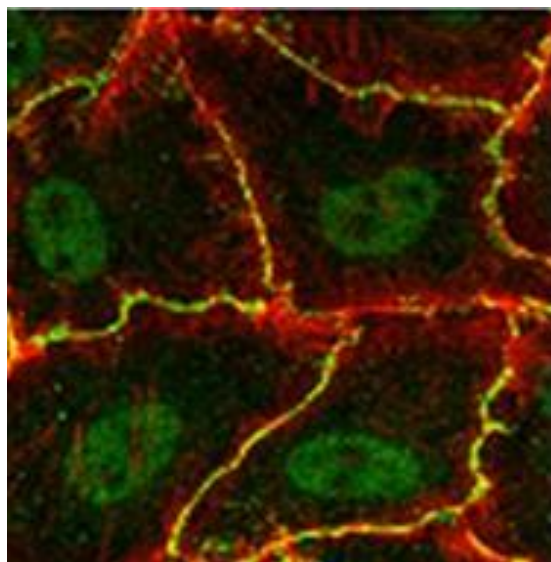
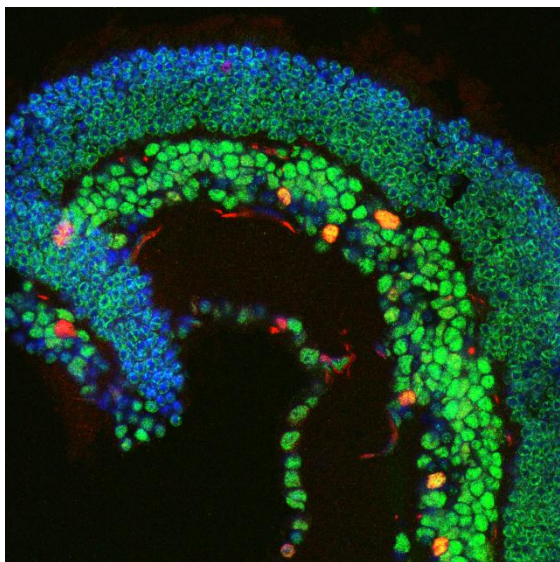


# TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## PEDECIBA BIOLOGIA

### IIBCE-INGEBI

2014



**Localización preferencial del daño genético en regiones eucromáticas y replicantes de los cromosomas y los núcleos de mamíferos. Roles de la poli-ADP-ribosa en presencia y ausencia de daño genético inducido en células VERO.**

Tesista: Mag. Laura Lafon-Hughes

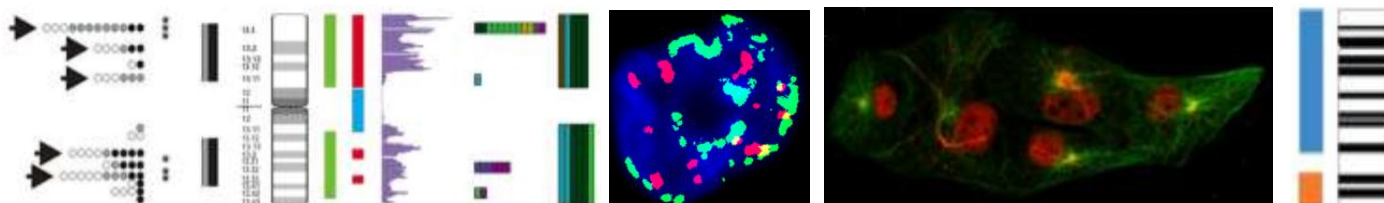
Director: Dr. Gustavo A. Folle

Codirector: Dra. Silvia Fernández Villamil

Tribunal: Dra. Elia Nunes,

Prof. Ekaterina Scvortzoff,

Dra. Beatriz Garat



## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	5
<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	8
<b>INTRODUCCION</b> .....	16
Eucromatina y heterocromatina .....	16
Arquitectura nuclear.....	23
Daño y reparación del ADN .....	29
Tipos de daño y agentes inductores .....	29
Radiaciones ionizantes (RI) y bleomicina (BLM).....	29
Sistemas de reparación del daño.....	31
Reparación de las rupturas de doble cadena.....	33
Activación de <i>checkpoints</i> .....	34
Los <i>foci</i> que contienen la histona fosforilada $\gamma$ H2AX .....	35
Respuesta celular al daño.....	36
Distribución del daño genético .....	37
Poli-ADP-ribosilación .....	40
Estructura de la poli-ADP-ribosa (PAR) .....	40
Poli-ADP-ribosa-glicohidrolasa (PARG) .....	41
Poli-ADP-ribosa-polimerasas (PARPs) .....	44
Poli-ADP-ribosa en la eucromatina y la heterocromatina .....	47
Poli-ADP-ribosa en la arquitectura nuclear .....	49
Poli-ADP-ribosa en la respuesta al daño genético inducido.....	50
Participación de PARP en las vías de reparación del ADN.....	50
PARP-1 <i>in vitro</i> : afinidad por diferentes sustratos y velocidad de PARilación .....	52
<i>Pool</i> basal de PAR y respuesta al daño genotóxico.....	55
PARilación en la respuesta al daño genético <i>in vivo</i> .....	55
Principales herramientas para controlar y analizar la PARilación .....	59
Medición de los niveles de poli-ADP-ribosa y de proteínas PARiladas.....	59
Inhibidores de PARPs .....	63
Inhibidores de PARG .....	64
Algunas implicancias biomédicas de los estudios de PARilación .....	65
<b>HIPÓTESIS</b> .....	66
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	67
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS (*)</b> .....	67
<b>ESTRATEGIAS DE TRABAJO (*)</b> .....	68

<b>MATERIALES Y METODOS</b> (correspondientes a los Capítulos 8 a 11). .....	70
Cultivos celulares y tratamientos.....	70
Determinación de viabilidad y proliferación en células VERO.....	71
Inmunomarcación con anticuerpos específicos y detección de actina con faloidina en células VERO.....	71
Microscopía confocal y análisis de imágenes .....	72
Fluorimetría de poli-ADP-ribosa en células VERO.....	73
<i>Western blots</i> .....	73
Incorporación de NAD <sup>+</sup> -biotinilado al cinturón de adhesión de las células VERO..	75
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	76
<b>CAPITULO 1.-</b> Localización preferencial de los <i>foci</i> $\gamma$ H2AX inducidos por bleomicina en la eucromatina de los bastones de la retina de ratón. ....	77
RESUMEN .....	77
TRABAJO PUBLICADO: Preferential localization of $\gamma$ H2AX foci in euchromatin of retina rod cells after DNA damage induction .....	82
<b>CAPITULO 2.-</b> Los <i>foci</i> $\gamma$ H2AX inducidos por bleomicina mapean preferentemente en los dominios replicantes del núcleo interfásico de las células CHO9. ....	83
RESUMEN .....	83
TRABAJO PUBLICADO: Bleomycin-induced $\gamma$ H2AX foci map preferentially to replicating domains in CHO9 interphase nuclei.....	85
<b>CAPITULO 3.-</b> Señales $\gamma$ H2AX espontáneas e inducidas por bleomicina en cromosomas metafásicos de células CHO9. ....	86
RESUMEN .....	86
TRABAJO PUBLICADO: Spontaneous and bleomycin –induced $\gamma$ H2AX signals in CHO9 metaphase chromosomes. ....	89
<b>CAPITULO 4.-</b> Los patrones de daño genético inducido cambian de acuerdo a la replicación de la eu y la heterocromatina .....	90
RESUMEN .....	90
CAPITULO de LIBRO PUBLICADO: Chromatin damage patterns shift according to eu/ heterochromatin replication .....	92
<b>CAPITULO 5.-</b> Encuentros cercanos: los RIDGEs, la cromatina hiperacetilada, los sitios de fractura cromosómicos (SFC) y los genes diferencialmente expresados en tumores se agrupan en regiones específicas de los cromosomas humanos.....	93
RESUMEN .....	93
TRABAJO PUBLICADO: Close encounters: RIDGEs, hyperacetylated chromatin, radiation breakpoints and genes differentially expressed in tumors cluster at specific human chromosome regions.....	95

<b>CAPITULO 6.-</b> Los SFC de translocaciones involucradas en enfermedades onco-hematológicas mapean preferencialmente en RIDGEs y regiones de cromatina hiperacetilada .....	96
<b>CAPITULO 7.-</b> Arquitectura nuclear, aberraciones cromosómicas y daño genético-	
RESUMEN .....	106
CAPITULO de LIBRO PUBLICADO: Nuclear architecture, chromosome aberrations and genetic damage.....	108
<b>CAPITULO 8.-</b> Localización de PARP-1 y PARG en células VERO.....	109
8.1.- Las células VERO tienen PARP-1 nuclear y más de una isoforma de PARG nuclear y citoplásmica .....	109
8.2.- Alguna isoforma de PARG disminuyó su abundancia al inducir depolimerización de los microtúbulos .....	114
8.3.- Alguna isoforma de PARG acompañó a los microtúbulos que modificaron su distribución frente al daño genotóxico .....	116
<b>CAPITULO 9.-</b> Parilación y respuesta al daño genético en células VERO.....	119
<b>CAPITULO 10.-</b> Detección de los <i>pool</i> s de poli-ADP ribosa en las células VERO..	122
10.1.- Detección de poli-ADP ribosa en células no tratadas .....	122
10.2.- Detección de poli-ADP ribosa en condiciones de estrés genotóxico.....	124
<b>CAPITULO 11.-</b> Las células VERO tienen un cinturón de PAR acompañando su cinturón de adhesión. ....	127
RESUMEN .....	127
TRABAJO ACEPTADO: VERO cells harbor a poly-ADP-ribose belt partnering their epithelial adhesion belt.....	130
Resultados preliminares: Incorporación de NAD <sup>+</sup> biotinilado a las células VERO	131
Modelo de trabajo a futuro .....	134
<b>CONCLUSIONES</b> .....	138
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	139
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	141
<b>ANEXOS</b> .....	179
Decision on your PeerJ submission: "VERO cells harbor a poly-ADP-ribose belt partnering their epithelial adhesion belt" (#2014:06:2240:1:0:REVIEW).....	180
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	181

## RESUMEN GENERAL

El resultado global del daño genético inducido a una célula puede ser imperceptible, pero también puede ser la muerte o la transformación celular como consecuencia de la mutación de determinados genes. Este último fenómeno es muy importante en el contexto de las mutaciones que posibilitan el desarrollo tumoral que conduce al cáncer.

En mamíferos es posible definir eucromatina y heterocromatina como regiones del genoma que difieren en la intensidad de su tinción con colorantes básicos o agentes intercalantes y en las marcas epigenéticas asociadas. Por ejemplo, la eucromatina presenta alto nivel de metilación de la histona H3 en Lys 4 (H3K4me3) e hiperacetilación de histonas. La arquitectura convencional de los núcleos de células de mamíferos involucra la presencia de heterocromatina periférica (adossada a la envoltura nuclear) o en sitios muy picnóticos que, si son coincidentes con acúmulos de centrómeros, se denominan cromocentros. La eucromatina, más laxa, se extiende por todo el resto del núcleo. Cada cromosoma ocupa un territorio nuclear definido pero presenta *loops* de cromatina que se encuentran próximos a *loops* de cromosomas vecinos. La distancia entre dichos *loops* podría imponer un límite físico a la ocurrencia de translocaciones. Existe una correspondencia entre bandas G-claras y eucromatina así como entre bandas G-oscuras y heterocromatina.

La tesis procura responder cuándo (en qué momento del ciclo celular) y dónde (en qué regiones nucleares o cromosómicas) es más factible la ocurrencia de daño genotóxico, con el fin de aportar a la comprensión de los mecanismos involucrados en la inducción y/o reparación del daño. Por ese motivo, hemos inducido daño genotóxico con el agente radiomimético bleomicina en diferentes modelos de trabajo (bastones retinianos que se encuentran en G<sub>0</sub>, células CHO9 en interfase o en G<sub>2</sub>/M; Capítulo 1 - 4) y se han registrado los sitios de ocurrencia del daño primario mediante el mapeo de *foci*  $\gamma$ H2AX. Por otra parte, hemos realizado trabajos de meta-análisis (Capítulo 5 y 6) comparando los sitios de ocurrencia de SFC en translocaciones presentes en enfermedades hemato-oncológicas y los *loci* de genes desregulados en tumores, con los patrones de hiperacetilación de histonas y localización de *clusters* de alta expresión génica o RIDGEs (Regions of Increased Gene Expression).

En conjunto, el análisis de datos nuestros y de la literatura indica que el daño primario inducido por bleomicina se localiza preferentemente en regiones eucromáticas y replicantes. A su vez, tanto el daño inducido por radiaciones ionizantes como los SFC de translocaciones presentes en enfermedades hemato-oncológicas y los *loci* de genes

desregulados en tumores, son más frecuentes en regiones cromosómicas que presentan altos niveles de hiperacetilación de histonas y RIDGEs. Se argumenta que la estructura y la dinámica nuclear impactan en la génesis y localización de las aberraciones cromosómicas (Capítulo 7).

Otra aproximación experimental para analizar los mecanismos de respuesta al daño genotóxico consiste en examinar el rol de proteínas específicas y sus modificaciones postraduccionales. Se ha propuesto que la síntesis de poli-ADP-ribosa (PAR) tiene un rol fundamental en la respuesta al daño genético. PAR es un polímero de hasta 400 unidades sintetizado por las poli-ADP-ribosil-polimerasas (PARPs) a partir de NAD<sup>+</sup> y degradado por poli-ADP-ribosil-glicohidrolasa (PARG). Si bien PARPs y PARG tienen localización subcelular ubicua, se ha reportado que PAR es predominantemente nuclear. Por otra parte, nuevos trabajos argumentan a favor de un rol estructural de PAR nuclear basal en la constitución de los cuerpos nucleares, acúmulos de proteínas que se mantienen juntos en ausencia de una membrana que los contenga.

Las células VERO mostraron PARP-1 nuclear y también expresaron abundante PARG, comprendiendo, de acuerdo a nuestros datos, isoformas potencialmente activas y otras sin actividad catalítica. En condiciones basales, durante la interfase, PARG se localizó en el núcleo y asociada a microtúbulos, particularmente al centríolo (Capítulo 8).

Si bien las evidencias indican que la depleción de PARP o la inhibición de su actividad antes de la inducción del daño es perjudicial para la reparación y la supervivencia celular, pocas investigaciones se han focalizado en la inhibición de PARP después de la inducción de daño genético. Hemos realizado experimentos inhibiendo PARP o PARG antes, durante o después de inducir daño genotóxico (con BLM o UV-C) en células VERO (Capítulo 9). No hemos observado potenciación de la pérdida de viabilidad en células VERO en estas condiciones, lo que hubiese demostrado la importancia de la activación PARP en respuesta al daño genómico. Los resultados negativos obtenidos podrían deberse formalmente a: (1) que la poli-ADP-ribosilación no fuese importante en la respuesta al daño genotóxico de células VERO; (2) que los inhibidores no hubiesen cumplido su función. Sin embargo, de acuerdo a resultados de fluorimetría y análisis de imágenes con un anticuerpo anti-PAR policlonal de conejo (BD), las células no tratadas del control albergaron niveles detectables de polímero PAR, ubicado en el núcleo y asociado a la membrana plasmática, una ubicación no observada previamente. En respuesta al daño genotóxico, no se detectaron aumentos de la cantidad de PAR total por encima de 50% (Capítulo 10). Por otra parte, al menos algunos de los inhibidores alteraron la cantidad de PAR detectable por fluorimetría de

manera significativa. El *pool* de PAR basal podría jugar un papel en la retención de las proteínas centinela en compartimientos nucleares críticos implicados en una pronta respuesta a las lesiones del ADN, facilitando así la supervivencia celular y la proliferación. Alternativamente, el polímero de PAR basal podría cumplir alguna otra función.

Curiosamente, encontramos PAR asociado a la membrana plasmática de las células VERO (Capítulo 11), por su cara interna, formando un anillo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de altura coincidente con el cinturón de adhesión epitelial, acompañando a la actina. La disrupción de los filamentos de actina con citocalasina D se acompañó de disrupción del cinturón de PAR. A su vez, la PAR del cinturón colocalizó parcialmente con vinculina, proteína de anclaje de la actina a la membrana plasmática. Las imágenes sugieren que la vinculina alcanza las proximidades de la membrana aún no PARilada y se PARila en ese lugar. Una PARP denominada tankyrasa 1 (TNKS-1) es una candidata natural a realizar esta PARilación, dado que ha sido descrita su presencia en el cinturón de adhesión de células epiteliales de riñón (MDCK). La electroporación de  $\text{NAD}^+$ -biotinilado permitió evidenciar que parte del *pool* de  $\text{NAD}^+$  se utiliza en el cinturón de adhesión, colocalizando con PAR. Los inhibidores PJ34 y XAV939 evitan la formación del cinturón de PAR y concomitantemente la actina cortical asociada al cinturón. Estos resultados indican que la marcación corresponde efectivamente a PAR, que probablemente es sintetizado por TNKS-1 y que el cinturón de PAR cumple un rol estructural a nivel de los cinturones de adhesión.

Se propone por primera vez que la PAR citoplasmática estaría involucrada en los complejos de uniones adherentes que conectan la E-caderina,  $\alpha$ - y  $\beta$ -catenina y vinculina a los filamentos de actina en células epiteliales polarizadas. Se sugiere un modelo de relación de TNKS-1, PARG y PAR. El presente trabajo amplía el espectro de perspectivas con respecto a las funciones de PAR y obliga a reinterpretar los datos con respecto a la abundancia o la escasez de PAR en situaciones patológicas, ya que el cinturón epitelial está profundamente implicado no sólo en el mantenimiento de la estructura del epitelio sino también en la señalización celular.