCTGTCAAGAGCT	CAGGATTCACTCTCGTAGACT	Diseño propio
Rad52	ACAGCGTTTGCCACCAGAA	ATGAGATTCCCAGTTTCCTGT	Diseño propio
SLX4	AGTCGTGCTGTGTCACTTA	CCTGTAGTCCCAGCTATCT	Diseño propio

Tabla 3. Primers para qPCR utilizados en este trabajo.

4.5 Ensayos de inmunofluorescencia

Las células se plaquearon en placas de 24 pocillos. 48 hs post-transfección (o 72 hs solo para los ensayos de detección de γ H2AX en células mitóticas), las células se fijaron con PFA/Sacarosa 2% por 15 min. Luego se permeabilizó con PBS-Tritón X-100 0.1% por 15 min a 4°C y se bloqueó con PBS-Suero de burro 2.5% a 4°C durante 16 hs. La incubación con el anticuerpo primario se realizó invirtiendo el cubreobjetos sobre una gota de 25 μ l del anticuerpo diluido en PBS-Tween 0.05% en ambiente húmedo. Luego de una hora de incubación se retiró el exceso de anticuerpo con tres lavados de PBS-Tween 0.05%, de 10 min cada uno. La incubación con, y los lavados de, los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos se realizó de la misma manera que con los anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos utilizados se encuentran detallados en la **Tabla 4**. Los núcleos se tiñeron con el colorante para ADN inespecífico DAPI (Sigma) durante 20 min, y se procedió al montaje de los vidrios sobre un portaobjetos con el medio de montaje Mowiol 4-88 (Calbiochem) (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Mansilla et al, 2016).

La detección del análogo de nucleósidos EdU (Mansilla et al, 2016), usada para descartar la células en fase S en el experimento de detección de 53BP1-NBs en G1, se realizó con el kit Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging (Life Technologies) exactamente según lo indica el fabricante.

Las imágenes de células en interfase se adquirieron con el microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver 3. Las imágenes de células mitóticas se adquirieron con el microscopio confocal Zeiss LSM 880 por Z-stack. Las imágenes capturadas fueron procesadas y/o cuantificadas (según el caso) con el software ImageJ y CellProfiler, respectivamente.

Anticuerpo	Dilución	Fabricante	Nº de catalogo
α - γ H2AX	1:1000	Millipore	05-636
α -FANCD2	1:500	Novus	NB100-182
α -53BP1	1:1500	Santa Cruz Biotechnology	sc-22760
α -PICH	1:100	Abnova	H00054821-B01P
α -ratón-488	1:200	Molecular Probes	A21202
α -conejo-488	1:200	Molecular Probes	A21206
α -conejo-546	1:200	Molecular Probes	A11035

Tabla 4. Anticuerpos para inmunofluorescencia utilizados en este trabajo.

4.6 Ensayo de extensión de fibra de ADN

El ensayo de extensión de fibras de ADN es utilizado para visualizar, de manera individual, a las horquillas replicativas. Visualizar a las horquillas nos permite identificar y cuantificar, entre otros parámetros, el porcentaje de horquillas que iniciaron la síntesis en el tiempo del experimento (porcentaje de orígenes replicativos activos) y el trecho de ADN sintetizado por cada horquilla (elongación de horquillas). Las horquillas replicativas pueden visualizarse gracias a la incorporación de los análogos de timidina clorodeoxiuridina (CldU) e iododeoxiuridina (IdU) que son revelados por anticuerpos fluorescentes específicos para cada análogo. Las horquillas se clasifican en 3 grupos dependiendo de la etapa en la que se encuentra cada una: inicio (cuando el origen replicativo se activa), duplicación en curso, y terminación (cuando converge con otra horquilla). En células eucariotas en fase S hay una gran cantidad de horquillas replicativas que están sintetizando a la vez. Sin embargo, no todas las horquillas replicativas inician la síntesis del ADN al unísono. Por lo tanto, en un período de tiempo determinado, algunas horquillas pueden estar iniciando la síntesis, otras terminándola y otras continuando su duplicación del ADN. Para determinar la etapa en la que se encuentra cada horquilla es que el ensayo de extensión de fibras de ADN utiliza dos análogos de nucleósidos y no solo uno. La incorporación secuencial de dos análogos, y su posterior revelado por inmunofluorescencia, produce fibras con determinados patrones de colores que definen la etapa en la cual se encuentra cada una de ellas (**Fig. 4.1**). Si el primer análogo se revela en verde y el segundo análogo en rojo, los patrones de fibras rojo o rojo-verde-rojo representarán a orígenes replicativos que se activaron durante el segundo o primer pulso, respectivamente. El porcentaje de disparo de orígenes se calcula relativizando el número de fibras con patrones rojo y rojo-verde-rojo al total de fibras (suma de todos los patrones posibles).

El ensayo de extensión de fibras de ADN también puede utilizarse para medir la velocidad de síntesis de ADN en cada horquilla. En este caso nos concentramos en las fibras bi-colores correspondientes a las horquillas que venían avanzando al incorporar el primer análogo (CldU) y siguieron avanzando cuando se incorporó el segundo análogo (IdU) –horquillas en curso

que ni iniciaron la síntesis, ni la terminaron durante el tiempo que duró el experimento– (**Fig. 4.1**). Para calcular la velocidad de síntesis, se midió el largo del segundo color (en μm), que es proporcional al trecho de ADN sintetizado (en pares de bases), y se lo relativizó al tiempo durante el cual se incorporó el segundo análogo (IdU) (**Fig. 4.2A**).

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 48 hs post-transfección, las células se incubaron durante 20 min con CldU 20 μM . Seguidamente se realizó una incubación de 20 min con IdU 200 μM . Posteriormente, las células se tripsinizaron y resuspendieron en PBS. Con cámara de Neubauer se cuantificaron las células y se definió la dilución a realizar para obtener 1200 células/ μl . ~2500 células (2 μl) fueron incubadas sobre un portaobjetos con 6 μl de buffer de lisis (0.5% SDS, 200mM Tris-HCL pH: 7.4 y 50mM EDTA) por 5 min. El ADN se “estiró” mediante la inclinación del portaobjeto a 30° de forma que la gota con las células lisadas corriera lentamente hacia el extremo inferior del portaobjetos (**Fig. 4.2**) (Gonzalez Besteiro et al, 2019; Mansilla et al, 2016; Vallergera et al, 2015). Luego de que la gota (y el rastro que dejó en su camino) se hubo secado a temperatura ambiente, el portaobjetos se sumergió durante 5 min en solución de metanol: ácido acético 3:1 para fijar el ADN al vidrio.

Previo a la inmunotinción, las fibras de ADN fueron desnaturalizadas con HCL 2.5N durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó el excedente del ácido con PBS y se sumergió el vidrio en una solución de bloqueo (PBS-BSA 5%) por 45 min a 37°C. Luego, los portaobjetos se incubaron en ambiente húmedo por 1 h con 60 μl de anticuerpos primarios y, posteriormente, con 60 μl de anticuerpos secundarios (el portaobjetos se invierte sobre un cubreobjetos con la solución de anticuerpos para que la misma se esparza por todo el vidrio). Los anticuerpos primarios utilizados fueron el α -BrdU que también detecta IdU (Becton Dickinson, 347580) y α -BrdU que también detecta CldU (Accurate Chemical, OBT0030); los anticuerpos secundarios fueron el α -ratón-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 715-165-150) y α -rat-488 (Invitrogen, A21208) (**Fig. 4.2**). Ambos anticuerpos primarios, al igual que ambos secundarios, se incubaron al unísono. Luego de cada incubación con anticuerpos (primero los dos primarios y luego los dos secundarios), se lavaron los vidrios con PBS-

Tween 0.05% tres veces, 10 min cada vez. Se procedió al montaje de los portaobjetos sobre un cubreobjetos con el medio de montaje Mowiol 4-88 (Calbiochem). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio Confocal Zeiss LSM 5 Pascal y las cuantificaciones se realizaron con el programa ImageJ.

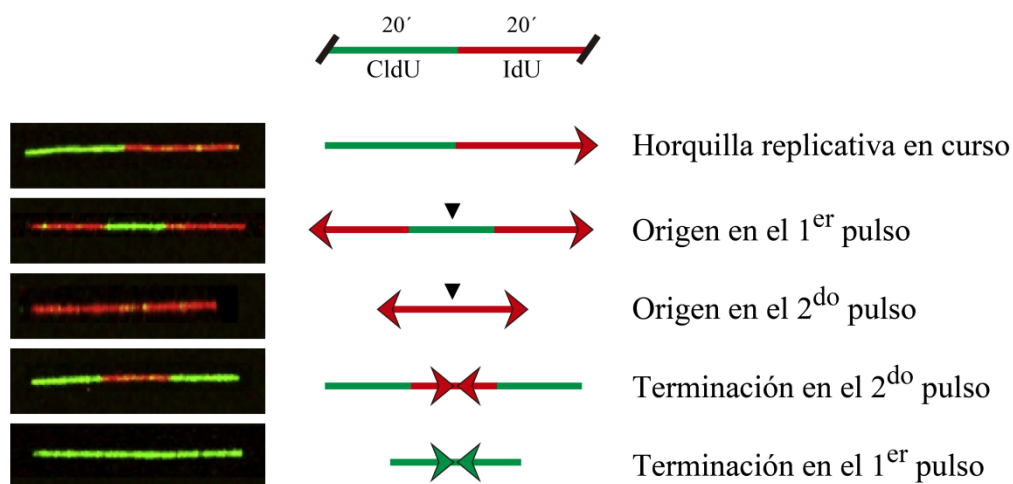


Fig. 4.1. Imágenes representativas y esquema de las fibras de ADN que se observan al microscopio de fluorescencia. Estas fibras se obtuvieron a partir de dos pulsos consecutivos (de 20 min cada uno) con los análogos de timidina CldU e IdU. En este caso revelamos al CldU con el color verde y al IdU con el rojo. La dirección de las flechas indica la dirección de síntesis y las muescas negras, el inicio de la síntesis u origen replicativo. Las horquillas replicativas en curso se ven como fibras bi-colores ya que se encuentran sintetizando ADN antes de iniciar el 1er pulso (verde) y siguen sintetizándolo al momento del 2do pulso (rojo). Los orígenes replicativos se visualizan como fibras rojas-verdes-rojas (origen en el 1er pulso) o fibras rojas (origen en el 2do pulso), dado que cada origen forma un bucle con dos horquillas que sintetizan en sentido contrario. Si el origen dispara durante el 1er pulso (verde), las dos horquillas bidireccionales comenzarán a sintetizar en el centro (origen), incorporando el primer análogo (verde) y luego avanzarán hacia los lados, incorporando el primer análogo primero (verde) y segundo análogo después (rojo). Si el origen dispara durante el 2do pulso (rojo), las dos horquillas bidireccionales avanzarán desde el centro (origen), incorporando el segundo análogo (rojo) y luego avanzarán hacia los lados, incorporando el segundo análogo también (rojo) (el color verde no se ve porque la síntesis inició luego del 1er pulso –verde– y durante el 2do –rojo–). Las terminaciones se ven como fibras verdes-rojas-verdes (terminación en 2do pulso) o fibras verdes (terminación en 1er pulso), dado que la terminación de la síntesis ocurre cuando dos horquillas que avanzan en sentido contrario se enfrentan. Si la terminación es en el 2do pulso, las dos horquillas en sentido contrario que se enfrentarán sintetizarán desde los extremos, incorporando el primer análogo (verde) y luego avanzarán hacia el centro (terminación), incorporando el primer análogo primero (verde) y segundo análogo después (rojo). Si la terminación es en el 1er pulso, las dos horquillas en sentido contrario que se enfrentarán sintetizarán desde los extremos, incorporando el primer análogo (verde) y luego avanzarán hacia el centro (terminación), incorporando el primer análogo primero (verde) (el color rojo no se ve porque la síntesis terminó durante el 1er pulso –verde–).

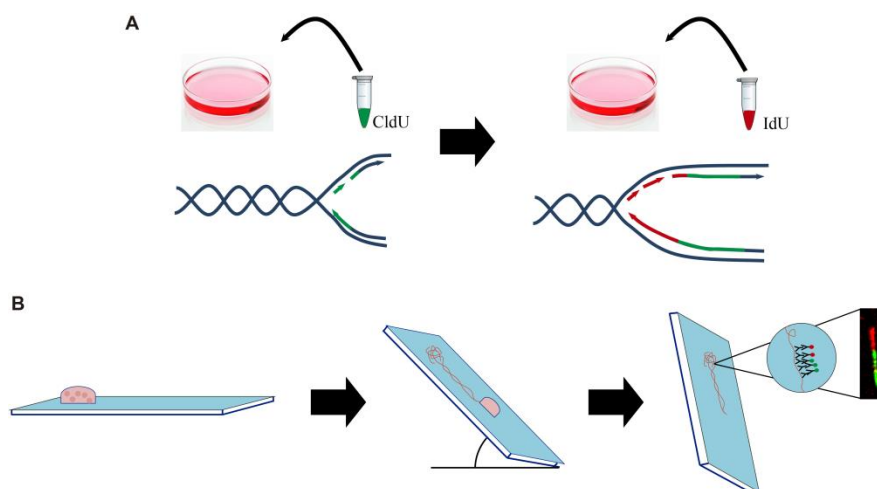


Fig. 4.2. Ensayo de extensión de fibra de ADN. **A)** El ADN sintetizándose dentro de las células se marca con CldU e IdU, dos análogos de timidina. CldU e IdU se incorporan en dos pulsos consecutivos de igual duración. **B)** Las células se tripsinizan en las placas de cultivo y se lisan sobre un portaobjetos. El portaobjetos se inclina para que la gota con las células lisadas recorra el vidrio por acción de la gravedad, de manera que las fibras de ADN se estiren. Por último, las fibras se revelan por inmunotinción con anticuerpos fluorescentes que detectan específicamente al IdU y al CldU.

4.7 Ensayo de COMETA neutro

El ensayo de COMETA permite visualizar el daño del material genético en células individuales. Según las condiciones de pH durante la lisis celular, el ensayo de COMETA se clasifica como neutro o alcalino. El ensayo de COMETA neutro detecta cortes de doble cadena de ADN (DSBs) y por esto fue utilizado en esta tesis. El experimento consiste en una corrida electroforética del ADN de células inmovilizadas en agarosa. Durante la corrida electroforética el ADN migra hacia el polo positivo en función de su grado de fragmentación: a mayor cantidad de DSBs, mayor fragmentación del ADN, y mayor su migración. Luego de la corrida electroforética el ADN nuclear adquiere una estructura que recuerda a un cometa (de allí el nombre de esta técnica), en donde la cabeza del cometa es el núcleo celular y la cola del cometa incluye los fragmentos de ADN que se desprendieron del núcleo. A mayor cantidad de DSBs, mayor fragmentación, mayor migración y, por tanto, mayor el largo de la cola del cometa (**Fig. 4.3**). Para cuantificar los DSBs calculamos el “tail moment” o “momento de la cola”. El momento de cola se calcula según la siguiente ecuación: $\text{momento de cola} = \frac{\text{largo de cola} \times \text{porcentaje de ADN en cola}}{100}$. El porcentaje de ADN en la cola es una medida de intensidad de cola que normaliza las diferencias de intensidad entre diferentes núcleos; se calcula como la relación

entre la intensidad de la cola y la intensidad de la cabeza y cola. A mayor largo e intensidad de cola, mayor “momento de cola”, es decir, mayor cantidad de DSBs.

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 48 hs post-transfección, las células se tripsinizaron y resuspendieron en una solución de PBS-agarosa de bajo punto de fusión (0.5%), de manera de inmovilizarlas. Luego se depositaron en un cubreobjetos sobre el que previamente se colocó una capa de PBS-agarosa 0.5% solidificada. La capa de agarosa conteniendo las células se cubrió con una tercera capa de PBS-agarosa 0.5%. De este modo se obtiene un portaobjetos con 3 capas de agarosa, siendo la del medio la que contiene a las células inmovilizadas. Los portaobjetos se sumergieron en un buffer de lisis a pH: 8.3 (EDTA 30 mM y SDS 0.5%) durante 30 min a 4°C con el fin de liberar el material nuclear. La corrida electroforética se realizó en buffer TBE a 17 V (7–6 mA) durante 10 min a 4°C y el ADN se tiñó con bromuro de etidio (Collins, 2004; Gonzalez Besteiro et al, 2019). La captura y el análisis de las imágenes se realizó en el microscopio Zeiss AxioObserver 3 (**Fig. 4.4**) y el plugin “OpenComet” del programa ImageJ, respectivamente.

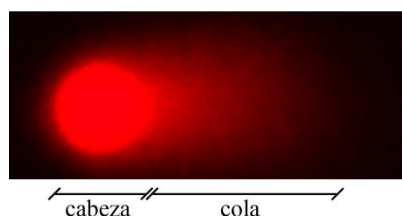


Fig. 4.3. Imagen del COMETA. El COMETA está compuesto de una cabeza (el núcleo celular) y una cola (el ADN fragmentado que se separa de la cabeza por la corrida electroforética). A mayor largo e intensidad de cola, mayor “momento de cola” y, por tanto, mayor número de fragmentos.

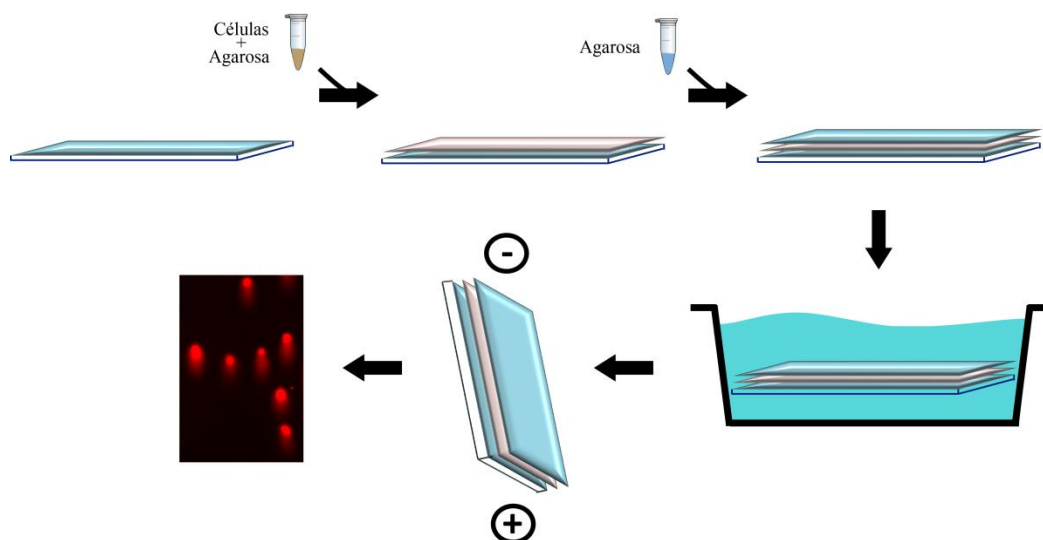


Fig. 4.4. Ensayo de COMETA neutro. La suspensión celular se inmoviliza con agarosa y se coloca sobre un portaobjetos conteniendo una capa de agarosa solidificada. Luego de solidificar la segunda capa de agarosa (con las células), se agrega una tercera capa de agarosa y se deja solidificar nuevamente. El portaobjetos con las capas de agarosa, incluyendo la del medio con las células inmovilizadas, se incuba con buffer de lisis durante 30 min. Posteriormente se hace una corrida electroforética en donde los fragmentos de ADN desprendidos del núcleo migrarán hacia el polo positivo. Finalmente, se tiñe al ADN con bromuro de etidio y se capturan las imágenes en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas son utilizadas para cuantificar el “momento de cola” con el programa ImageJ.

4.8 Ensayo de aberraciones anafásicas

Las células se plaquearon en placas de 24 pocillos. 48 hs post-transfección, las células se fijaron con PFA/Sacarosa 2% por 15 min. Luego se tiñeron los núcleos con el colorante para ADN inespecífico DAPI (Sigma) durante 20 min y se procedió al montaje de los vidrios sobre un portaobjetos con el medio de montaje Mowiol 4-88 (Calbiochem). Las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con captura en Z-stacks. Las imágenes finales se generaron con una proyección de intensidades máximas con el software Black ZEN Imaging (Zeiss).

4.9 Ensayo de micronúcleos

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 24 hs post-transfección, las células se diluyeron 1/8 y se replaquearon en placas de 24 pocillos. Esta dilución se realizó para lograr una separación entre las células lo suficientemente grande como para poder asignar los micronúcleos a una célula determinada. 24 hs luego del replaqueo se agregó citocalasina B 4.5 µg/ml (Sigma) y 36 hs más tarde las células se fijaron con PFA/Sacarosa 2% por 15

min. Los núcleos se tiñeron durante 20 min con el colorante para ADN inespecífico DAPI (Sigma) y se procedió al montaje de los vidrios sobre un portaobjetos con el medio de montaje Mowiol 4-88 (Calbiochem). La citocalasina B impide la citocinesis; por esta razón este protocolo enriquece a la población celular en células binucleares (Fuhrmann et al, 1992).. Nos concentramos en células binucleares porque estas completaron un ciclo celular completo bajo nuestro tratamiento de interés. Esto es importante porque nuestro foco son los micronúcleos formados por desprendimiento de material genético que resulte de conflictos durante la duplicación del ADN. Aquellas células binucleares que poseían al menos un micronúcleo fueron cuantificadas como positivas. Las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio Zeiss AxioObserver 3.

4.10 Ensayo para cuantificar cortes en cromosomas mitóticos

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 24 hs post-transfección, las células se trataron con colcemida 0.1 µg/ml (KaryoMAX, Invitrogen) por 24 hs para enriquecer a la población celular en células mitóticas. Las células mitóticas se colectaron y se resuspendieron e incubaron a 37°C por 5 min en una solución de KCl 75 mM, la cual maximiza la separación entre cromosomas porque aumenta el volumen celular. Las células se fijaron con una solución de metanol:ácido acético (3:1) y se esparcieron sobre un portaobjetos por goteo. El impacto de la gota contra el portaobjetos debe ser lo suficientemente fuerte como para separar las metafases entre sí pero lo suficientemente débil como para no romper los cromosomas. Los portaobjetos se secaron durante 24 hs a temperatura ambiente y los cromosomas se tiñeron con una solución de giemsa 6% (Merck) durante 2 min (Federico et al, 2016). Las imágenes de metafases y cromosomas individuales fueron adquiridas con un microscopio automatizado, Cytovision System v3.7 (Leica). Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

4.11 Ensayo para cuantificar síntesis de ADN en células mitóticas

Al igual que el protocolo de la sección 4.11, este ensayo permite visualizar MiDAS como la incorporación del análogo de timidina EdU al ADN de

una célula mitótica. Sin embargo, en este caso, el EdU se visualiza sobre una extensión de cromosomas (ver también sección 4.10), de manera que se puede identificar MiDAS en cada cromosoma. Esta individualización de los cromosomas permite identificar si la síntesis del ADN ocurre en una o ambas cromátidas del cromosoma (asociado a una síntesis conservativa o semi-conservativa respectivamente) y si hay co-localización entre los focos de EdU y los cortes en esos cromosomas.

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. Este protocolo (al igual que el de la sección 4.10) requiere sincronizar a la población celular para enriquecerla en células metafásicas (Garribba et al, 2018; Minocherhomji et al, 2015). A las 24 hs post-transfección se agregó el inhibidor de CDK1 RO-3306 10 μ M (Calbiochem) para enriquecer la población celular en células en fase G2. 20 hs después se realizaron tres lavados con PBS y se realizó un pulso de 1 h con EdU 20 μ M y colcemida 0.1 μ g/ml (KaryoMAX, Invitrogen). Retirar el inhibidor de CDK1 permite que las células “frenadas” en G2 reinicien el ciclo celular, pero el agregado de colcemida vuelve a frenar al ciclo y “atrapa” a las células en la metafase subsiguiente. La extensión de cromosomas metafásicos y la detección de EdU se realizaron tal como se describió en las secciones 4.10 y 4.11, respectivamente. A diferencia del protocolo en 4.10, los cromosomas fueron teñidos con DAPI (Sigma). Las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 880 y se procesaron con el software Black ZEN Imaging (Zeiss).

4.12 Ensayo para cuantificar síntesis de ADN en cromosomas metafásicos

Al igual que el protocolo de la sección 4.11, este ensayo permite visualizar MiDAS como la incorporación del análogo de timidina EdU al ADN de una célula mitótica. Sin embargo, en este caso, la incorporación del EdU se visualiza sobre los cromosomas metafásicos individualizados del resto. Esta individualización de los cromosomas permite identificar si la síntesis del ADN ocurre en una o ambas cromátidas del cromosoma (asociado a una síntesis conservativa o semi-conservativa respectivamente) o si hay una co-localización entre los focos de síntesis con cortes en esos cromosomas.

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. Este protocolo (al igual que el de la sección 4.10) requiere sincronizar la población celular para enriquecerla en células metafásicas (Garribba et al, 2018; Minocherhomji et al, 2015). A las 24 hs post-transfección se agregó el inhibidor de CDK1 RO-3306 10 μ M (Calbiochem) para enriquecer la población celular en células en fase G2. 20 hs después se realizaron tres lavados con PBS y se realizó un pulso de 1 h con EdU 20 μ M y colcemida 0.1 μ g/ml (KaryoMAX, Invitrogen). La colcemida permite que las células en G2 reinicien el ciclo celular y sean “atrapadas” en la metafase subsiguiente. La extensión de cromosomas metafásicos y la detección de EdU se realizaron tal como se describió en las secciones 4.10 y 4.11, respectivamente. A diferencia del protocolo en 4.10, los cromosomas fueron teñidos con DAPI (Sigma). Las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 880 y se procesaron con el software Black ZEN Imaging (Zeiss).

4.13 Ensayo de sobrevida

Las células se plaquearon en placas de 12 pocillos. 24 hs post-transfección, las células se replaquearon en placas de 96 pocillos (1.000 células por pocillo). 120 hs post-replaqueo, las células fueron fijadas dentro de los pocillos con PFA/Sacarosa 2% por 15 min. Los núcleos se tiñeron con el colorante para ADN inespecífico DAPI (Sigma) durante 20 min (Gonzalez Besteiro et al, 2019). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio automatizado InCell 2200 (GE Healthcare). Para la cuantificación de núcleos se usó el software InCell Analyzer WorkStation.

4.14 Análisis estadístico de los datos

Se utilizó el software GraphPad Prism 5 para el análisis estadístico de los datos. En los gráficos de distribución de puntos se indica la mediana con una barra negra; estos gráficos fueron analizados por ANOVA de una vía (seguido por un post-test de Bonferroni). En los gráficos de barras se graficó la media más la desviación estándar (DE); el análisis estadístico de estos datos se realizó por ANOVA de mediciones repetidas (seguido por un post-test de Newman-Keuls). En todos los gráficos, letras diferentes indican diferencias

significativas. Así por ejemplo, los datos con la letra “a” son significativamente diferentes de los datos con la letra “b”, pero ni el grupo “a” ni el “b” es significativamente diferente al grupo “ab”. Es decir, los datos son significativamente diferentes entre sí si no comparten ninguna letra. En los gráficos de distribución de puntos y gráficos de barras se consideraron $p < 0.001$ y $p < 0.01$ como significativos, respectivamente.

El número de eventos a cuantificar en cada experimento fue definido como el número mínimo de eventos que impide que el resultado final varíe. Además, este número de eventos está en el mismo rango que el “n” experimental utilizado por otros laboratorios que realizan el mismo ensayo. La mayoría de los gráficos muestran triplicados de experimentos independientes. No utilizamos ningún tipo de criterio de exclusión de datos (a excepción de experimentos que hayan tenido problemas técnicos). Finalmente, cabe aclarar que todos los eventos de las diferentes muestras cuantificadas dentro de un mismo experimento partieron de un mismo cultivo celular.

5. Bibliografía



- 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. *Genetics* **172**: 1487-1498
- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* **15**: 2177-2196
- Achuthankutty D, Thakur RS, Haahr P, Hoffmann S, Drinas AP, Bizard AH, Weischenfeldt J, Hickson ID, Mailand N (2019) Regulation of ETAA1-mediated ATR activation couples DNA replication fidelity and genome stability. *The Journal of cell biology*
- Andor N, Maley CC, Ji HP (2017) Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer research* **77**: 2179-2185
- Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M (2003) Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* **114**: 385-394
- Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type iii. *The Journal of experimental medicine* **79**: 137-158
- Bailey SM, Cornforth MN, Ullrich RL, Goodwin EH (2004) Dysfunctional mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks. *DNA repair* **3**: 349-357
- Bakhoun SF, Cantley LC (2018) The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell* **174**: 1347-1360
- Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 792-804
- Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell* **3**: 421-429
- Bayani J, Paderova J, Murphy J, Rosen B, Zielenska M, Squire JA (2008) Distinct patterns of structural and numerical chromosomal instability characterize sporadic ovarian cancer. *Neoplasia* **10**: 1057-1065
- Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, Squire JA (2007) Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Seminars in cancer biology* **17**: 5-18
- Beck H, Nahse-Kumpf V, Larsen MS, O'Hanlon KA, Patzke S, Holmberg C, Mejlvang J, Groth A, Nielsen O, Syljuasen RG, Sorensen CS (2012) Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption. *Mol Cell Biol* **32**: 4226-4236
- Bergoglio V, Boyer AS, Walsh E, Naim V, Legube G, Lee MY, Rey L, Rosselli F, Cazaux C, Eckert KA, Hoffmann JS (2013) DNA synthesis by Pol eta promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *The Journal of cell biology* **201**: 395-408
- Berti M, Cortez D, Lopes M (2020) The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nature reviews Molecular cell biology* **21**: 633-651
- Bhowmick R, Hickson ID (2017) The "enemies within": regions of the genome that are inherently difficult to replicate. *F1000Res* **6**: 666
- Bhowmick R, Minocherhomji S, Hickson ID (2016) RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Molecular cell* **64**: 1117-1126
- Bizard AH, Hickson ID (2018) Anaphase: a fortune-teller of genomic instability. *Current opinion in cell biology* **52**: 112-119
- Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA (2011) How dormant origins promote complete genome replication. *Trends in biochemical sciences* **36**: 405-414
- Bohly N, Kistner M, Bastians H (2019) Mild replication stress causes aneuploidy by deregulating microtubule dynamics in mitosis. *Cell cycle* **18**: 2770-2783
- Bonner MK, Haase J, Swinderman J, Halas H, Miller Jenkins LM, Kelly AE (2019) Enrichment of Aurora B kinase at the inner kinetochore controls outer kinetochore assembly. *The Journal of cell biology* **218**: 3237-3257
- Brandsma I, Fleuren EDG, Williamson CT, Lord CJ (2017) Directing the use of DDR kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert opinion on investigational drugs* **26**: 1341-1355
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 297-308

- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 208-219
- Buisson R, Boisvert JL, Benes CH, Zou L (2015) Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Molecular cell* **59**: 1011-1024
- Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, Groth P, Weller MC, Shaikh N, Domingo E, Kanu N, Dewhurst SM, Gronroos E, Chew SK, Rowan AJ, Schenk A, Sheffer M, Howell M, Kschischo M, Behrens A, Helleday T, Bartek J, Tomlinson IP, Swanton C (2013) Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* **494**: 492-496
- 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. *Genes & development* **19**: 1040-1052
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in cell biology* **9**: M57-60
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**: 300-303
- 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. *Genes & development* **19**: 1905-1919
- Ciccio A, Constantinou A, West SC (2003) Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *The Journal of biological chemistry* **278**: 25172-25178
- Ciccio A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* **40**: 179-204
- Ciccio A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, Laghmani el H, Joenje H, McDonald N, de Winter JP, Wang W, West SC (2007) Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Molecular cell* **25**: 331-343
- Ciccio A, McDonald N, West SC (2008) Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annual review of biochemistry* **77**: 259-287
- Cleaver JE (2011) gammaH2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". *Photochem Photobiol* **87**: 1230-1239
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* **26**: 249-261
- Cooper GM, Brudno M, Stone EA, Dubchak I, Batzoglou S, Sidow A (2004) Characterization of evolutionary rates and constraints in three Mammalian genomes. *Genome research* **14**: 539-548
- Cortez D (2015) Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA repair*
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ (2001) ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**: 1713-1716
- Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D, Pellman D (2012) DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* **482**: 53-58
- Crow JF (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature reviews Genetics* **1**: 40-47
- Chan KL, North PS, Hickson ID (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *The EMBO journal* **26**: 3397-3409
- Chappidi N, Nascakova Z, Boleslavskaya B, Zellweger R, Isik E, Andrs M, Menon S, Dobrovolna J, Balbo Pogliano C, Matos J, Porro A, Lopes M, Janscak P (2020) Fork Cleavage-Religation Cycle and Active Transcription Mediate Replication Restart after Fork Stalling at Co-transcriptional R-Loops. *Molecular cell* **77**: 528-541 e528
- Chargaff E, Lipshitz R, Green C, Hodes ME (1951) The composition of the deoxyribonucleic acid of salmon sperm. *The Journal of biological chemistry* **192**: 223-230
- Chini CC, Wood J, Chen J (2006) Chk1 is required to maintain clasp stability. *Oncogene* **25**: 4165-4171
- Dagogo-Jack I, Shaw AT (2018) Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature reviews Clinical oncology* **15**: 81-94
- Dehe PM, Gaillard PHL (2017) Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nature reviews Molecular cell biology* **18**: 315-330

- Dent P (2019) Investigational CHK1 inhibitors in early phase clinical trials for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs* **28**: 1095-1100
- Di Marco S, Hasanova Z, Kanagaraj R, Chappidi N, Altmannova V, Menon S, Sedlackova H, Langhoff J, Surendranath K, Huhn D, Bhowmick R, Marini V, Ferrari S, Hickson ID, Krejci L, Janscak P (2017) RECQ5 Helicase Cooperates with MUS81 Endonuclease in Processing Stalled Replication Forks at Common Fragile Sites during Mitosis. *Molecular cell* **66**: 658-671 e658
- Dillingham MS (2006) Replicative helicases: a staircase with a twist. *Current biology* : CB **16**: R844-847
- Ditano JP, Eastman A (2021) Comparative Activity and Off-Target Effects in Cells of the CHK1 Inhibitors MK-8776, SRA737, and LY2606368. *ACS pharmacology & translational science* **4**: 730-743
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS (2003) Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology* **161**: 267-280
- Dobbelstein M, Sorensen CS (2015) Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nature reviews Drug discovery* **14**: 405-423
- Duda H, Arter M, Gloggnitzer J, Teloni F, Wild P, Blanco MG, Altmeyer M, Matos J (2016) A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Dev Cell* **39**: 740-755
- Durkin SG, Glover TW (2007) Chromosome fragile sites. *Annual review of genetics* **41**: 169-192
- Ekundayo B, Bleichert F (2019) Origins of DNA replication. *PLoS genetics* **15**: e1008320
- Elbaek CR, Petrosius V, Sorensen CS (2020) WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry. *Mutation research* **819-820**: 111694
- Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M (2009) Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *The Journal of biological chemistry* **284**: 34223-34230
- Eykelenboom JK, Harte EC, Canavan L, Pastor-Peidro A, Calvo-Asensio I, Llorens-Agost M, Lowndes NF (2013) ATR activates the S-M checkpoint during unperturbed growth to ensure sufficient replication prior to mitotic onset. *Cell Rep* **5**: 1095-1107
- Falquet B, Rass U (2019) Structure-Specific Endonucleases and the Resolution of Chromosome Underreplication. *Genes* **10**
- Falzone L, Salomone S, Libra M (2018) Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in pharmacology* **9**: 1300
- Federico MB, Vallerger MB, Radl A, Paviolo NS, Bocco JL, Di Giorgio M, Soria G, Gottifredi V (2016) Chromosomal Integrity after UV Irradiation Requires FANCD2-Mediated Repair of Double Strand Breaks. *PLoS genetics* **12**: e1005792
- Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, Smythe C (2001) Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *The Journal of cell biology* **154**: 913-923
- Fernandez-Vidal A, Vignard J, Mirey G (2017) Around and beyond 53BP1 Nuclear Bodies. *Int J Mol Sci* **18**
- Forment JV, O'Connor MJ (2018) Targeting the replication stress response in cancer. *Pharmacol Ther* **188**: 155-167
- Fragkos M, Ganier O, Coulombe P, Mechali M (2015) DNA replication origin activation in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology* **16**: 360-374
- Franchet C, Hoffmann JS (2019) When RAD52 Allows Mitosis to Accept Unscheduled DNA Synthesis. *Cancers* **12**
- Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD (2006) DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA repair* **5**: 986-996
- Fuhrmann C, Streffer C, Muller WU, Becker U (1992) Micronucleus assay prediction and application optimized by cytochalasin B-induced binucleated tumor cells. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]* **168**: 603-609
- Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A (2015) Replication stress and cancer. *Nature reviews Cancer* **15**: 276-289
- Garribba L, Wu W, Ozer O, Bhowmick R, Hickson ID, Liu Y (2018) Inducing and Detecting Mitotic DNA Synthesis at Difficult-to-Replicate Loci. *Methods in enzymology* **601**: 45-58
- Ge XQ, Jackson DA, Blow JJ (2007) Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes & development* **21**: 3331-3341

- Gemble S, Buhagiar-Labarchede G, Onclercq-Delic R, Biard D, Lambert S, Amor-Gueret M (2016) A balanced pyrimidine pool is required for optimal Chk1 activation to prevent ultrafine anaphase bridge formation. *J Cell Sci* **129**: 3167-3177
- Gisselsson D (2008) Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma* **117**: 511-519
- Gonzalez Besteiro MA, Calzetta NL, Loureiro SM, Habib M, Betous R, Pillaire MJ, Maffia A, Sabbioneda S, Hoffmann JS, Gottifredi V (2019) Chk1 loss creates replication barriers that compromise cell survival independently of excess origin firing. *The EMBO journal* **38**: e101284
- Gonzalez Besteiro MA, Gottifredi V (2015) The fork and the kinase: a DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res* **763**: 168-180
- Gottifredi V, Karni-Schmidt O, Shieh SS, Prives C (2001) p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **21**: 1066-1076
- Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *The EMBO journal* **11**: 3995-4005
- Gurden MD, Anderhub SJ, Faisal A, Linardopoulos S (2018) Aurora B prevents premature removal of spindle assembly checkpoint proteins from the kinetochore: A key role for Aurora B in mitosis. *Oncotarget* **9**: 19525-19542
- Hamperl S, Bocek MJ, Saldivar JC, Swigut T, Cimprich KA (2017) Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. *Cell* **170**: 774-786 e719
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
- Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A (2013) Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology* **23**: 345-356
- Harrigan JA, Belotserkovskaya R, Coates J, Dimitrova DS, Polo SE, Bradshaw CR, Fraser P, Jackson SP (2011) Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *The Journal of cell biology* **193**: 97-108
- Hartwell L (2018) *Genetics: From Genes to Genomes*, Vol. 6, 6 edn.: Mc Graw Hill.
- Hoffelder DR, Luo L, Burke NA, Watkins SC, Gollin SM, Saunders WS (2004) Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* **112**: 389-397
- Ibarra A, Schwob E, Mendez J (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 8956-8961
- Indiani C, O'Donnell M (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 751-761
- 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. *The Journal of cell biology* **140**: 1285-1295
- Jain R, Aggarwal AK, Rechkoblit O (2018) Eukaryotic DNA polymerases. *Current opinion in structural biology* **53**: 77-87
- Johnson RE, Prakash S, Prakash L (1999) Requirement of DNA polymerase activity of yeast Rad30 protein for its biological function. *The Journal of biological chemistry* **274**: 15975-15977
- Kasahara K, Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kiyono T, Inagaki M (2010) 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *The EMBO journal* **29**: 2802-2812
- Kim MS, Machida Y, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Pang YP, Machida YJ (2013) Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. *Nucleic Acids Res* **41**: 1661-1668
- King C, Diaz HB, McNeely S, Barnard D, Dempsey J, Blosser W, Beckmann R, Barda D, Marshall MS (2015) LY2606368 Causes Replication Catastrophe and Antitumor Effects through CHK1-Dependent Mechanisms. *Molecular cancer therapeutics* **14**: 2004-2013
- Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y (2018) DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer science* **109**: 264-271
- Kohn EA, Yoo CJ, Eastman A (2003) The protein kinase C inhibitor Go6976 is a potent inhibitor of DNA damage-induced S and G2 cell cycle checkpoints. *Cancer research* **63**: 31-35
- Koltsova AS, Pendina AA, Efimova OA, Chiryaeva OG, Kuznetsova TV, Baranov VS (2019) On the Complexity of Mechanisms and Consequences of Chromothripsis: An Update. *Frontiers in genetics* **10**: 393

- Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews Cancer* **5**: 773-785
- Kornberg A (1960) Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* **131**: 1503-1508
- Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-871
- Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**: 285-294
- Krenn V, Musacchio A (2015) The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Frontiers in oncology* **5**: 225
- Kumagai A, Dunphy WG (2003) Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nature cell biology* **5**: 161-165
- Lai X, Broderick R, Bergoglio V, Zimmer J, Badie S, Niedzwiedz W, Hoffmann JS, Tarsounas M (2017) MUS81 nuclease activity is essential for replication stress tolerance and chromosome segregation in BRCA2-deficient cells. *Nat Commun* **8**: 15983
- Lange A, Prenzler A, Frank M, Golpon H, Welte T, von der Schulenburg JM (2014) A systematic review of the cost-effectiveness of targeted therapies for metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC pulmonary medicine* **14**: 192
- Lehmann AR, Niimi A, Ogi T, Brown S, Sabbioneda S, Wing JF, Kannouche PL, Green CM (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA repair* **6**: 891-899
- Lemmens B, Hegarat N, Akopyan K, Sala-Gaston J, Bartek J, Hochegger H, Lindqvist A (2018) DNA Replication Determines Timing of Mitosis by Restricting CDK1 and PLK1 Activation. *Molecular cell* **71**: 117-128 e113
- Lemmens B, Lindqvist A (2019) DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *The Journal of cell biology* **218**: 3892-3902
- Lepage CC, Morden CR, Palmer MCL, Nachtigal MW, McManus KJ (2019) Detecting Chromosome Instability in Cancer: Approaches to Resolve Cell-to-Cell Heterogeneity. *Cancers* **11**
- Lezaja A, Altmeyer M (2021) Dealing with DNA lesions: When one cell cycle is not enough. *Current opinion in cell biology* **70**: 27-36
- Lim S, Kaldis P (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**: 3079-3093
- Lindsey-Boltz LA, Sercin O, Choi JH, Sancar A (2009) Reconstitution of human claspin-mediated phosphorylation of Chk1 by the ATR (ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related) checkpoint kinase. *The Journal of biological chemistry* **284**: 33107-33114
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & development* **14**: 1448-1459
- Liu Z, Sun Q, Wang X (2017) PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol* **10**: 22-32
- Lopez-Contreras AJ, Specks J, Barlow JH, Ambrogio C, Desler C, Vikingsson S, Rodrigo-Perez S, Green H, Rasmussen LJ, Murga M, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O (2015) Increased Rrm2 gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice. *Genes & development* **29**: 690-695
- Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS, Grofte M, Chan KL, Hickson ID, Bartek J, Lukas J (2011) 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nature cell biology* **13**: 243-253
- Ly P, Cleveland DW (2017) Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. *Trends in cell biology* **27**: 917-930
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**: 1425-1429
- Malhotra V, Perry MC (2003) Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer biology & therapy* **2**: S2-4
- Mansilla SF, Bertolin AP, Bergoglio V, Pillaire MJ, Gonzalez Besteiro MA, Luzzani C, Miriuka SG, Cazaux C, Hoffmann JS, Gottifredi V (2016) Cyclin Kinase-independent role of p21CDKN1A in the promotion of nascent DNA elongation in unstressed cells. *eLife* **5**
- Marcozzi A, Pellestor F, Kloosterman WP (2018) The Genomic Characteristics and Origin of Chromothripsis. *Methods in molecular biology* **1769**: 3-19

- Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annual review of biochemistry* **79**: 89-130
- Matos J, Blanco MG, Maslen S, Skehel JM, West SC (2011) Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell* **147**: 158-172
- Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DA, Caldecott KW, Jackson DA (2007) Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *The EMBO journal* **26**: 2719-2731
- McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, Pamidi A, Migon E, Matysiak-Zablocki E, Moynahan ME, Essers J, Hanada K, Poonepalli A, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Kanaar R, Jasin M, Hande MP, Hakem R (2004) Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science* **304**: 1822-1826
- Meacham CE, Morrison SJ (2013) Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**: 328-337
- Meselson M, Stahl FW (1958) The Replication of DNA in Escherichia Coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**: 671-682
- Miao H, Seiler JA, Burhans WC (2003) Regulation of cellular and SV40 virus origins of replication by Chk1-dependent intrinsic and UVC radiation-induced checkpoints. *The Journal of biological chemistry* **278**: 4295-4304
- Minchom A, Aversa C, Lopez J (2018) Dancing with the DNA damage response: next-generation anti-cancer therapeutic strategies. *Therapeutic advances in medical oncology* **10**: 1758835918786658
- Minocherhomji S, Ying S, Bjerregaard VA, Bursomanno S, Aleliunaite A, Wu W, Mankouri HW, Shen H, Liu Y, Hickson ID (2015) Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* **528**: 286-290
- Mirkin SM (2006) DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Current opinion in structural biology* **16**: 351-358
- Moiseeva TN, Yin Y, Calderon MJ, Qian C, Schamus-Haynes S, Sugitani N, Osmanbeyoglu HU, Rothenberg E, Watkins SC, Bakkenist CJ (2019) An ATR and CHK1 kinase signaling mechanism that limits origin firing during unperturbed DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 13374-13383
- Moreno A, Carrington JT, Albergante L, Al Mamun M, Haagensen EJ, Komseli ES, Gorgoulis VG, Newman TJ, Blow JJ (2016) Unreplicated DNA remaining from unperturbed S phases passes through mitosis for resolution in daughter cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: E5757-5764
- Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology* **13**: 261-291
- Mott ML, Berger JM (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nature reviews Microbiology* **5**: 343-354
- Murfun I, Basile G, Subramanyam S, Malacaria E, Bignami M, Spies M, Franchitto A, Pichierri P (2013) Survival of the replication checkpoint deficient cells requires MUS81-RAD52 function. *PLoS genetics* **9**: e1003910
- Murray A (1994) Cell cycle checkpoints. *Current opinion in cell biology* **6**: 872-876
- Naim V, Wilhelm T, Debatisse M, Rosselli F (2013) ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nature cell biology* **15**: 1008-1015
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-28
- O'Donnell M (2006) Replisome architecture and dynamics in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **281**: 10653-10656
- O'Donnell M, Langston L, Stillman B (2013) Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**
- Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sugino A (1968) Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **59**: 598-605
- Olive PL, Banath JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**: 23-29
- Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP (2012) Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* **2012**: 238731
- Ozer O, Bhowmick R, Liu Y, Hickson ID (2018) Human cancer cells utilize mitotic DNA synthesis to resist replication stress at telomeres regardless of their telomere maintenance mechanism. *Oncotarget* **9**: 15836-15846

- Ozer O, Hickson ID (2018) Pathways for maintenance of telomeres and common fragile sites during DNA replication stress. *Open Biol* **8**
- Panagopoulos A, Altmeyer M (2021) The Hammer and the Dance of Cell Cycle Control. *Trends in biochemical sciences* **46**: 301-314
- Pasero P, Vindigni A (2017) Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annual review of genetics* **51**: 477-499
- Patel DR, Weiss RS (2018) A tough row to hoe: when replication forks encounter DNA damage. *Biochemical Society transactions* **46**: 1643-1651
- Paulsen RD, Cimprich KA (2007) The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA repair* **6**: 953-966
- Pepe A, West SC (2014) MUS81-EME2 promotes replication fork restart. *Cell Rep* **7**: 1048-1055
- Petermann E, Caldecott KW (2006) Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell cycle* **5**: 2203-2209
- Petermann E, Maya-Mendoza A, Zachos G, Gillespie DA, Jackson DA, Caldecott KW (2006) Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* **26**: 3319-3326
- Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T (2010a) Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell* **37**: 492-502
- Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010b) Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 16090-16095
- Petsalaki E, Dandoulaki M, Morrice N, Zachos G (2014) Chk1 protects against chromatin bridges by constitutively phosphorylating BLM serine 502 to inhibit BLM degradation. *J Cell Sci* **127**: 3902-3908
- Pfander B, Matos J (2017) Control of Mus81 nuclease during the cell cycle. *FEBS letters* **591**: 2048-2056
- Pfister SX, Markkanen E, Jiang Y, Sarkar S, Woodcock M, Orlando G, Mavrommati I, Pai CC, Zalmas LP, Drobnitzky N, Dianov GL, Verrill C, Macaulay VM, Ying S, La Thangue NB, D'Angiolella V, Ryan AJ, Humphrey TC (2015) Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTP Starvation. *Cancer cell* **28**: 557-568
- Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA (2019) State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nature reviews Clinical oncology* **16**: 81-104
- Poli J, Tsaponina O, Crabbe L, Keszthelyi A, Pantescio V, Chabes A, Lengronne A, Pasero P (2012) dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *The EMBO journal* **31**: 883-894
- Poon RY (2016) Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods in molecular biology* **1342**: 3-19
- Poulliou S, Koukourakis MI (2014) Gamma histone 2AX (gamma-H2AX) as a predictive tool in radiation oncology. *Biomarkers* **19**: 167-180
- Qiu Z, Oleinick NL, Zhang J (2018) ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiother Oncol* **126**: 450-464
- Quinet A, Lemacon D, Vindigni A (2017) Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Molecular cell* **68**: 830-833
- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews* **61**: 746-759
- Redon CE, Weyemi U, Parekh PR, Huang D, Burrell AS, Bonner WM (2012) gamma-H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 743-756
- Rivera-Mulia JC, Gilbert DM (2016) Replicating Large Genomes: Divide and Conquer. *Molecular cell* **62**: 756-765
- Robinson NP, Bell SD (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. *The FEBS journal* **272**: 3757-3766
- Rode A, Maass KK, Willmund KV, Lichter P, Ernst A (2016) Chromothripsis in cancer cells: An update. *International journal of cancer* **138**: 2322-2333
- Rodriguez-Acebes S, Mouron S, Mendez J (2018) Uncoupling fork speed and origin activity to identify the primary cause of replicative stress phenotypes. *The Journal of biological chemistry* **293**: 12855-12861
- Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**: 440-450
- Roos WP, Kaina B (2013) DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* **332**: 237-248

Roos WP, Thomas AD, Kaina B (2016) DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature reviews Cancer* **16**: 20-33

Russo A, Pacchierotti F, Cimini D, Ganem NJ, Genesca A, Natarajan AT, Pavanello S, Valle G, Degrossi F (2015) Genomic instability: Crossing pathways at the origin of structural and numerical chromosome changes. *Environmental and molecular mutagenesis* **56**: 563-580

Sakurikar N, Thompson R, Montano R, Eastman A (2016) A subset of cancer cell lines is acutely sensitive to the Chk1 inhibitor MK-8776 as monotherapy due to CDK2 activation in S phase. *Oncotarget* **7**: 1380-1394

Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R (2012) Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 141-152

Sanjiv K, Hagenkorf A, Calderon-Montano JM, Koolmeister T, Reaper PM, Mortusewicz O, Jacques SA, Kuiper RV, Schultz N, Scobie M, Charlton PA, Pollard JR, Berglund UW, Altun M, Helleday T (2016) Cancer-Specific Synthetic Lethality between ATR and CHK1 Kinase Activities. *Cell Rep* **14**: 298-309

Sansregret L, Vanhaesebroeck B, Swanton C (2018) Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nature reviews Clinical oncology* **15**: 139-150

Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Veterinary pathology* **35**: 461-478

Schoonen PM, Kok YP, Wierenga E, Bakker B, Foijer F, Spierings DCJ, van Vugt M (2019) Premature mitotic entry induced by ATR inhibition potentiates olaparib inhibition-mediated genomic instability, inflammatory signaling, and cytotoxicity in BRCA2-deficient cancer cells. *Mol Oncol* **13**: 2422-2440

Sen T, Della Corte CM, Milutinovic S, Cardnell RJ, Diao L, Ramkumar K, Gay CM, Stewart CA, Fan Y, Shen L, Hansen RJ, Strouse B, Hedrick MP, Hassig CA, Heymach JV, Wang J, Byers LA (2019) Combination Treatment of the Oral CHK1 Inhibitor, SRA737, and Low-Dose Gemcitabine Enhances the Effect of Programmed Death Ligand 1 Blockade by Modulating the Immune Microenvironment in SCLC. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **14**: 2152-2163

Siri SO, Martino J, Gottifredi V (2021) Structural Chromosome Instability: Types, Origins, Consequences, and Therapeutic Opportunities. *Cancers* **13**

Skoog L, Bjursell G (1974) Nuclear and cytoplasmic pools of deoxyribonucleoside triphosphates in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry* **249**: 6434-6438

Skoog L, Nordenskjold B (1971) Effects of hydroxyurea and 1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells. *European journal of biochemistry* **19**: 81-89

Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research* **108**: 73-112

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 7344-7349

Spies J, Lukas C, Somyajit K, Rask MB, Lukas J, Neelsen KJ (2019) 53BP1 nuclear bodies enforce replication timing at under-replicated DNA to limit heritable DNA damage. *Nature cell biology* **21**: 487-497

Stinge J, Bellelli R, Boulton SJ (2017) Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nature reviews Molecular cell biology* **18**: 563-573

Sudhakar A (2009) History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy* **1**: 1-4

Sullivan K, Cramer-Morales K, McElroy DL, Ostrov DA, Haas K, Childers W, Hromas R, Skorski T (2016) Identification of a Small Molecule Inhibitor of RAD52 by Structure-Based Selection. *PLoS One* **11**: e0147230

Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* **25**: 3553-3562

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35

Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M (2000) Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes & development* **14**: 1439-1447

Tang J, Erikson RL, Liu X (2006) Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 11964-11969

- Targa A, Rancati G (2018) Cancer: a CINful evolution. *Current opinion in cell biology* **52**: 136-144
- Techer H, Koundrioukoff S, Carignon S, Wilhelm T, Millot GA, Lopez BS, Brison O, Debatisse M (2016) Signaling from Mus81-Eme2-Dependent DNA Damage Elicited by Chk1 Deficiency Modulates Replication Fork Speed and Origin Usage. *Cell Rep* **14**: 1114-1127
- Techer H, Koundrioukoff S, Nicolas A, Debatisse M (2017) The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nature reviews Genetics* **18**: 535-550
- Toledo L, Neelsen KJ, Lukas J (2017) Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Molecular cell* **66**: 735-749
- Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, Bekker-Jensen S, Mailand N, Bartek J, Lukas J (2013) ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* **155**: 1088-1103
- Travers A, Muskhelishvili G (2015) DNA structure and function. *The FEBS journal* **282**: 2279-2295
- Ubhi T, Brown GW (2019) Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment. *Cancer research* **79**: 1730-1739
- Utani K, Kohno Y, Okamoto A, Shimizu N (2010) Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS One* **5**: e10089
- Vallerga MB, Mansilla SF, Federico MB, Bertolin AP, Gottifredi V (2015) Rad51 recombinase prevents Mre11 nuclease-dependent degradation and excessive PrimPol-mediated elongation of nascent DNA after UV irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: E6624-6633
- Vargas-Rondon N, Villegas VE, Rondon-Lagos M (2017) The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers* **10**
- Walker M, Black EJ, Oehler V, Gillespie DA, Scott MT (2009) Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* **28**: 2314-2323
- Walter J, Newport J (2000) Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Molecular cell* **5**: 617-627
- Walworth N, Davey S, Beach D (1993) Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* **363**: 368-371
- Washington MT, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (2000) Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3094-3099
- Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738
- Whittaker SR, Mallinger A, Workman P, Clarke PA (2017) Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacol Ther* **173**: 83-105
- Wickramasinghe CM, Arzouk H, Frey A, Maiter A, Sale JE (2015) Contributions of the specialised DNA polymerases to replication of structured DNA. *DNA repair* **29**: 83-90
- Wilhelm T, Olziersky AM, Harry D, De Sousa F, Vassal H, Eskat A, Meraldi P (2019) Mild replication stress causes chromosome mis-segregation via premature centriole disengagement. *Nat Commun* **10**: 3585
- Wilhelm T, Said M, Naim V (2020) DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. *Genes* **11**
- Wilson JS, Tejera AM, Castor D, Toth R, Blasco MA, Rouse J (2013) Localization-dependent and -independent roles of SLX4 in regulating telomeres. *Cell Rep* **4**: 853-860
- Woodcock CL (2006) Chromatin architecture. *Current opinion in structural biology* **16**: 213-220
- Wright WD, Shah SS, Heyer WD (2018) Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* **293**: 10524-10535
- Wyatt HD, Sarbajna S, Matos J, West SC (2013) Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday junction resolution in human cells. *Molecular cell* **52**: 234-247
- Xing M, Wang X, Palmi-Pallag T, Shen H, Helleday T, Hickson ID, Ying S (2015) Acute MUS81 depletion leads to replication fork slowing and a constitutive DNA damage response. *Oncotarget* **6**: 37638-37646
- Yamada M, Watanabe K, Mistrik M, Vesela E, Protivankova I, Mailand N, Lee M, Masai H, Lukas J, Bartek J (2013) ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes & development* **27**: 2459-2472

- Yang XH, Shiotani B, Classon M, Zou L (2008) Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes & development* **22**: 1147-1152
- Ying S, Minocherhomji S, Chan KL, Palmai-Pallag T, Chu WK, Wass T, Mankouri HW, Liu Y, Hickson ID (2013) MUS81 promotes common fragile site expression. *Nature cell biology* **15**: 1001-1007
- Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, Gillespie DA (2007) Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* **12**: 247-260
- Zeman MK, Cimprich KA (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology* **16**: 2-9
- Zhang J, Dai Q, Park D, Deng X (2016) Targeting DNA Replication Stress for Cancer Therapy. *Genes* **7**
- Zhang Y, Hunter T (2014) Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International journal of cancer* **134**: 1013-1023
- Zhao H, Piwnicka-Worms H (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**: 4129-4139
- Zink D, Bornfleth H, Visser A, Cremer C, Cremer T (1999) Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp Cell Res* **247**: 176-188

Anexo



Participación en artículos científicos

Todos los experimentos mostrados a lo largo de esta tesis, excepto los de las Fig. 2.2 y Fig. 2.3 se publicaron en el artículo científico titulado “*Mus81-Eme1-dependent aberrant processing of DNA replication intermediates in mitosis impairs genome integrity*” en la revista Science Advances.

A lo largo de mi tesis realicé otros experimentos que me valieron formar parte de la lista de autores de otros artículos científicos. A continuación detallo los experimentos que realicé para cada uno de estos artículos. Para encontrar las citas detalladas diríjase a la sección “Publicaciones y presentaciones en congresos”.

*** *Chk1 loss creates replication barriers that compromise cell survival independently of origin firing levels* - EMBO Journal**

Para este artículo desarrollé por mutagénesis puntual dirigida todos los mutantes del plásmido GFP-Pol η (GFP-Pol η T416D; GFP-Pol η T512D; GFP-Pol η T591D; GFP-Pol η S687D; GFP-Pol η S687A). Las mutaciones de serina (S) o treonina (T) a aspartato (D) fueron usadas para evaluar mutantes GFP-Pol η fosfomiméticos (el aspartato simula la carga negativa de la serina o treonina al ser fosforiladas). En cambio, la mutación de serina a alanina (A) fue usada para evaluar a un mutante GFP-Pol η que no puede fosforilarse en la serina 687. Todos estos mutantes se utilizaron en experimentos de estiramiento de fibra, western-blot e inmunofluorescencia. Los mutantes se utilizaron para evaluar cuál de estos potenciales sitios de fosforilación es el que efectivamente se fosforila en células deficientes en CHK1. Además, mutagenicé el sitio S687D y S687A en el plásmido lentiviral pLenti-GFP-Pol η . La infección con lentivirus, a diferencia de la transfección con plásmidos, permite que la expresión de la proteína sea mucho más homogénea (mismos niveles de expresión proteica a lo largo de una población celular), condición fundamental para aquellos experimentos en los que no se analicen las células de manera individual (estiramiento de fibras de ADN por ejemplo).

También contribuí con la puesta a punto de la técnica COMETA neutro para la identificación de DSBs y ratifiqué en la línea celular HCT116 algunos

resultados obtenidos en la línea celular U2OS con el ensayo de estiramiento de fibras de ADN.

*** *Unscheduled MRE11 activity triggers cell death but not chromosome instability in polymerase η -depleted cells subjected to UV irradiation* - Oncogene**

Para este artículo analicé el perfil del ciclo celular por citometría de flujo en células teñidas con ioduro de propidio. Además realicé experimentos de COMETA neutro para la identificación de DSBs. También realicé inmunofluorescencias con detección doble: γ H2AX y ADNsc. Estos experimentos tuvieron como fin cuantificar el porcentaje de células positivas para γ H2AX y ADNsc pan-nuclear. Aquellas células con doble marcación fueron consideradas como células con catástrofe replicativa, condición incompatible con la supervivencia.

*** *PARP activity fine-tunes the DNA replication choreography of Chk1-depleted cells* - Journal of Molecular Biology**

Para este artículo hice los experimentos de supervivencia e inmunofluorescencias para γ H2AX, y cuantifiqué imágenes de microscopía obtenidas previamente por otra autora el trabajo. También diseñé y preparé las figuras y participé de la escritura.

*** *Persistent double strand break accumulation does not precede cell death in an Olaparib-sensitive BRCA-deficient colorectal cancer cell model* - Genetics and Molecular Biology**

Para este artículo transferí la técnica COMETA neutro puesta a punto por mí para el trabajo publicado en EMBO Journal.

*** *CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication* - Genes**

En este Review participé en la escritura y edición del borrador.