



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
(PEDECIBA)

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA-BIOLOGÍA, Sub-área Genética

**“Daño genético y replicación del ADN:
análisis estructural y funcional por
microscopía confocal y de súper-
resolución”**

Estudiante: Pablo Liddle Ríos

Director de Tesis: Gustavo A. Folle

Departamento de Genética, IIBCE

Tribunal de Tesis

Presidenta: Dra. Yanina Panzera

Vocales: Dr. José Badano
Dr. Leonel Malacrida

Montevideo, 23 de julio de 2020

RESUMEN

El reconocimiento y procesamiento del daño genético implica modificaciones epigenéticas en la cromatina. En respuesta a rupturas de doble cadena del ADN o estrés replicativo, la variante histónica H2AX es fosforilada (serina139) generando γ H2AX. La fosforilación abarca ≈ 2 Mb flanqueando la lesión, permitiendo su inmunodetección como foci de γ H2AX. La replicación del ADN es regulada temporal y espacialmente: la eucromatina replica en fase S temprana y la heterocromatina en S media y tardía como puede evidenciarse por marcación con pulsos de EdU. Empleando microscopía confocal y análisis de colocalización reportamos previamente en células CHO9 una localización preferencial de los foci de γ H2AX inducidos por el radiomimético bleomicina en regiones de cromatina replicante (EdU+). En MS/LS los foci se posicionaron recurrentemente en interfases replicantes/no-replicantes (Liddle et al. 2014).

En esta Tesis abordamos aspectos estructurales y funcionales en relación a la inducción y localización de daño genético primario en células de mamíferos y su interrelación con la replicación del ADN. Específicamente nos enfocamos en:

1) Localización de foci de γ H2AX inducidos por HU respecto a dominios de cromatina replicante en núcleos MS/LS.

Analizamos por microscopía confocal en células CHO9 en fases MS/LS si los foci de γ H2AX inducidos por hidroximetilurea mapeaban preferentemente en interfases replicante/no-replicante o solapaban totalmente con regiones replicantes (EdU+). HU induce fosforilación de H2AX por estrés replicativo, pues inhibe la enzima ribonucleótido reductasa, responsable de generar los dNTPs necesarios para este proceso. Las células fueron simultáneamente expuestas a EdU (10-20 μ M) e HU (2-16 mM) por 15 ó 30 min, sin recuperación post-daño o con recuperación en medio de cultivo por 30 min. Adicionalmente, realizamos co-tratamientos con BLEO (40 μ g/mL) + HU (2-8 mM) por 30 min sin recuperación. Verificamos un incremento en la marcación de γ H2AX al aumentar la dosis de exposición a HU, no asociada a una disminución en la viabilidad celular. En cultivos tratados con HU observamos una fuerte disminución en la señal de EdU 10 μ M (<20% respecto a células no expuestas), evidenciando la inhibición en la síntesis de ADN por HU. Empleando mayor concentración de EdU (20 μ M) pudimos mapear los foci de γ H2AX respecto a regiones EdU+. En todas las condiciones observamos un solapamiento significativo entre foci de γ H2AX y regiones EdU+, cuando se evaluó colocalización entre estas marcaciones calculando el índice RDDI ($6.0 < \text{RDDI} < 8.1$) (descrito en Liddle et al. 2014). Así, verificamos una localización diferente de γ H2AX cuando su formación es inducida por estrés replicativo (y no por DSB). Los experimentos de co-

tratamiento con BLEO + HU evidenciaron RDDI similares a los de HU. De hecho, en todas las fases del ciclo HU bloqueó la acción de BLEO en los cultivos tratados con ambos agentes.

2) Detección de nanofoci de γ H2AX por microscopía de súper-resolución dSTORM y su cuantificación mediante teselación de Voronoï.

La resolución óptica alcanzable por microscopía de fluorescencia convencional restringe la visualización de los foci de γ H2AX a regiones nucleares esferoides de intensidad homogénea. En colaboración con la Universidad de Würzburg (Alemania) nos propusimos investigar en células HeLa control o expuestas a BLEO la sub-estructura a escala nanoscópica de los foci de γ H2AX mediante microscopía de súper-resolución dSTORM. Esta microscopía se basa en separar temporalmente la emisión de fluorescencia de moléculas individuales y la posterior reconstrucción de una imagen de súper-resolución con las localizaciones detectadas. Indujimos daño (DSB) en el ADN mediante un pulso de BLEO (5-160 μ g/mL por 45 min) sin o con recuperación post-daño en medio de cultivo (≤ 2 h). Los cultivos de células tratadas con BLEO 20 μ g/mL sin recuperación post-daño fueron expuestos, para verificar la especificidad de la señal de γ H2AX, a inhibidores específicos de las quinasas canónicas que generan γ H2AX post-daño. A saber, KU-55933, VE-821 y NU-7026 para ATM, ATR y DNA-PK, respectivamente. Las células fueron pre-tratadas por 1 h con los inhibidores (20 μ M cada compuesto) y luego co-expuestas a BLEO e inhibidores.

Tanto en cultivos control como expuestos a BLEO las imágenes de dSTORM revelaron: 1) agrupamientos de señal de γ H2AX (nanofoci) confinados a los foci de γ H2AX de la microscopía de fluorescencia estándar; 2) nanofoci dispersos en el espacio nuclear remanente. Luego de separar ambos tipos de señal mediante un script personalizado en Python (en colaboración con SCIAN-Lab/ Universidad de Chile), cuantificamos los nanofoci mediante un análisis de clusters en SR-Tesseler (Levet et al. 2015). Respecto al control, los foci de γ H2AX inducidos por BLEO fueron más abundantes (36.3 versus 12.3), presentaron áreas mayores (0.41 versus 0.19 μ m²), más nanofoci por focus (22.7 versus 13.2) y densidades de nanofoci comparables (~ 60 nanofoci/ μ m²). Por otra parte, los nanofoci de γ H2AX dispersos presentaron una densidad similar (~ 3 nanofoci/ μ m²), sugiriendo que estos se generaron endógenamente. En presencia de los inhibidores de quinasas canónicas de H2AX, los foci desaparecieron en las células expuestas a BLEO, mientras que los nanofoci dispersos disminuyeron en densidad (~ 50 %). En esta Tesis se discuten varios factores, no excluyentes entre sí, que podrían explicar la presencia de estos nanofoci dispersos residuales.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecerles a las siguientes organizaciones por el apoyo que me han ofrecido durante la realización de esta tesis. A nuestra Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por proveerme de una beca por 3 años del Sistema Nacional de Becas para la realización de esta tesis (generación del 2015) y posteriormente por apoyar mis actividades de investigación en el contexto del Sistema Nacional de Investigadores (SNI), cuyo incentivo económico y reconocimiento como investigador continúa hasta el día de hoy. En segundo lugar, a PEDECIBA-Biología que me brindó un marco institucional donde realizar mi posgrado en Ciencias Biológicas y me financió total o parcialmente la asistencia a cursos y congresos regionales (Mendoza, Argentina) e internacionales (Estados Unidos y Alemania). Esas instancias fueron clave en mi formación como investigador y me permitieron entrar en contacto con otros investigadores en el área de Daño y Reparación del ADN y análisis cuantitativo de imágenes biológicas. El intercambio con ellos fue muy enriquecedor.

Les agradezco a tod@s mis compañer@s del Departamento de Genética (DGEN) y del Laboratorio de Epigenética (LEIG) del IIBCE. En especial a la Dr. Laura Lafon-Hughes por el constante intercambio de opiniones relativas al diseño de experimentos e interpretación y discusión de los resultados obtenidos y a mi tutor de Tesis, el profesor Gustavo Folle, líder de este equipo de investigación.

Uruguay es un país pequeño y de bajo nivel de inversión a nivel científico. Eso nos impulsa a buscar colaboraciones con grupos del exterior a fin de poder aprender nuevas técnicas y procedimientos. En este sentido, me siento sumamente agradecido con el Profesor Markus Sauer del Departamento de Biotecnología y Biofísica de la Universidad de Würzburg (Alemania) por haberme recibido en su laboratorio y su generosidad absoluta para apoyarme con los insumos necesarios para mi proyecto de investigación. Un agradecimiento muy especial le debo también a Sebastian Letschert, Fabian Zwettler y Pablo Mateos por el entrenamiento que me proporcionaron en microscopía de súper-resolución dSTORM, técnica sumamente artesanal y que no puede ser aprendida solamente por la lectura de artículos. ¡Gracias por transmitirme el *feeling* de lo que es un buen *blinking*!

Mil gracias al Profesor Steffen Härtel del *SCientific Image ANalysis-Lab* (SIAN-Lab) de la Universidad de Chile, por su apoyo constante desde 2010 en mis deseos de cuantificar todo resultado biológico significativo que fui encontrando. En especial le agradezco a los Ing. Jorge Jara e Iván Castro por desarrollar el script que permitió cuantificar las estructuras nanoscópicas que se veían por dSTORM.

Finalmente le agradezco a mi familia, mi madre, mi pareja, mis sobrinas, mi segunda madre, mis mascotas y mis amig@s por apoyarme siempre en los momentos de desaliento y desconcierto. Quienes hacemos investigación estamos con un pie en el vacío, entre la certeza y la duda, en la frontera del conocimiento, y por momentos necesitamos la escucha y el sincero consejo de aquellos que nos quieren, que nos aprecian.

Para los posibles estudiantes de ciencias experimentales que estén leyendo esta tesis les dejo una frase del poeta Rainer Maria Rilke (1875-1926), la cual me fue muy útil para siempre perseverar, seguir adelante y tener fe en mí mismo.

„Lass dir Alles geschehn:

Schönheit und Schrecken.

Man muss nur gehn:

Kein Gefühl ist das fernste.”

“Deja que todo te ocurra

la belleza y el terror.

Debemos tan sólo seguir adelante:

Ningún sentimiento es definitivo.”

Pablo Liddle Ríos,

Montevideo, 23 de julio de 2020

LISTA DE ABREVIATURAS

γ H2AX:	Histona H2AX fosforilada en serina 139
ATM:	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATMi:	Inhibidor de ATM
ATR:	<i>ATM and Rad3-related</i>
BLEO:	Bleomicina
ATRi:	Inhibidor de ATR
BrdU:	5-bromo-2'-deoxiuridina
CHO:	Células de ovario de hámster chino
CLSM:	Microscopía Confocal Láser de barrido
DAPI:	4',6-diamidino-2- fenilindol
DDR:	Respuesta al daño en el ADN
DDT:	Tolerancia al daño en el ADN
DNA-PK:	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs:	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNA-PKi:	Inhibidor de DNA-PK
DSB:	Ruptura de doble cadena en el ADN
EdU:	5-etinil-2'-deoxiuridina
ES:	Fase S temprana
FRAP:	Recuperación de fluorescencia luego de <i>photobleaching</i>
HILO:	<i>Highly Inclined and Laminated Optical sheet</i>
HR:	Recombinación homóloga
HU:	Hidroxiurea
LET:	Transferencia lineal de energía
LS:	Fase S tardía
MAPK:	Quinasas de proteínas activadas por mitógenos
MEA:	β -mercaptoetilamina

MS:	Fase S media
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NHEJ:	Reparación por unión de extremos no homólogos
ORC:	Complejo de reconocimiento de origen
ORI:	Identificación del origen de replicación
PFGE:	Electroforesis en gel de campo pulsado
PI3K:	Quinasas de proteínas de tipo fosfatidilinositol-3
pre-RC:	Complejos de pre-replicación
PSF:	Función de dispersión de punto
RDDI:	Índice de distribución de daño relacionado a la replicación
RIDGE:	Regiones de expresión génica incrementada
ROI:	Región de interés
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
SFB:	Suero fetal bovino
SIM:	<i>Structured Illumination Microscopy</i>
SMLM:	<i>Single-Molecule Localization Microscopy</i>
SPDM:	<i>Spectral Precision Distance Microscopy</i>
ssADN:	ADN simple hebra
SSB:	Ruptura de cadena simple del ADN
STED:	<i>Stimulated Emission Depletion Microscopy</i>
(d)STORM:	<i>(direct) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
TA:	Temperatura ambiente
TRAIL:	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

ÍNDICE

1.	Introducción	1
1.1	Cromatina: Eucromatina y Heterocromatina	1
1.2	Daño Genético	4
1.2.1	Rupturas de cadena doble en el ADN	5
1.3	Foci de γ H2AX	7
1.3.1	Detección y visualización de foci de γ H2AX	11
1.4	Bleomicinas	12
1.5	Hidroxiurea	16
1.6	Estructura de la cromatina y daño genético	18
1.7	Replicación del ADN	20
1.8	Replicación del ADN y daño genético	22
1.9	Microscopía de súper-resolución dSTORM	25
1.10	Evaluación de foci de reparación del ADN por microscopías de súper-resolución	28
2.	Hipótesis	30
3.	Objetivos	30
3.1	Objetivo General	30
3.2	Objetivos específicos	30
4A.	Materiales y Métodos (Parte 1)	31
4.A.1	Mantenimiento y propagación de los cultivos celulares	31
4.A.2	Tratamientos con Hidroxiurea y/o Bleomicina	31
4.A.3	Marcado de las regiones bajo síntesis de ADN durante la inducción de daño genético	31
4.A.4	Inmunodetección de γ H2AX en núcleos interfásicos	32
4.A.5	Identificación de cromatina replicante mediante detección del EdU incorporado	32
4.A.6	Obtención de imágenes por Microscopía Confocal	32
4.A.7	Procesamiento y análisis de imágenes en image J	34
4.A.7.1	Segmentación de las señales de foci de γ H2AX, EdU y DAPI	34

4.A.7.2	Determinación del nivel de marcación de γ H2AX a nivel global en los cultivos celulares	35
4.A.7.3	Evaluación de la intensidad de fluorescencia de EdU	35
4.A.7.4	Evaluación de colocalización en núcleos en fase MS/LS	35
4.A.7.5	Evaluación del nivel de marcación nuclear de γ H2AX en células MS/LS	37
4.A.7.6	Evaluación de daño en células no replicantes (fases G1/G2)	37
4.A.8	Evaluación de viabilidad celular por ensayo de MTT	37
4.A.9	Análisis Estadístico	37
5A.	Resultados (Parte 1)	39
5.A.1	El nivel de marcación de γ H2AX fue dependiente de la dosis de HU	39
5.A.2	HU produjo una inhibición significativa en la síntesis de ADN	40
5.A.3	γ H2AX inducida por HU se localizó preferencialmente sobre las regiones replicantes en núcleos MS/LS	42
5.A.4	HU neutralizó fuertemente el efecto de BLEO en los cultivos expuestos a ambos agentes	45
6A.	Discusión (Parte 1)	48
4B.	Materiales y Métodos (Parte 2)	53
4.B.1	Cultivo de células	53
4.B.2	Tratamientos con BLEO e inhibidores de quinasas de H2AX	53
4.B.3	Inmunomarcación de γ H2AX	53
4.B.4	Microscopía Láser Confocal (CLSM)	54
4.B.5	Registro de imágenes por dSTORM	54
4.B.6	Análisis cuantitativo de los datos	55
4.B.6.1	Segmentación de las regiones de foci de γ H2AX	57
4.B.6.1	Cuantificación de los nanofoci confinados a los foci de γ H2AX	61
4.B.6.1	Cuantificación de la señal de γ H2AX dispersa en las regiones nucleares sin foci de γ H2AX	61
4.B.7	Análisis estadístico	61
5.B.	Resultados (Parte 2)	62
5.B.1	Foci de γ H2AX inducidos por BLEO: curva dosis-respuesta, cinética de los foci y sensibilidad a los inhibidores de las quinasas ATM, ATR y DNA-PK	62

5.B.2	La señal de γ H2AX pan-nuclear no se suprimió por el tratamiento combinado con los inhibidores de las quinasas ATM, ATR y DNA-PK	65
5.B.3	Tanto los foci de γ H2AX endógenos como los inducidos por BLEO estaban organizados en subestructuras nanométricas	65
5.B.4	Segmentación nuclear de acuerdo al status de γ H2AX: el área promedio de los foci inducidos por BLEO duplicó el área promedio de los foci en controles	67
5.B.5	Los foci de γ H2AX inducidos por BLEO contenían en promedio casi el doble de nanofoci que los foci endógenos de células control	69
5.B.6	El núcleoplasma de células control y tratadas con BLEO presentaron nanofoci dispersos fuera de los foci de γ H2AX, los cuales fueron parcialmente sensibles a los inhibidores de quinasas	70
5.B.7	Presencia de (presuntos) nanofoci dispersos fuera de las ROI nucleares	73
6.B	Discusión (Parte 2)	74
7.	Conclusiones y Perspectivas	80
8.	Bibliografía	83
9.	Anexo: Publicaciones asociadas con esta tesis	95

1. Introducción

1.1 Cromatina: Eucromatina y Heterocromatina

El ADN en eucariotas se encuentra, en su mayor parte, circunscripto al núcleo celular, asociado con proteínas histónicas, no histónicas y ARN en forma de cromatina. El nucleosoma, la unidad de repetición básica de la cromatina consiste en 146 pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de histonas, el cual contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. A esta configuración de nucleosomas regularmente espaciados en el ADN se lo conoce como fibra de 11 nm. Se pueden distinguir dos tipos diferentes de cromatina en células eucariotas: la eucromatina y la heterocromatina (Heitz, 1928). Estos diferentes tipos de cromatina presentan propiedades características. Las regiones de eucromatina se encuentran más decondensadas (accesibles al tratamiento con nucleasas), son ricas en genes activos y replican tempranamente durante la fase S. En las regiones eucromáticas yacen los genes *housekeeping* y las secuencias moderadamente repetidas denominadas SINE (*short interspersed elements*) (Holmquist & Ashley 2006). Por el contrario, las regiones de heterocromatina presentan una organización mucho más compacta (definida por su baja accesibilidad a ADNasa I y enzimas de restricción), replican tardíamente durante la fase S y poseen, en general, muy baja actividad transcripcional (Cheung & Lau 2005).

A su vez, las regiones heterocromáticas pueden clasificarse en dos tipos: regiones de heterocromatina constitutiva y de heterocromatina facultativa. La heterocromatina constitutiva es un componente habitual de los genomas eucariotas (30 % en humanos y *D. melanogaster* y hasta un 90% en ciertos nemátodos) la cual está formada por un tipo particular de ADN, denominado ADN satélite. El ADN satélite se compone de un gran número de repetidos cortos en tándem, que pueden estar interrumpidos por elementos transponibles. Estas secuencias repetidas son altamente polimórficas presentando poca similitud entre especies (Dillon 2004). La heterocromatina constitutiva es estable, conservando sus propiedades heterocromáticas durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos.

La heterocromatina facultativa está formada por ADN silenciado presentando genes específicos de tejido (o sea, que se activan únicamente en determinados tipos celulares) y las secuencias moderadamente repetidas denominadas LINE (*long interspersed elements*). La heterocromatina facultativa se forma únicamente para silenciar genes en forma estable, pero retiene la potencialidad de interconvertirse entre heterocromatina y eucromatina. Uno ejemplo ampliamente estudiado de heterocromatina facultativa es la inactivación aleatoria, durante la embriogénesis temprana, de un cromosoma X en hembras de mamíferos, generándose una región (corpúsculo de Barr) altamente condensada dentro del núcleo. Los

agrupamientos de heterocromatina facultativa son variables en tamaño y pueden comprender desde cromosomas enteros (X inactivo) hasta unos pocos pares de bases (pb) en promotores de genes silenciados dentro de una región genómica particular (Trojer & Reinberg 2007).

A nivel citológico, las regiones de heterocromatina se localizan típicamente adyacentes a la envoltura nuclear, en bloques discretos en el interior nuclear y alrededor de los nucléolos. En contraposición, la eucromatina se localiza en las regiones nucleares remanentes (Sadoni et al. 1999; Cremer et al. 2006) (Figura 1, panel derecho). Aunque este patrón es el observado casi universalmente en núcleos interfásicos, se ha descrito también una organización nuclear invertida con implicaciones funcionales. En este sentido, los núcleos de los bastones de la retina en mamíferos con estilo de vida nocturno presentan una única gran masa de heterocromatina en la porción central del núcleo mientras que la eucromatina, transcripcionalmente activa, se localiza en la periferia. Este tipo de arquitectura nuclear invertida constituye una adaptación, específica de mamíferos, a la visión nocturna (Solovei et al. 2009). En mamíferos los diferentes tipos de cromatina pueden ser observados en cromosomas metafásicos mediante técnicas de bandeo. A este respecto, el bandeo C permite identificar las regiones de heterocromatina constitutiva mientras que los bandeos diferenciales (G- ó R-) permiten visualizar las regiones de heterocromatina facultativa (bandas G+) y de eucromatina (bandas R+) (Holmquist & Ashley 2006) (Figura 1, panel izquierdo).

Las histonas nucleosómicas pueden sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales a nivel epigenético como resultado de procesos de acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, etc, las cuales suceden, por lo general, en residuos aminoácidos específicos de sus extremos N-terminales. El gran número de combinaciones de cambios post-traduccionales potencialmente alcanzables genera un extenso repertorio de señales (epigenoma) para la regulación de los principales procesos nucleares, como, por ejemplo, la replicación, transcripción, reparación del ADN y la condensación cromosómica (Kouzarides 2007). A este fenómeno se lo ha denominado como el “código de histonas”.

Cada estado de la cromatina está asociado con un conjunto característico de modificaciones post-traduccionales. A saber, las regiones transcripcionalmente activas de eucromatina están enriquecidas en histonas H3 y H4 hiperacetiladas mientras que la heterocromatina, altamente condensada, contiene histonas predominantemente hipoacetiladas. La acetilación y desacetilación de histonas ocurre principalmente en lisinas de sus dominios N-terminal y están mediadas por acetil-transferasas y desacetilasas de histonas, respectivamente. Los mecanismos de acetilación/desacetilación resultan esenciales para el control de la expresión génica. Así, los complejos activadores de la transcripción tienen generalmente subunidades

con actividad acetil-transferasa mientras que los complejos represores subunidades con actividad desacetilasa de histonas.

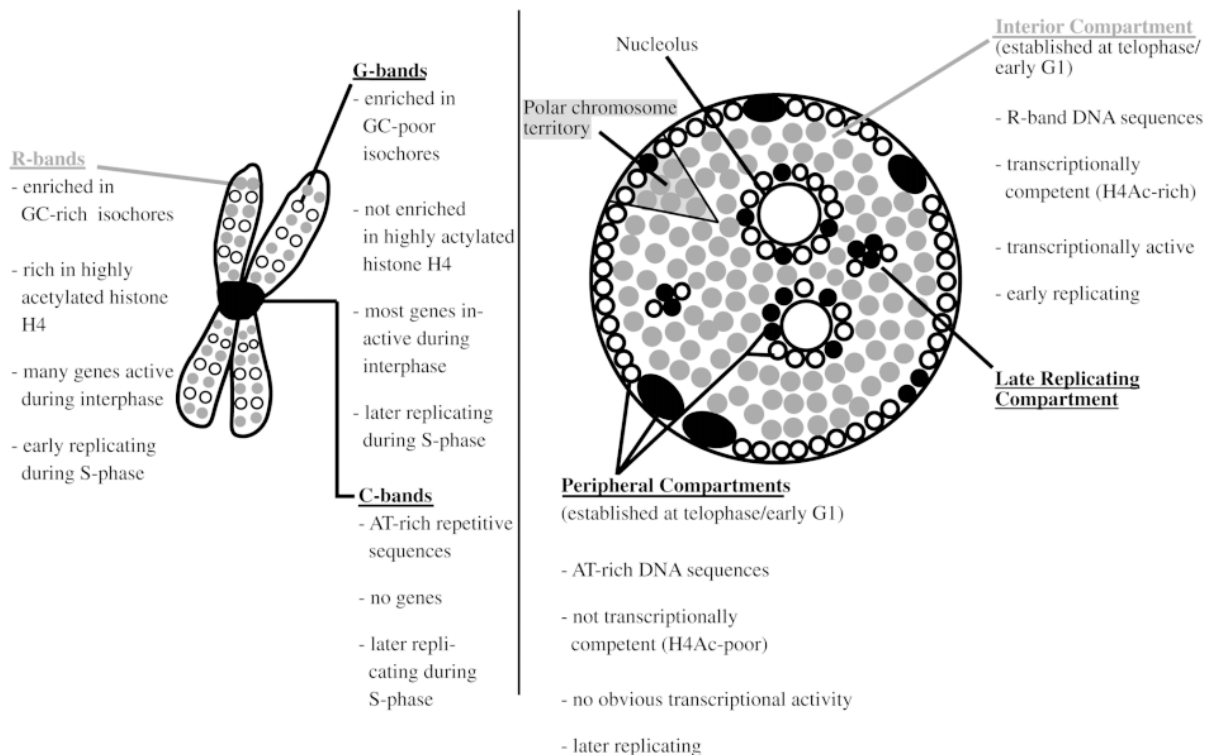


Figura 1.- Compartimentalización del genoma de mamíferos durante interfase y mitosis. Se muestran las propiedades características distintivas de la eu- y heterocromatina así como sus respectivas localizaciones en el núcleo interfásico y a nivel cromosómico (adaptado de Sadoni et al. 1999).

La eucromatina y heterocromatina presentan también, en sus residuos de lisina, patrones diferenciales de metilación de histonas. Estos procesos están mediados por metiltransferasas de histonas, enzimas que presentan una gran especificidad en comparación con las acetiltransferasas de histonas y, comúnmente, metilan una lisina específica de una histona en particular. Al contrario de lo que ocurre con la acetilación, la metilación de lisinas puede estar asociada con activación o represión transcripcional. Los residuos de lisina pueden ser, mono-, di- o trimetilados generando mayor diversidad funcional en cada sitio de metilación. La trimetilación en H3K4, H3K36 o H3K79 ocurre en regiones eucromáticas y aparece asociada con activación transcripcional. Por el contrario, la trimetilación en H3K9, H3K27 y H4K20 es propio de la heterocromatina y se relaciona con represión transcripcional (Bartova et al. 2008).

Los patrones epigenéticos característicos de la eucromatina y heterocromatina se han utilizado para inmunodetectar, utilizando anticuerpos específicos contra modificaciones epigenéticas específicas, los dominios eu- o heterocromáticos tanto en núcleos interfásicos

(Zinner et al. 2006, Skalnikova et al. 2007) como en cromosomas mitóticos (Martínez-López et al. 2001).

Otro nivel de complejidad en el código de histonas está dado por la presencia de variantes de histonas que pueden sustituir, en los nucleosomas, a las histonas canónicas H2A, H2B, H3 o H4 y experimentar también modificaciones post-traduccionales (Henikoff & Ahmad 2005). Una de las más estudiadas, es la variante de la histona H2A denominada H2AX, la cual, sufre una modificación post-traducciona en un residuo de su extremo C-terminal en respuesta a algunos tipos de daño genético primario (Rogakou et al. 1998; ver sección 1.3).

1.2 Daño Genético

La molécula de ADN puede sufrir diversos tipos de daño, ya sea endógenamente o producido por agentes exógenos. El daño endógeno puede generarse por: *i)* errores en la replicación que generan sustituciones, inserciones o deleciones de bases; *ii)* procesos espontáneos como desaminación de bases, generación de sitios abásicos, metilación de adeninas o guaninas y *iii)* lesiones de base por especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) (Chatterjee & Walker 2017). Por otro lado, el ADN puede ser dañado por agentes exógenos de naturaleza biológica, química o física. Ejemplos relevantes de estos agentes son: los virus con capacidad mutagénica, las radiaciones ionizantes de alta LET (*linear energy transfer*) como iones pesados, partículas α , etc. o baja LET (rayos X, β y γ), la radiación UV, los agentes alquilantes (metilmetanosulfonato, etc.), de entrecruzamiento (hidrocarburos policíclicos y aminas aromáticas) o aquellos que interfieren con la acción de las topoisomerasas I (camptotecina) y II (etopósido).

Luego de producido el daño, se inicia la denominada “respuesta al daño en el ADN” (*DNA damage response*, DDR) por parte de proteínas sensoras específicas de lesión. La DDR es el conjunto de mecanismos de vigilancia del genoma encargados de percibir el daño en el ADN, señalar su presencia y promover la reparación subsecuente (Polo & Jackson 2011). El reclutamiento y montaje de los factores de la DDR en el sitio de daño es un proceso regulado a nivel espacio-temporal, donde cada componente se une secuencialmente en forma ordenada (Ciccio & Elledge 2010). Dependiendo del tipo de daño se activan diferentes vías de reparación. Las vías más importantes son: *i)* la reparación por escisión de bases (*base excision repair*, BER) en respuesta a daños de base única (que no generan distorsiones significativas de la doble hélice); *ii)* la reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER) para remover lesiones voluminosas como los dímeros de pirimidina (CPD) y los (6-4) fotoproductos inducidos por la radiación UV; *iii)* la reparación por mal apareamiento de bases (*mismatch repair*, MMR) en respuesta a *mismatch* de bases; *iv)* la vía SSBR (*single stranded break repair*) para la reparación dependiente de PARP-1 de rupturas de cadena simple del ADN (*single-strand break*, SSB) y *v)* la recombinación

homóloga (*homologous recombination*, HR) y la reparación por unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) para reparar rupturas de doble cadena en el ADN (*double-strand break*, DSB) (detalladas en Chatterjee & Walker 2017).

1.2.1 Rupturas de cadena doble en el ADN

Las DSB son el tipo de lesión más crítica en la molécula de ADN ya que puede comprometer directamente la integridad del genoma. Si la lesión no es reparada, o es incorrectamente reparada, puede conducir a muerte celular o la generación de aberraciones cromosómicas, inestabilidad genómica y transformación oncogénica. La no resolución de DSB está asociada en humanos a cáncer y otras enfermedades (Jackson & Bartek 2009).

Las DSB pueden ser inducidas por agentes físicos (principalmente radiaciones ionizantes) o químicos, incluyendo compuestos radiomiméticos como la bleomicina (BLEO) y la neocarzinostatina o inhibidores de la enzima topoisomerasa II, como el etopósido. También, pueden generarse DSB en la fase S del ciclo celular, cuando las horquillas de replicación se encuentran con otras formas de daño en el ADN, como modificaciones de bases y uniones cruzadas. Adicionalmente, algunos procesos endógenos, como la replicación del ADN, la transcripción, el plegamiento 3D del genoma (Bouwman & Crosetto 2018), la recombinación de segmentos V(D)J en genes de timocitos inmaduros (Chen et al. 2000) y la recombinación meiótica en células germinales (Jackson & Bartek 2009) pueden producir DSB. Asimismo, estas lesiones pueden ser causadas por el ataque de ROS (Giloni et al. 1981).

Las células eucariotas han desarrollado dos vías principales para la reparación de las DSB: la recombinación homóloga (HR) y la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). A su vez la NHEJ presenta dos variantes, la NHEJ canónica (c-NHEJ) y la alternativa (A-NHEJ) (Deriano & Roth 2013). La HR requiere la presencia de un molde homólogo no dañado (usualmente una cromátida hermana) para reparar las DSB, siendo por ello activa en las fases S y G2 del ciclo celular. Al utilizar un molde homólogo permite una reparación con muy pocos errores. Esta vía implica una manipulación significativa del ADN pues ocurren procesos de resección (*resection*) de hebras en la molécula dañada, invasión de una de las hebras intactas, la formación de un D-loop, síntesis *de novo* de ADN y finalmente la resolución del intermediario de Holliday (Figura 2A). Un paso clave en la iniciación de la HR es la resección, en la cual se generan extensas regiones de ADN simple hebra (*single-strand DNA*, ssADN), el intermediario crítico para comenzar el emparejamiento de hebras homólogas (Symington & Gautier 2011). La resección es comenzada por el complejo MRN, CtIP y BRCA1. Posteriormente, ocurre una ampliación de la resección dependiente de DNA2, la exonucleasa EXO1 y la helicasa BLM, lo cual culmina con la generación de extensas regiones de ssADN. Sobre estas regiones se une la proteína RPA y posteriormente BRCA2. BRCA2 facilita la unión de RAD51, la cual forma un filamento sobre

el ssDNA. Este filamento de ADN cubierto de RAD51 cataliza la búsqueda de secuencias homólogas y la invasión e intercambio de hebras para restituir la integridad del ADN (Gupta et al. 2014).

Por otro lado, el NHEJ se basa en la religación directa de los extremos de ADN rotos, sin gran requerimiento de homología de secuencia entre ellos. Al no requerir un molde de ADN para operar esta vía es propensa a la generación de errores en el sitio de reparación, tales como pequeñas inserciones y/o deleciones. En eucariotas superiores, la vía c-NHEJ es la predominante. Actúa en todas las fases del ciclo celular, aunque es principalmente relevante durante G1 y comienzo de fase S (Deriano & Roth 2013). En comparación con la HR implica un procesamiento mínimo de los extremos de ADN. Como se detalla en la Figura 2B, en la c-NHEJ los extremos de ADN son inmovilizados por el heterodímero Ku70/Ku80 quien recluta a la DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) para formar la holoenzima DNA-PK. Sobre estos extremos yuxtapuestos actúan luego varios factores como la nucleasa Artemis, entre otros, previo a la ligación de los mismos por el complejo XRCC4-Ligasa IV-XLF (Figura 2B). Las actividades antagónicas de 53BP1 y BRCA1 definen que vía se utilizará para la reparación. 53BP1 estimula la c-NHEJ, mientras que BRCA1 promueve la resección de extremos en la vía HR (Gupta et al. 2014).

Asimismo, se han descrito vías alternativas del NHEJ (colectivamente denominadas a-NHEJ) menos operativas, aunque particularmente activas cuando la c-NHEJ está obstruida por algún factor (como falta de alguno de sus componentes). Estos mecanismos de a-NHEJ presentan algunos factores en común con la HR y dependen frecuentemente de que haya microhomologías de secuencia para la reacción de unión (en ese caso subtipo *microhomology-mediated end joining*, MM-EJ) (Seol et al. 2017) (Figura 2C).

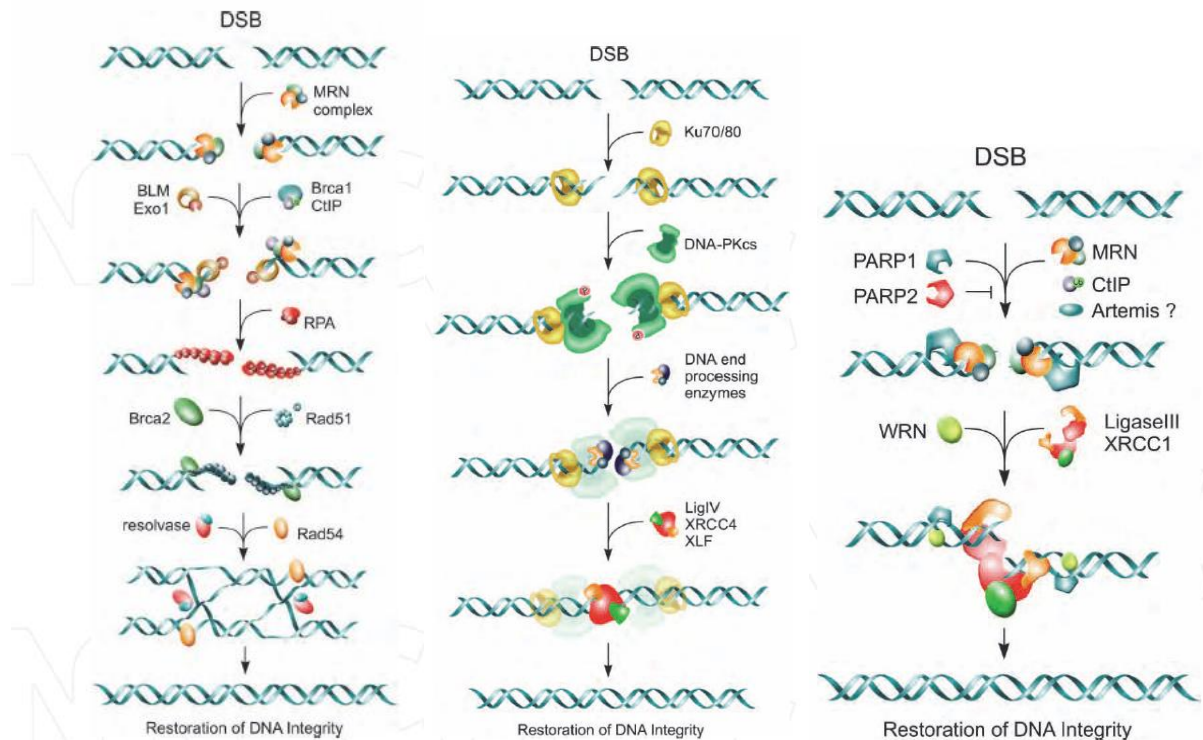


Figura 2.- Mecanismos de reparación de las DSB en eucariotas superiores. Se esquematizan los 3 mecanismos principales así como sus componentes más destacados. (A) Recombinación homóloga (HR); (B) reparación por unión de extremos no homólogos canónica (c-NHEJ) y (C) reparación por unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ) (adaptado de Mladenov & Iliakis 2011).

1.3 Foci de γ H2AX

Como se mencionó en la sección anterior, las células responden al daño en el ADN activando una serie de vías de señalamiento que se denominan colectivamente “respuesta al daño en el ADN” (DDR, *DNA damage response*) cuyo objetivo es restaurar la integridad en el ADN y mantener la estabilidad genómica. Las lesiones en el ADN ocurren en el contexto de la cromatina, por lo cual, los procesos de remodelamiento y de modificación epigenética de la misma constituyen reguladores esenciales de la DDR.

En este sentido, la modificación cromatínica más importante en respuesta a DSB (Rogakou et al. 1998) o a horquillas de replicación estancadas (Ward & Chen 2001) es la fosforilación de la variante de la histona H2A, denominada H2AX, en un residuo de serina conservado cercano al extremo C-terminal de la molécula (Ser-139 en humanos), generando γ H2AX. En mamíferos, la variante H2AX representa de un 2-25% del total de histona H2A dependiendo de la línea celular y del tejido examinado y está presente en una misma proporción en regiones de eu- y heterocromatina (Cowell et al. 2007).

La fosforilación comienza a los pocos minutos luego de la inducción de daño en el ADN, alcanza un máximo (*plateau*) 15-60 min más tarde, y posteriormente decae constantemente

(Kinner et al. 2008). La fosforilación de H2AX no se limita a la inmediata vecindad de la lesión, sino que se expande bidireccionalmente en una región extensa de cromatina a su alrededor (1-2 Mb de cromatina conteniendo ~2000 moléculas de γ H2AX) (Rogakou et al. 1998; 1999), no siendo la expansión necesariamente simétrica en torno a la lesión (Iacovoni et al. 2010). Esto permite que estas regiones puedan ser inmunodetectadas en forma específica como *foci* de γ H2AX microscópicamente visibles ($\varnothing$ ~0.4-1.0 μ m) empleando microscopía de fluorescencia estándar. La modificación de H2AX en respuesta a la inducción de daño es un mecanismo evolutivamente conservado desde levaduras a humanos (Downs et al. 2004). Se ha evidenciado que, aunque la presencia de γ H2AX no es requerida para el reconocimiento inicial del daño, es crítica para un reclutamiento eficiente y/o la retención de factores de reparación del ADN en la lesión, amplificando así el señalamiento del daño en el ADN (Celeste et al. 2003). Estos autores evidenciaron que células MEF H2AX^{-/-} (deficientes en H2AX) irradiadas con rayos X eran capaces de reparar DSB y detener su progresión a través del ciclo celular. No obstante, presentaban defectos en la reparación de lesiones persistentes siendo las células deficientes en H2AX más radiosensibles que las células salvajes. Comprobaron también que ratones mutantes para H2AX presentaban una disminución en la estabilidad genómica y una susceptibilidad aumentada a diversos mutágenos.

Así, los *foci* no serían indispensables para el reclutamiento inicial de proteínas y las etapas tempranas de reparación y señalización. Sin embargo, la presencia de los *foci* de γ H2AX modificaría la organización de la cromatina a nivel local, incrementando la accesibilidad al ADN de los factores de reparación en el entorno de la lesión, colaborando así a concentrar y retener estas proteínas en la vecindad de las DSB.

El ensamblado coordinado de proteínas de la DDR en los sitios de DSB genera *foci* de reparación del ADN, los cuales incluyen al complejo MRN (Mre11-Rad50-NBS1), MDC1, 53BP1, BRCA1, RPA y ATRIP entre otros factores (Bekker-Jensen & Mailand 2010) (ver Figura 3). Por otra parte, en las horquillas de replicación estancadas se genera la inhibición de la replicación del ADN y se forma γ H2AX colocalizando con PCNA, ATRIP, 53BP1, BRCA1, etc. (Tibbetts et al. 2000).

La fosforilación de H2AX a γ H2AX en el entorno de los sitios de lesión es mediada por ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (ATM and Rad3-related) y DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase), las cuales son miembros de la familia de quinasas de proteínas de tipo fosfatidilinositol-3 PI3K (PhosphatidyInositol 3-Kinases). Estas quinasas forman parte de un sistema de monitoreo que detecta el daño en el ADN, genera una cascada de señalamiento y recluta enzimas de reparación a los sitios de daño. Diversos estudios han permitido establecer los factores fundamentales en la activación de cada quinasa. ATM y DNA-PK

fosforilan H2AX en respuesta a las DSB inducidas directamente. Se ha postulado que ATM es la principal quinasa implicada en la fosforilación de H2AX en las DSB, mientras que DNA-PK juega un rol secundario (Burma et al. 2001). Estos autores observaron que la fosforilación de H2AX *in vivo* se hallaba prácticamente ausente en células *Atm*^{-/-} (sin alelos para el gen *Atm*) mientras que era normal en células *DNA-PKc*^{-/-} (sin alelos para este gen); sugiriendo a ATM como la principal quinasa asociada con la fosforilación de H2AX bajo condiciones fisiológicas normales. Otros autores han sugerido una importancia similar de ambas quinasas en este proceso, actuando en forma redundante y solapante (Stiff et al. 2004).

El complejo MRN recluta ATM hacia los extremos de ADN rotos mediante múltiples interacciones directas proteína-proteína, contribuyendo además con su activación (Lee & Paull 2005). En lo que respecta a DNA-PK, la holoenzima se forma luego del reclutamiento de la subunidad catalítica de DNA-PK (DNA-PKcs) por parte del heterodímero Ku70/Ku80, componente importante del sistema de reparación NHEJ (Falck et al. 2005). En cualquier caso, la fosforilación de H2AX a γ H2AX facilita el reclutamiento y ensamblado en los *foci* de proteínas de señalamiento del daño, control del ciclo celular y reparación del ADN. En contraposición, en los lugares de horquillas de replicación estancadas, la fosforilación de H2AX es mediada por ATR (Ward & Chen 2001). ATR es activada por las regiones de ssADN asociadas a bloqueos de la replicación, a través de su reclutamiento vía ATRIP (Cortez et al. 2001). La activación de ATR requiere un fragmento considerable de ssADN no siendo activada por *nicks* de simple hebra o pequeños *gaps*.

Es de mencionar que, aparte de la organización nuclear de γ H2AX en *foci* de reparación del ADN, se ha descrito en algunos casos la existencia de una fosforilación generalizada pan-nuclear de γ H2AX que involucra regiones no dañadas de cromatina. Este fenómeno ha sido observado cuando se induce un daño considerable en el ADN por irradiación de alta LET con iones pesados (Meyer et al. 2013) o por irradiación UV de células replicantes (de Faraudy et al. 2010). Asimismo, Solier et al. (2009) han descrito en células apoptóticas inducidas por exposición a TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), la presencia de señales de γ H2AX en forma de anillo (*ring-shaped*) cubriendo las regiones de heterocromatina periférica, las cuales evolucionan a una marcación pan-nuclear de γ H2AX. Este tipo de marcación pan-nuclear de γ H2AX es regulada por un conjunto de quinasas diferentes a ATM, ATR y DNA-PK, que incluyen a Mst-1 en la muerte celular dependiente de JNK1/caspasa-3 (Cook et al. 2009), y a la MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) p38 en una vía apoptótica dependiente de esta proteína (Dong et al. 2014).

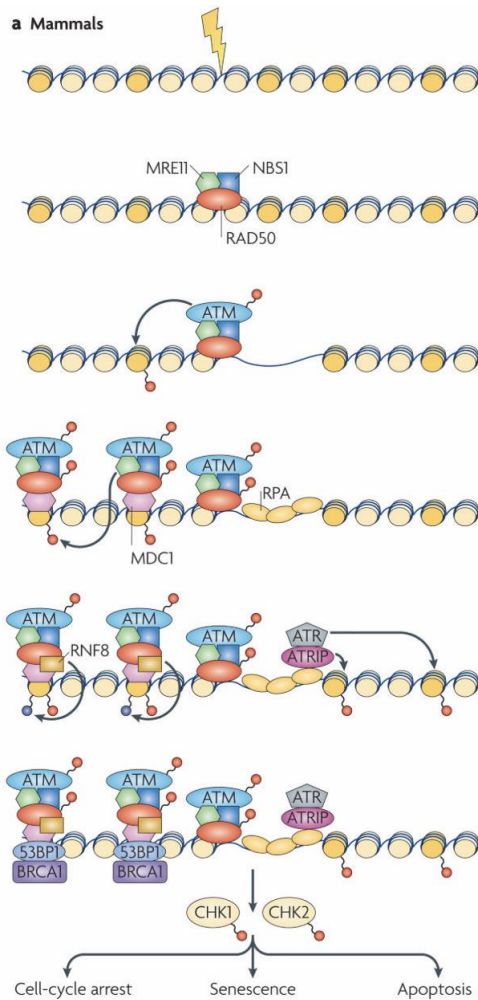


Figura 3.- Ensamblaje de los complejos de señalización/repación de DSB en células de mamíferos. La presencia de una DSB es inicialmente detectada por el complejo MRN. Esto genera la activación de la quinasa ATM, la cual se asocia al ADN y fosforila a H2AX. Este evento provoca la unión de MDC1, que se une a γ H2AX. MDC1 recluta copias adicionales de MRN y ATM, provocando la expansión sobre el ADN de la maquinaria de señalización y reparación. MDC1 recluta también a la ubiquitina-ligasa RNF8, quien atrae factores *downstream* como 53BP1 y BRCA1. El ADN experimenta luego una resección a ssADN y es reconocido por RPA, lo cual resulta en la incorporación de ATR vía ATRIP. Ya sea independientemente o en forma mancomunada, ATM y ATR conducen a la activación de las quinasas de control CHK1 y CHK2 (adaptado de Misteli & Soutoglou 2009).

Luego de la reparación del daño las modificaciones de histonas y los cambios en la cromatina inducidos durante el proceso de reparación deben ser revertidos. En este sentido, parece ocurrir tanto una defosforilación directa de γ H2AX *in situ* por las fosfatasas PP2A (Chowdhury et al. 2005) y PP4 (Nakada et al. 2008) como la defosforilación por la sustitución de moléculas de γ H2AX en la cromatina dañada por nuevas moléculas de H2AX no modificadas (Svetlova et al. 2007). Chowdhury et al. (2005) evidenciaron que la subunidad catalítica de PP2A colocalizaba con γ H2AX en los *foci* de daño y que el silenciamiento de PP2A retardaba la cinética de eliminación de γ H2AX. PP4, por otra parte, tendría el rol de defosforilar γ H2AX principalmente en el caso de γ H2AX asociadas a ATR. Finalmente, experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) usando

proteínas recombinantes GFP-H2AX sugieren que ocurre, al menos parcialmente, defosforilación de γ H2AX asociada al daño en regiones del nucleoplasma lejanas al sitio de DSB correspondiente (Svetlova et al. 2007).

1.3.1 Detección y visualización de foci de γ H2AX

Como mencionamos anteriormente, la fosforilación de H2AX a γ H2AX se expande una distancia considerable (rango en Mb) alrededor de la lesión lo cual ha permitido visualizar espacialmente las DSB como *foci* discretos en núcleos interfásicos o cromosomas mitóticos mediante anticuerpos específicos marcados con fluoróforos que reconocen el residuo fosforilado de γ H2AX. Esta aproximación es altamente sensible, permitiendo detectar DSB incluso cuando existen pocas lesiones en el ADN.

Mediante la toma de imágenes por microscopía láser confocal (ver las secciones de Materiales y Métodos y Resultados) y el ulterior uso de programas de procesamiento de imágenes (como el FIJI o ImageJ) puede determinarse, por ejemplo, su número y localización dentro del núcleo, su distribución en tamaño e intensidad de fluorescencia, así como su correlación espacial con otras proteínas.

Esta metodología ha complementado los métodos fisicoquímicos tradicionales de cuantificación de DSB basados en la reducción en el tamaño de las moléculas de ADN asociado al daño, como la electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa) o la electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis*, PFGE). Estos métodos no permiten estimar fácilmente el número de DSB y presentan una relativa baja sensibilidad en comparación con la inmunodetección de γ H2AX (Rothkamm & Löbrich 2003). Por estos motivos, la detección y cuantificación de γ H2AX por inmunocitoquímica se ha convertido en el procedimiento estándar para evaluar la inducción y reparación de DSB, generadas tanto directa como indirectamente.

El uso de γ H2AX como indicador de DSB, presenta, no obstante algunos inconvenientes: 1) como ya se ha mencionado, la generación de regiones de tamaño considerable de ssDNA asociadas a estrés de replicación puede conducir también a la formación de *foci* (Ward & Chen 2001); 2) H2AX puede ser fosforilada independientemente de la inducción de daño genético durante la condensación cromosómica que ocurre en fase G2/M (Ichijima et al. 2005; McManus & Hendzel 2005); 3) la cinética de reparación de las DSB no se corresponde con exactitud con la cinética de formación/desaparición de los *foci* (Kinner et al. 2008). El número de *foci* se incrementa gradualmente durante los primeros 15-60 minutos post-irradiación pese a que los resultados obtenidos por ensayo cometa o PFGE evidencian que, en ese lapso, la mayoría de las DSB han sido reparadas. Así, la ausencia de *foci* visibles no se correlaciona exactamente con el fin la reparación del ADN sino que

evidenciaría el tiempo adicional necesario (1-2 h) para reconstruir totalmente la estructura cromatínica; 4) aunque los primeros estudios sugerían una relación próxima a 1:1 entre DSB inducidas por irradiación a baja LET y el número de *foci* observados (Rogakou *et al.* 1999; Rothkamm & Löbrich 2003); estudios posteriores, empleando también radiaciones de alta-LET, demostraron una subestimación en el número de *foci* en relación a las DSB inducidas (resumidas en Falk *et al.* 2010). Se ha postulado que el agrupamiento (*clustering*) de DSB post-inducción de daño podría explicar, al menos parcialmente, este hallazgo.

1.4 Bleomicinas

Las bleomicinas son una familia de glicopéptidos estrechamente relacionados, aislados originariamente en *Streptomyces verticillus* por Umezawa *et al.* (1966). Debido a su genotoxicidad, han sido extensamente utilizadas en quimioterapia para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como cáncer de testículo, cabeza, cuello, ciertos tipos de linfomas y los carcinomas de células escamosas (Galm *et al.* 2005). Los miembros de esta familia comparten una misma estructura central pero difieren en los extremos con cargas positivas que poseen (Figura 4). Las BLEO requieren un metal de transición reducido (Fe (II) o Cu (I)), oxígeno y un agente reductor de un electrón para generar una BLEO activa. La forma activada puede autodestruirse, oxidar lípidos, hidrolizar enlaces amida en proteínas y clivar secuencias específicas en el ARN y ADN; en el último caso a través de una vía dependiente de radicales libres (Chen & Stubbe 2005).

En su estructura molecular poseen varios dominios funcionales: el dominio de unión a metales, la región de conexión (*linker*), la cola bitiazólica y el disacárido (Figura 4). El dominio de unión a metal contiene los ligandos (átomos de nitrógeno) involucrados en la formación de un complejo octaédrico con los metales de transición. Los grupos amino N3 y N4 del grupo pirimidínico definen la especificidad de secuencia de la ruptura en el ADN blanco, uniéndose a los grupos amino N3 y N2 de una guanina en 5' respecto al sitio de ruptura pirimidínico (conocido como la regla 5'-G-Py-3'). Este grupo pirimidínico, interactuando en colaboración con el extremo bitiazólico, es responsable de la unión al ADN. La unión puede ocurrir por intercalamiento o por interacciones con el surco menor. Los grupos cargados positivamente del extremo bitiazólico potencian la unión electrostática de BLEO al ADN. La región de conexión es esencial también para un eficiente clivaje de doble cadena (Chen & Stubbe 2005). Se ha demostrado *in vitro* que en humanos las secuencias de ADN telomérico constituyen un blanco preferencial de la BLEO (Nguyen & Murray 2012). Este mismo grupo, empleando secuenciación del ADN a escala genómica sobre los sitios de inicio de la transcripción (TSS, Transcription Start Sites) de cada gen, demostró que los

genes en activa transcripción eran clivados por BLEO preferencialmente en comparación con los genes no transcritos (Murray et al. 2014).

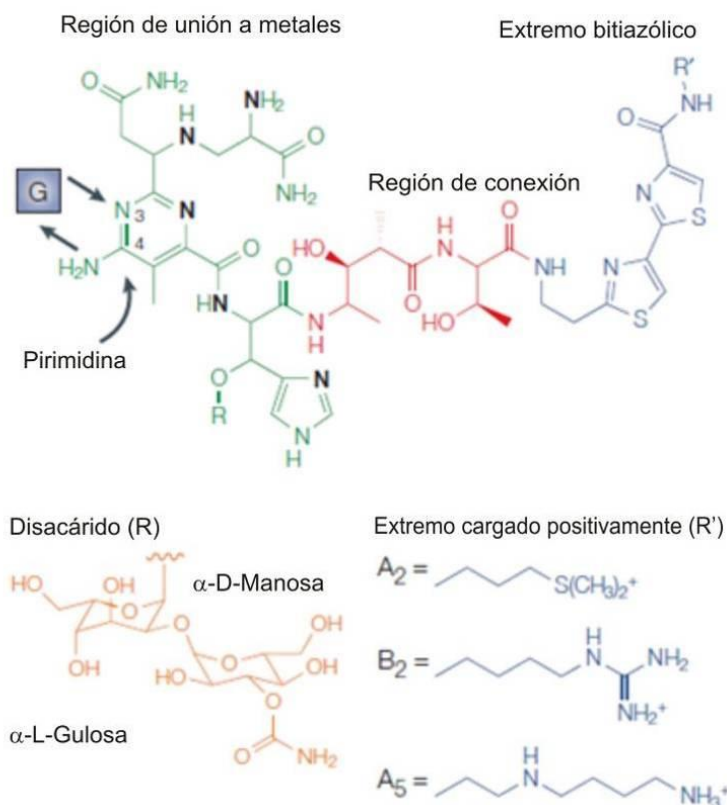


Figura 4.- Estructura y organización en dominios de las BLEO. En la imagen superior se muestran el dominio de unión a metales (verde), los átomos de nitrógeno que coordinan con el metal (negro), la región *linker* de conexión (rojo) y la cola bitiazólica (azul). En la imagen inferior se muestran el disacárido (R, en naranja) y ejemplos de colas cargadas positivamente (R') para los integrantes de la familia A2, B2 y A5.

La BLEO puede catalizar la formación de SSB y DSB, generando un tipo de daño similar al observado por radiaciones ionizantes. De acuerdo a la secuencia de ADN involucrada, el cociente SSB/DSB fluctúa de 6:1 a 20:1. Las DSB inducidas son la principal causa de citotoxicidad de la droga, induciendo diferentes tipos de muerte celular dependiendo de la dosis. A bajas dosis, las células se acumulan en G2/M y sufren una muerte celular mitótica lenta, mientras que a altas dosis la droga puede actuar como una micronucleasa, generando DSB generalizadas y el rápido desencadenamiento de un proceso apoptótico (Tounekti et al. 2001). Se ha verificado resistencia a la BLEO tanto en tejidos normales como tumorales, asociada a su inactivación metabólica por la enzima BLEO hidrolasa (Galm et al. 2005). Es de mencionar que este compuesto no interferiría con la síntesis de ADN (Tobey 1972; Liddle et al. 2014), aunque se ha demostrado que produce un retraso en el ciclo celular durante la fase G2 (Tobey 1972; Barlogie et al. 1976).

Su efecto en el ADN fue inicialmente comparado con el inducido por radiaciones ionizantes de baja LET, como los rayos X o rayos γ (Henner et al. 1982), los cuales generan principalmente DSB únicas (*single DSB*). Trabajos más recientes han reportado, no obstante, un impacto heterogéneo de la BLEO, produciendo también DSB agrupadas (*clustered DSB*) (Regulus et al. 2007), las cuales están normalmente asociadas a radiaciones ionizantes de alta LET, como son las partículas α y los iones de carbono (Schipler & Iliakis 2013).

La BLEO activada se forma por la unión de la molécula a Fe (II) ó Cu (I), seguido por la unión del oxígeno y la reducción por un agente reductor. Este intermediario tiene un tiempo de vida media corto (unos pocos minutos) y es responsable de iniciar el daño en el ADN (Figura 5a). Las SSB y DSB son iniciadas por la BLEO activada a través de la remoción del átomo de hidrógeno 4' del C4' del grupo desoxirribosa de una pirimidina ubicada en dirección 3' respecto a una guanina en el ADN. Este evento comienza el proceso de clivaje de hebra simple. Dependiendo de la disponibilidad de O₂ este intermediario radical 4' puede evolucionar según dos vías diferentes: i) el intermediario es oxidado a un 4' carbocatión generando, por adición de agua, un sitio abásico oxidado en 4' o ii) el intermediario 4' radical reacciona con O₂ formando un radical 4'-peroxi que luego es reducido a 4'-hidroperóxido. Este grupo sufre una serie de transformaciones químicas *a posteriori* generando, en última instancia, un ADN con un *gap* con extremos 3' fosfoglicolato/5' fosfato (3'-PG/5'-P) y una pirimidina propenal (Figura 5b).

La propia molécula de BLEO, luego de generar el *gap* en el ADN y ser reactivada, sería capaz de generar un segundo clivaje provocando la doble ruptura (Povirk et al. 1989). Estudios de NMR han sugerido como la molécula de BLEO podría efectuar una DSB sin disociarse del ADN (Vanderwall et al. 1997). El modelo implica en primer lugar la unión al ADN, por intercalamiento parcial del extremo bitiazólico, de la BLEO en dirección 3' respecto al primer sitio de ruptura. Luego, la molécula de BLEO sería reposicionada a la segunda hebra por rotaciones secuenciales alrededor del enlace C-C que conecta los dos anillos tiazólicos y alrededor del eje perpendicular al anillo bitiazólico. Resultados posteriores mostraron que múltiples modos de unión de una única molécula de BLEO puede llevar al clivaje de doble cadena (no sólo el intercalamiento parcial originalmente propuesto) y también que este tipo de rupturas puede estar mediadas por dos moléculas de BLEO (Chen et al. 2008).

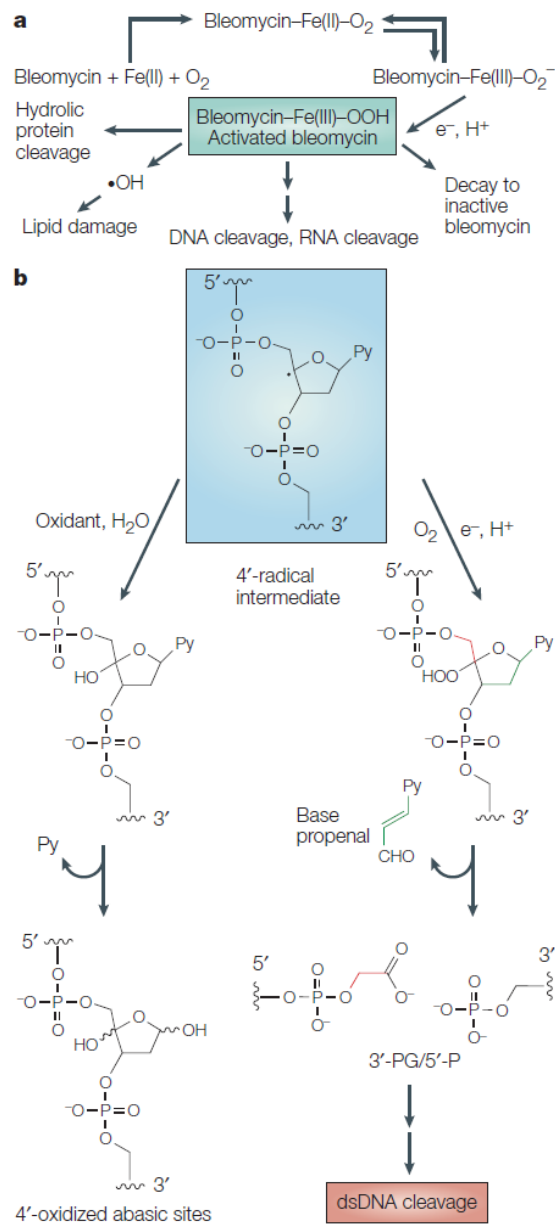


Figura 5.- Formación de la BLEO activada (panel a) y mecanismo inicial de clivaje del ADN por parte de esta molécula que conduce a la generación de SSB o DSB (panel b) a partir del intermediario 3' fosfoglicolato/5' fosfato (3'-PG/5'-P).

1.5 Hidroxiurea

La hidroxiurea (HU) es un compuesto sintético de estructura sencilla (Figura 6), el cual inhibe indirectamente la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de ADN, interfiriendo químicamente con la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa (Krakoff et al. 1968; Nordlund & Reichard 2006). Esta enzima convierte nucleótidos di- y tri-fosfatos en desoxinucleótidos di- y tri-fosfatos, siendo este paso el limitante en su síntesis. Como es esperable, sin un adecuado nivel de dNTPs, el ADN no puede ser correctamente replicado ni reparado (Håkansson et al. 2006).

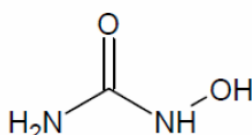


Figura 6.- Estructura de la molécula de hidroxiurea

HU actúa sobre un radical tirosil de una de las subunidades reguladoras pequeñas (R2) de la ribonucleótido reductasa, lo cual inactiva la actividad enzimática de la misma (Reichard 1988). En la clínica, ha sido utilizada para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes (anemia drepanocítica), la trombocitosis, desórdenes mieloproliferativos y psoriasis (Singh & Xu 2016). En cultivos asincrónicos de células murinas 3T6 se ha verificado una inhibición completa de la ribonucleótido reductasa ya a bajas concentraciones y tiempos de incubación con este compuesto (Bianchi et al. 1986) (0.1 mM por 10 min; también 3 mM por 5 min). Esto genera la inhibición en la síntesis de ADN y la consecuente detención selectiva de las células en fase S. Debido a que su efecto es fácilmente reversible, HU ha sido utilizada ampliamente en la investigación como un agente de sincronización en cultivos celulares.

HU retarda el inicio de la replicación y también provoca el bloqueo en la progresión de las horquillas de replicación localizadas sobre la hebra de ADN. La alteración en la progresión de las horquillas de replicación puede conducir a lo que se denomina estrés de replicación (*replication stress*) y eventualmente, a un posterior daño en el ADN (Zeman & Cimprich 2014). El daño asociado al estrés de replicación sería el responsable absoluto del daño cromosómico y el efecto citotóxico observado con este agente.

Se han descrito varios mecanismos (DNA Damage Tolerance, DDT) que son capaces de evitar que se establezca este estrés en forma estable, permitiendo el rápido reinicio de las horquillas de replicación (Chang & Cimprich 2009). Uno de ellos es la síntesis translesión (TransLesion Synthesis; TLS), la cual implica un cambio de polimerasas, pasándose de las polimerasas replicativas convencionales a las polimerasas translesión, las cuales son capaces de continuar con el proceso de replicación a través de la lesión. Estas polimerasas

poseen una baja fidelidad hacia la hebra de ADN molde siendo por tanto un mecanismo de DDT propenso a errores (*error-prone*). Otro mecanismo de DDT, es el denominado cambio de molde (*Template Switching*, TS), el cual es libre de error. Este proceso utiliza la nueva hebra de ADN sintetizada del dúplex hermano como molde de ADN no dañado. Estos procesos aseguran una reanudación rápida de la síntesis de ADN, evitando el estancamiento prolongado de las horquillas de replicación.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las características del estrés de replicación es la generación de regiones de ssDNA. Se ha observado que el tratamiento con HU produce este tipo de regiones con un largo extra de ~100 nt (Sogo et al. 2002). Las regiones de ssDNA conducen a la generación de γ H2AX dependiente de ATR y RPA; activándose los mecanismos de señalamiento del daño asociados a la vía ATR/CHK1 (ver sección 1.3). La activación de esta vía provoca la detención del ciclo celular y la supresión de nuevos inicios de replicación tardíos (ver sección 1.7), proveyendo así de tiempo adicional para poder resolver adecuadamente el estrés de replicación y así completar adecuadamente el proceso de replicación del ADN. ATR posee también un rol directo en la estabilización y el reinicio de las horquillas detenidas.

A pesar de las múltiples respuestas que las células inician para estabilizar y reiniciar una horquilla de replicación detenida, la horquilla puede fracasar en su intento de reinicio y colapsar, generándose horquillas de replicación estancadas (*stalled replication forks*). Esto ocurre, en particular, frente a un estrés de replicación persistente o la pérdida de componentes de la respuesta frente a este estrés.

En ausencia de reparación (en particular en ausencia de ATR) las horquillas de replicación colapsadas son inestables y pueden desembocar en la generación de DSB *in situ* e inestabilidad genómica. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el procesamiento de las horquillas detenidas a DSB (ver Zeman & Cimprich 2014). En relación a inestabilidad genómica, se ha determinado que la HU induce un espectro específico de sitios frágiles, denominados *Early Replicating Fragile sites* (ERFs) (Barlow et al. 2013).

1.6 Estructura de la cromatina y daño genético

Diversos trabajos han demostrado que el nivel de condensación de la cromatina impacta sobre la sensibilidad de las células a los agentes clastogénicos y sobre los mecanismos de reparación del daño genético inducido. Inicialmente fueron estudios que evaluaban las frecuencias de aberraciones cromosómicas inducidas en cromosomas mitóticos los que evidenciaron una asimetría en la susceptibilidad de la eu- y heterocromatina a diferentes clastógenos. A este respecto, resultados previos de nuestro grupo evidenciaron un mapeo preferencial de sitios de fractura cromosómica inducidos por el tratamiento con endonucleasas (ADNasa I, *AluI*, *BamHI*) o radiaciones ionizantes (neutrones y rayos γ) sobre bandas G-claras eucromáticas (Folle et al. 1997; Folle et al. 1998), hiperacetiladas (Martínez-López et al. 2001) y de alta expresión génica (Folle et al. 2010). En este último trabajo, se mapearon sobre idiogramas de cromosomas humanos (850 bandas) las regiones de cromatina hiperacetilada ($H4^{+a}$), RIDGE, antiRIDGE y los sitios de fractura generados por radiaciones ionizantes. Se denomina RIDGE (*Regions of Increased Gene Expression*) a las regiones del genoma humano que presentan una alta actividad transcripcional (10-15% del genoma) (Caron et al. 2001; Versteeg et al. 2003), siendo los antiRIDGE, por contraposición, las regiones que contienen un bajo número de genes. Este estudio reveló una localización preferencial del daño genético en las regiones $H4^{+a}$ y RIDGE.

Posteriormente, se demostró que los *foci* de γ H2AX se localizan preferentemente en regiones de eucromatina, sugiriendo así que la heterocromatina podría ser resistente a la formación de los *foci*. Estos resultados fueron obtenidos utilizando diferentes marcadores epigenéticos de eu- y heterocromatina e induciendo daño genético mediante radiaciones ionizantes (Kim et al. 2007; Karagiannis et al. 2007; Falk et al. 2008, Vasireddy et al. 2010), o por el tratamiento con agentes radiomiméticos como BLEO (Watters et al. 2009) o neocarzinostatina (Goodarzi et al. 2008). En nuestro grupo de investigación obtuvimos resultados similares. Por una parte, exponiendo *ex vivo* retinas de ratón a BLEO, constatamos en bastones una localización preferentemente eucromática de los *foci* de γ H2AX (Lafon-Hughes et al. 2013). Por otra parte, evaluando el posicionamiento de estos *foci* en cultivos de células CHO9 no replicantes (fases G1/G2 del ciclo) expuestos a BLEO verificamos también su localización preferencial sobre regiones eucromáticas H3K4me3+ (Liddle et al. 2014).

Diferentes factores no excluyentes parecen ser responsables de la distribución no homogénea de los *foci* de γ H2AX dentro del núcleo. Por una parte, la superestructura de la heterocromatina (alto nivel de condensación y abundancia de proteínas de unión) podría reducir la accesibilidad de los compuestos químicos. Asimismo, su bajo nivel de hidratación respecto a la eucromatina, podría generar menos radicales libres por exposición a

radiaciones ionizantes. Esto resultaría en una menor susceptibilidad a la inducción de lesiones (Falk et al. 2010). Para testear esta posibilidad, Takata et al. (2013) utilizaron un sistema para evaluar directamente, mediante ensayo de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling*), las DSB inducidas por rayos γ en cromatina con diferentes grados de compactación. Para ello, utilizaron un sistema *in vitro* donde los grados de condensación de la cromatina podían controlarse en base a la concentración de magnesio. Así pudieron condensar, decondensar y recondensar nuevamente grandes cantidades de cromatina nuclear variando este parámetro. Determinaron una frecuencia de DSB de 5-50 veces menor en la cromatina compacta frente a la que estaba decondensada. Estos resultados apoyan la idea de que la alta compactación de la cromatina puede *per se* proteger al ADN del daño inducido por agentes químicos.

Por otro lado, diversos autores han demostrado que las respuestas al daño generadas en la heterocromatina y en la eucromatina difieren. Se ha constatado que la fosforilación de H2AX es inhibida por la elevada condensación de la heterocromatina (Kim et al. 2007). Estos autores observaron la detención de la expansión de la fosforilación en regiones próximas a la heterocromatina utilizando cultivos de células MEF. Complementariamente, se ha constatado que las DSB formadas en estas regiones (DSB heterocromáticas) migran rápidamente a interfases eucromatina/heterocromatina para ser reparadas tanto en células de mamífero (Jakob et al. 2011) como de *Drosophila* (Chiolo et al. 2011).

Usando la metodología de microirradiación con iones pesados Jakob et al. (2011) fueron capaces de inducir DSB dentro del núcleo en forma limitada, siguiendo una trayectoria lineal que atravesaba regiones heterocromáticas (cromocentros de células MEF). Observaron que la trayectoria lineal de los *foci* de γ H2AX experimentaba un desvío bordeando estas regiones. Utilizando microscopía en tiempo real (*real-time imaging*) de la proteína de reparación XRCC1 (unida a GFP) junto con ensayo de TUNEL comprobaron que las DSB se generaban realmente en el interior de los cromocentros y que posteriormente ocurría la migración de los *foci* de γ H2AX desde el interior de los cromocentros a las regiones periféricas de heterocromatina. Estas migraciones eran de rango limitado y ocurrían en el intervalo de 20-60 minutos post-irradiación. Migraciones de este tipo fueron previamente evidenciadas por otros autores. Así, Aten et al. (2004) evidenciaron cambios en *tracks* lineales de DSB inducidas en una subpoblación de núcleos de HeLa expuestos a radiación α 15-60 min post-inducción de daño. En concordancia, Chiolo et al. (2011) observaron la expansión y existencia de protusiones dinámicas de regiones heterocromáticas conteniendo ADN repetido en células de *Drosophila* expuestas a radiaciones ionizantes, visualizando la proteína HP1 por *live-cell imaging*. Jakob et al. (2011) hallaron, además, decondensación de la heterocromatina en los sitios de impacto de iones, fenómeno que posiblemente promueva el traslado de las DSB a las regiones periféricas de menor densidad cromatínica

(eucromáticas) para su potencial reparación. Kruhlak et al. (2006) evidenciaron también decondensación cromatínica en torno a las lesiones. Estos autores estimaron por microscopía electrónica una reducción del 30-40% de la densidad cromatínica en la vecindad del daño.

Al menos en células no replicantes se requiere la quinasa ATM para facilitar la reparación de las DSB heterocromáticas. Así, su inhibición mediante compuestos específicos (inhibidor KU-55933) genera DSB persistentes sobre regiones de interfase eu-/heterocromatina (Goodarzi et al. 2008). Estos autores observaron un efecto similar en células MEF ATM-deficientes. A través de experimentos con variantes no fosforilables (S824A KAP-1) o *phosphomimic* (S824D-KAP-1) de la proteína KAP-1, sugieren que el rol más importante de ATM en relación a la reparación de DSB heterocromáticas es a través de la fosforilación de esta proteína (a pKAP-1). KAP-1 es un represor transcripcional, componente clave de la heterocromatina, el cual presenta un sitio de fosforilación para ATM en su región C-terminal (Ziv et al. 2006). La pKAP-1 generada por ATM colocaliza con los *foci* de γ H2AX (asociados a DSB heterocromáticas) en interfases eucromatina/heterocromatina (Noon et al. 2010). Esto provoca decondensación de la cromatina en su entorno al dispersar al remodelador de nucleosomas CHD3 (Goodarzi et al. 2011). Es de mencionar que el *knockdown* de KAP-1 u otros componentes de la heterocromatina (ej. HP1 o HDAC1/2) permite la correcta reparación de DSB heterocromáticas aun en condiciones de inhibición de ATM (Goodarzi et al. 2008). En suma, el conjunto de resultados sugiere que el impedimento para reparar estas lesiones puede suprimirse cuando ocurre la pérdida o alteración de proteínas que contribuyen a la conformación altamente condensada de la heterocromatina.

En contraposición a lo que ocurre en las lesiones inducidas en la heterocromatina, las DSB eucromáticas se reparan eficientemente en ausencia de ATM y más tempranamente que las inducidas en heterocromatina (35 % de *foci* remanentes en eucromatina versus 80% en heterocromatina a las 2 h post-daño) (Goodarzi et al. 2008; White et al. 2012). Esto probablemente responda al hecho de no ser necesario, en el caso de la eucromatina, superar los impedimentos estructurales existentes en la heterocromatina para reparar las DSB.

1.7 Replicación del ADN

La replicación del ADN transcurre durante la fase S del ciclo celular. Es un proceso estrictamente regulado, tanto espacial como temporalmente, en el cual diferentes regiones del genoma se duplican en distintos momentos de esta fase (Woodfine et al. 2004), conservándose la asincronía en la replicación entre ciclos celulares consecutivos (Ryba et al. 2010).

La marcación de núcleos interfásicos de mamíferos con pulsos de los análogos de base 5-

bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) o 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) ha evidenciado la distribución espacial específica de la replicación del ADN durante el transcurso de la fase S. Durante la fase S temprana (Early S, ES), se duplican las regiones del compartimento nuclear eucromático interno, visualizándose *foci* de replicación dispersos por toda su extensión. Este patrón cambia con el avance de la fase S. Durante la fase S media (Middle S, MS), la síntesis de ADN se concentra en las áreas de heterocromatina perinucleolar y en las regiones adyacentes a la envoltura nuclear (O'Keefe et al. 1992; Ma et al. 1998). Finalmente, en fase S tardía (Late S, LS), la duplicación del ADN ocurre sobre los bloques discretos de heterocromatina interna. En suma, las regiones eucromáticas replican en fase ES, mientras que las de heterocromatina lo hacen durante las fases MS/LS (Figura 7).

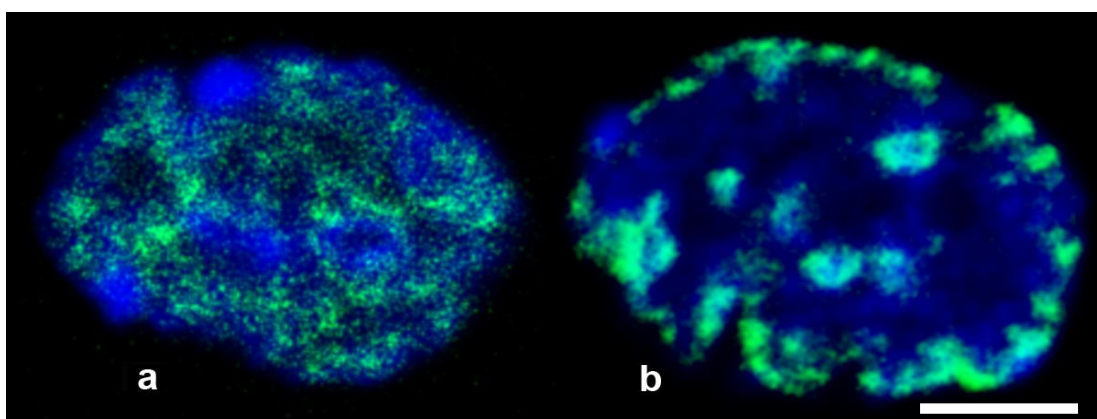


Figura 7.- Se observan los patrones de replicación característicos de las fases S temprana (ES, replicación de regiones eucromáticas) y media/tardía (MS/LS, replicación de regiones heterocromáticas) en núcleos de la línea celular CHO9. Los dominios en replicación fueron detectados mediante un pulso de incorporación de EdU (45 min) y su posterior detección química con una azida conjugada a Alexa Fluor 488. (a) núcleo en fase ES con replicación del compartimento interno eucromático. (b) núcleo en fase MS/LS donde se replican las regiones heterocromáticas perinucleares, peri-nucleolares, y bloques discretos de heterocromatina interna. En azul se observa la contratinción del núcleo con DAPI (adaptado de Di Tomaso et al. 2013). Barra: 3 μ m

Como es de esperar, existe una correlación entre la asincronía en la síntesis de ADN y las modificaciones epigenéticas específicas que presentan las diferentes regiones de cromatina. Las regiones de replicación temprana presentan modificaciones asociadas a la eucromatina (H3K9ac, H3K27ac, H3K4me, H3K36me H3K79me) mientras que las modificaciones epigenéticas represoras características de la heterocromatina (H3K9me, H3K27me and H4K20me) están ligadas a regiones de replicación media y tardía (Pokholok et al. 2005). La heterocromatina facultativa replica tempranamente si sus genes tejido-específicos están siendo expresados y tardíamente si no lo están (Jeon et al. 2005). La asincronía en la replicación se establece tempranamente en la fase G1 del ciclo celular (*Timing Decision Point*), en paralelo con el anclaje y posicionamiento de segmentos cromosómicos en lugares específicos del núcleo (Dimitrova & Gilbert 1999). La asincronía en la replicación y la progresión por la fase S es controlada por un punto de control (*checkpoint*) durante esta fase (intra-S), el cual es dependiente de la vía ATR/CHK1 (Herrick 2011). La transición desde

replicación temprana a tardía implica la activación de este *checkpoint* en MS, el cual impide el encendido de los replicones tardíos. De hecho, se ha observado que la inhibición de CHK1 induce un encendido más temprano de ORI específicos de encendido tardío (Costanzo et al. 2003).

En mamíferos diferentes motivos de secuencia pueden actuar como identificación del origen de replicación (*Origin Replication Identification*, ORI), en los cuales se unen proteínas, en un gran número, formando complejos de replicación. Previamente, durante la fase G1, se asocian a potenciales orígenes de replicación, los complejos de pre-replicación (*pre-Replication Complex*, pre-RC). Este conglomerado incluye el complejo de reconocimiento de origen (*Origin Recognition Complex*, ORC), quien es capaz de reconocer los orígenes de replicación y otros factores esenciales para el proceso de duplicación del ADN (Yang et al. 2010). A continuación de la unión de los complejos pre-RC a los ORI, un complejo proteico de preiniciación (*pre-Initiation Complex*, pre-IC) se ensambla junto con otros factores lo cual posibilita el *loading* de la polimerasa de replicación y el consiguiente inicio del proceso de duplicación. La finalización completa de la replicación es necesaria para una condensación cromosómica total y la consiguiente progresión a través del ciclo celular. Mutantes ORC de *Drosophila* incapaces de completar la fase S tienen defectos, no sólo en la replicación del ADN, sino también en la progresión a través del ciclo celular y la condensación cromatínica (Loupard et al. 2000).

1.8 Replicación del ADN y daño genético

Como se mencionó en la sección 1.6 un gran número de estudios han evidenciado que las regiones de eu- y heterocromatina presentan diferentes sensibilidades al daño genético primario, así como diferentes formas de procesar y reparar este daño. Los primeros indicios de este hecho provinieron de la evaluación de aberraciones en cromosomas mitóticos y su posterior confirmación en células en interfase, evaluando el daño genético mediante la detección de *foci* de γ H2AX.

Un aspecto menos estudiado ha sido el impacto de la duplicación del ADN sobre la localización y reparación del daño primario. La comúnmente utilizada identificación de sitios replicantes mediante el análogo de base BrdU implicaba una severa desnaturalización del ADN, dificultando, por tanto, la visualización conjunta de síntesis de ADN y proteínas nucleares de señalamiento o reparación del daño (entre ellas γ H2AX) mediante inmunocitoquímica. Un gran avance en lo metodológico, fue la posibilidad de utilizar como compuesto el EdU para identificar regiones en activa replicación del ADN, en combinación con las técnicas habituales de inmunodetección (Salic & Mitchison 2008). En este sentido, la visualización conjunta de *foci* de EdU y *foci* de γ H2AX en núcleos interfásicos ha posibilitado el estudio de la relación espacio-temporal entre replicación del ADN y daño genético

primario. Es decir, evaluar la localización de estos *foci* en relación a la estructura de la cromatina cuando el daño genético se induce durante la replicación del ADN.

En los primeros reportes a este respecto se emplearon inhibidores de las topoisomerasas I (camptotecina) y II (etopósido, mitoxantrona) para evaluar la relación γ H2AX *versus* EdU. El grupo de Dobrucki reportó, en núcleos de la línea A549, la presencia, casi exclusiva, de los *foci* de γ H2AX inducidos por tratamiento con camptotecina en sitios de marcación EdU+, utilizando un análisis de vecino más cercano (*nearest neighbor*) para evaluar las frecuencias de *foci* de γ H2AX asociados a la replicación del ADN (Berniak et al. 2013; Rybak et al. 2016). Como se mencionó previamente, este compuesto origina DSB únicamente por la colisión de las horquillas de replicación activas con complejos ADN-Topoisomerasa I estabilizados por este compuesto. Utilizando los inhibidores de la topoisomerasa II como agentes inductores de daño este grupo verificó también una asociación espacial de los *foci* de γ H2AX con los *foci* de EdU (Zhao et al. 2012), aunque más débil que para el caso de la camptotecina.

En esta misma dirección, nuestro grupo reportó resultados concordantes, estudiando la distribución nuclear del daño genético inducidos por BLEO en la línea celular CHO9. Así, mapeamos los *foci* de γ H2AX producidos durante la exposición a este agente en núcleos ES o MS/LS sometidos a un pulso de EdU (Liddle et al. 2014). Mediante microscopía confocal y estimación cuantitativa de colocalización verificamos, tanto en núcleos ES como MS/LS, una localización preferencial de los *foci* de γ H2AX inducidos por este agente sobre dominios de cromatina en activa replicación (EdU+). En núcleos MS/LS la colocalización de *foci* de γ H2AX con sitios EdU+ no se debió a que los *foci* de γ H2AX se posicionaban completamente en regiones EdU+ sino a su localización recurrente en regiones frontera (interfases) entre dominios replicantes y no replicantes (ver Figura 8). En suma, nuestros resultados indicaron que la replicación de la eu-/heterocromatina modulaba la distribución del daño primario, favoreciendo su localización en aquellas regiones de cromatina que estaban bajo síntesis de ADN durante el tratamiento con BLEO.

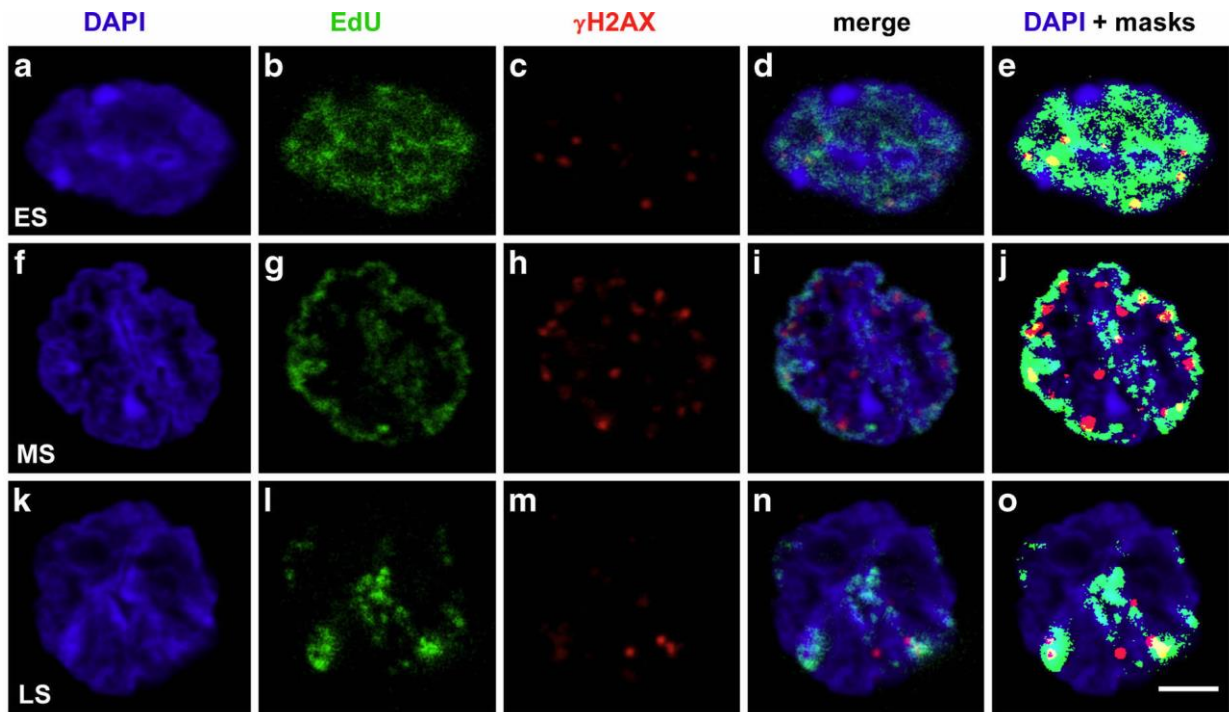


Figura 8.- Mapeo de *foci* de γ H2AX en relación a los dominios de replicación (EdU+) en núcleos de CHO9 expuestos a BLEO 40 μ g/mL por 30 min y recuperadas post-daño a los 45 min. Se muestran planos de célula única a 63x provenientes de *z-stacks* de núcleos ES (A-E), MS (F-J) y LS (K-O). (A, F, K) DAPI (azul), (B, G, L) EdU (verde), (C, H, M) γ H2AX (rojo) e imágenes *merge* de las señales de DAPI/EdU/ γ H2AX (D, I, N). En (E, J, O) se ilustra la superposición de máscaras binarias (ver definición en página X) correspondientes a las señales de EdU y γ H2AX sobre el canal de fluorescencia de DAPI. Las áreas de solapamiento verde-rojo en las máscaras binarias se evidencian en amarillo. Barra: 3 μ m. Adaptado de Liddle et al. (2014).

Estos hallazgos reforzaron resultados previos de nuestro laboratorio donde se mapearon replicación y sitios de fractura cromosómica sobre cromosomas metafásicos. Usando como modelo el cromosoma X de la línea celular CHO9, Di Tomaso et al. (2006; 2010) determinaron la localización de aberraciones cromosómicas producidas por diversos agentes (etopósido, *Alu* I, metilmetano sulfonato y rayos UV-C) tanto en células en fases ES como MS/LS. A pesar de los diferentes mecanismos de acción de estos agentes observaron que las aberraciones cromosómicas mapeaban principalmente en el brazo largo heterocrómico (Xq) en núcleos MS/LS (replicación de la heterocromatina) y en el brazo corto eucromático (Xp) en células ES (replicación de eucromatina).

La colocalización de regiones de *foci* de reparación (γ H2AX) y *foci* de replicación (EdU) podría responder, al menos parcialmente, al desenrollamiento local de la cromatina que ocurre durante la replicación (Bonne-Andrea et al. 1990). Esta decondensación podría facilitar el acceso de las moléculas de BLEO al ADN y aumentar por tanto el número de DSB inducidas. Este fenómeno sería especialmente importante en las regiones de heterocromatina, donde la decondensación permitiría superar su resistencia intrínseca a generar (y mantener) *foci* de γ H2AX en su interior. Por otra parte, además de las DSB

inducidas directamente, la presencia de SSB (*single strand breaks*) en las hebras molde de ADN podría producir el colapso de horquillas de replicación activas durante la síntesis de ADN, resultando en la formación de las denominadas *single-ended DSB* (Bownman & Crosetto 2018). Este último factor, podía también contribuir a la localización preferencial de *foci* de γ H2AX sobre regiones de cromatina replicante.

El posicionamiento recurrente en núcleos MS/LS de los *foci* de γ H2AX en regiones frontera EdU+/EdU- también fue observado por Berniak et al. (2013) en el caso de los *foci* inducidos por camptotecina. Estos autores postularon que movimientos cromatínicos post-daño ligados a decondensación local podrían incrementar la distancia inicial entre los *foci* asociados a replicación del ADN y los sitios EdU+, al momento de fijar las células luego de la recuperación en medio de cultivo. Un fenómeno similar de migración/decondensación cromatínica podría también explicar los resultados obtenidos con BLEO. De hecho, como ya se mencionó, han sido descritas migraciones de rango restringido de DSB heterocromáticas hacia fronteras de eu-/heterocromatina (Jakob et al. 2011) para su reparación.

1.9 Microscopía de súper-resolución dSTORM

La microscopía de fluorescencia convencional está limitada por la difracción de la luz a una resolución lateral (xy) de ~200 nm y axial (eje z) de ~500 nm. Esto implica que los complejos macromoleculares más pequeños como por ejemplo los foci de reparación del ADN, se visualicen borrosos (*blurred*), no pudiéndose definir por tanto en detalle su organización estructural. A partir de mediados de la década pasada se han desarrollado un conjunto de técnicas que son capaces de superar la barrera que la difracción impone sobre la resolución óptica pudiendo alcanzar una resolución próxima al nivel molecular (20-100 nm) (ver Figura 9). A estos métodos se los denomina colectivamente como microscopías de súper-resolución o nanoscopías y pueden ser clasificados en 3 grandes grupos: STED (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*), SIM (*Structured Illumination Microscopy*) y SMLM (*Single-Molecule Localization Microscopy*) (remitirse a Schermelleh et al. 2010 y Requejo-Isidro 2013 para una visión general de estas metodologías). A pesar de presentar limitaciones significativas en la toma de imágenes en 3D y la necesidad de un ajuste complejo en imágenes con marcación multicolor, los métodos de SMLM son los que poseen la mayor resolución a nivel lateral entre las técnicas nanoscópicas (Figura 9). Esto ha sido particularmente útil, en el caso de preparaciones monocolor, para develar detalles estructurales a nivel nanoscópico que no pueden resolverse completamente mediante SIM o STED.

Los métodos de SMLM se basan en la separación temporal de la emisión de fluorescencia de moléculas individuales. Para ello se utilizan fluoróforos que puedan, o bien ser

fotoactivados con luz láser (PALM, *Photoactivation Location Microscopy*, Betzig et al. 2006) o bien experimentar un *photoswitching* reversible al ser irradiados. En este último caso, se emplean colorantes orgánicos convencionales (como la serie de fluoróforos comerciales Alexa Fluor o ATTO) que pueden experimentar *photoswitching* en presencia (STORM, *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, Rust et al. 2006) o ausencia (dSTORM, *direct STORM*, Heilemann et al. 2008) de un segundo colorante activador.

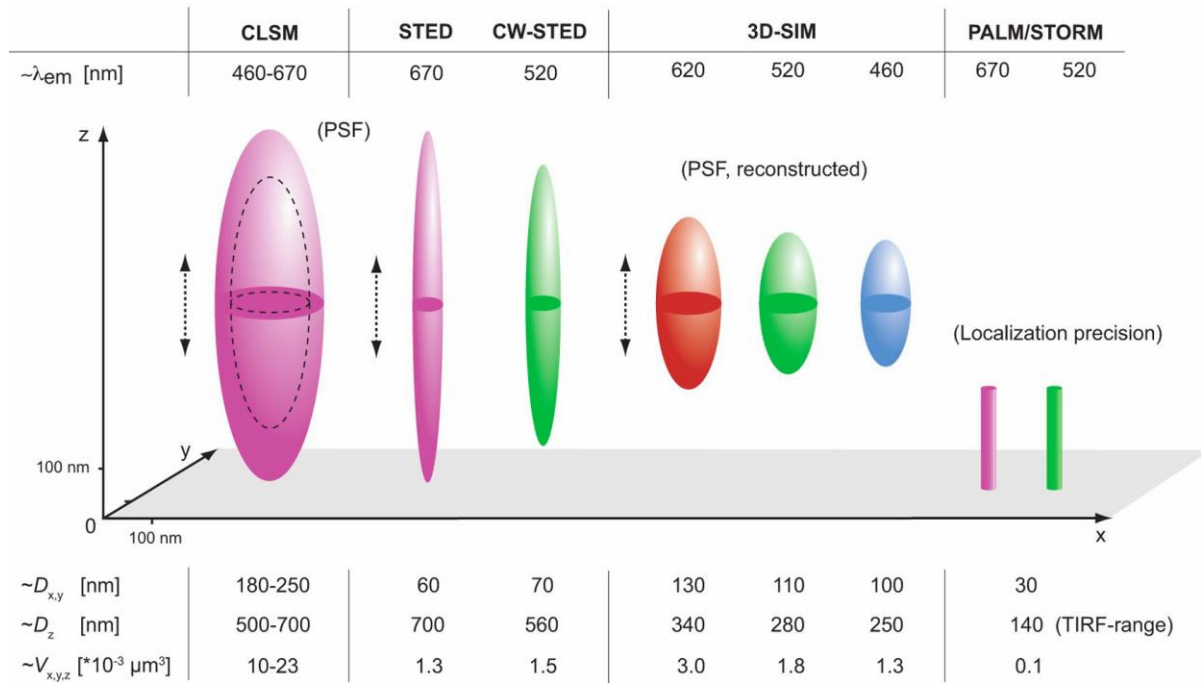


Figura 9.- Volúmenes mínimos que se pueden resolver por microscopía confocal de fluorescencia (*Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) y las diferentes técnicas de microscopía de súper-resolución. Se muestra una representación esquemática en 3D de los volúmenes focales obtenibles a los máximos de emisión indicados (parte superior). Se listan los valores aproximados de resolución teórica lateral (x,y), axial (z) y volúmenes (x,y,z) en nm que pueden ser resueltos con cada técnica (parte inferior). Como se observa en la imagen STED y SIM pueden alcanzar una profundidad considerable en la muestra (hasta 20 μm) mientras que SMLM está confinada usualmente al rango en z de los modos TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) o HILO (*Highly Inclined and Laminated Optical sheet*) (adaptado de Schermelleh et al. 2010).

En dSTORM la lectura aleatoria de la emisión de fluoróforos individuales se lleva a cabo transfiriendo inicialmente la mayoría de los fluoróforos a un estado reversible apagado (*OFF*) y activando posteriormente en forma estocástica (al estado fluorescente *ON*) sólo un subgrupo particular de los fluoróforos individuales pasibles de *photoswitching* en cada instante. Estos fluoróforos podrán entonces ser detectados como molécula única (Figura 10). En este sentido, si la probabilidad de activación es suficientemente baja, la mayoría de los fluoróforos activados estarán suficientemente espaciados unos de otros, en relación al límite de difracción de la luz, y sus posiciones podrán ser determinadas con precisión mediante un ajuste (*fitting*) gaussiano individual. Este ciclo de fotoactivación y lectura se repite miles de

veces, lo cual permite la reconstrucción de una imagen única de súper-resolución a partir de todas las localizaciones de molécula únicas detectadas en sucesivos cuadros o *frames* (van de Linde et al. 2011) empleando software específicos (Wolter et al. 2012).

La obtención de un óptimo *photoswitching* depende en gran medida de las características del *buffer* utilizado para la toma de imágenes. A los *buffers* se les agrega un agente reductor [normalmente tioles como la β -mercaptoetilamina (MEA)], y en algunos casos un sistema de remoción (*scavenger*) de oxígeno, para inducir el *photoswitching*. La concentración de agente reductor a adicionar, así como el pH del buffer de *photoswitching* deben ser optimizados para cada fluoróforo y contexto celular a fin de conseguir un alto rendimiento en fotones emitidos por molécula, minimizando a su vez el tiempo de residencia de la molécula en el estado ON.

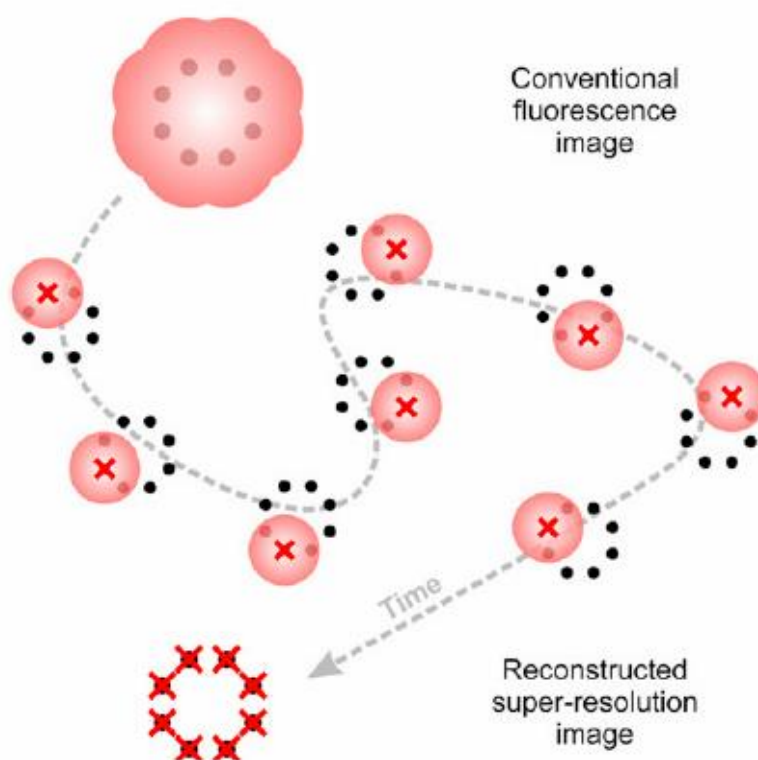


Figura 10.- Fundamentos de la técnica de dSTORM. Se esquematizan los principales fundamentos de esta metodología. La estructura de interés (puntos en negro) es marcada con un fluoróforo que sea pasible de *photoswitching*. Como se muestra en el esquema las PSF (*P*oint *S*pread *F*unction) de los fluoróforos individuales producidas por la difracción de la luz se solapan, generando una imagen borrosa de la estructura por microscopía de fluorescencia convencional. En dSTORM se transfieren, al comienzo del experimento, todos los fluoróforos al estado OFF por irradiación a alta intensidad con luz láser de la longitud de onda apropiada. Posteriormente, un subgrupo de estos fluoróforos se reactiva (generalmente en forma espontánea). Una densidad adecuada de fluoróforos activados por instante permite que sus posiciones puedan ser determinadas con precisión mediante un ajuste gaussiano de las PSF. Se registran múltiples ciclos consecutivos de activación, localización y desactivación (10.000-20.000), lo cual permite, en última instancia, la generación de una única imagen de súper-resolución utilizando programas específicos (rapidSTORM, thunderSTORM, etc.) (adaptado de Van de Linde et al. 2013).

1.10 Evaluación de foci de reparación del ADN por microscopías de súper-resolución

La utilización de técnicas nanoscópicas para investigar la organización estructural de proteínas de reparación del ADN es de reciente data (2013-). En estos trabajos se ha aprovechado el incremento sustancial en resolución óptica que brindan estas técnicas para poder visualizar la organización de las proteínas a escala nanométrica.

Reindl et al. (2015, 2017) estudiaron la nanoestructura de los foci de γ H2AX, 53BP1 y Rad51 (componente de la vía HR) en células HeLa por STED en 3D. Hallaron que tanto los foci de γ H2AX como de 53BP1, ya sea inducidos por irradiación de baja-LET (protones) o alta-LET (iones de carbono), presentaban nanoestructuras internas de forma redondeada/elongada con un $\varnothing$ ~130 nm. Por el contrario, la señal de Rad51 consistía de puntos (*spots*) homogéneos de $\varnothing$ ~143 nm que no presentaban nanoestructura interna. Natale et al. (2017) reportaron también una nano-organización espacial de los foci de γ H2AX en agregados (*clusters*) en células HeLa irradiadas con rayos X. Combinando nanoscopías 3D-SIM y STED determinaron que cada *cluster* estaba compuesto de varias nanoestructuras (mediana=4) de menor tamaño a las cuales denominaron como “nanofoci”, los cuales exhibieron diámetros con valores medios de $\varnothing$ ~200 nm y $\varnothing$ ~160 nm por 3D-SIM y STED, respectivamente. Comparando las intensidades de la marcación de DAPI en cada nanofocus respecto a la intensidad de DAPI total (de todo el núcleo), los autores concluyeron que cada nanofoci se correspondía con dominios de organización de la cromatina de orden inferior que presentaban una extensión promedio de ~75 kb de ADN. Combinando inmunomarcación de γ H2AX y Ku-70 fosforilada con ensayo de TUNEL (marcado directo de los extremos de las DSB) concluyeron que cada *cluster* (en lugar de cada nanofoci) se correspondía con una *single* DSB.

Como se mencionó anteriormente, las metodologías de SMLM son las que proporcionan la mayor resolución lateral entre las nanoscopías, lo cual ha contribuido a afinar la descripción a nivel nanoestructural de los foci de γ H2AX. En este sentido, se ha observado una disposición similar de nanoestructuras dentro de los foci de γ H2AX registrando imágenes por SMLM, aunque de menor tamaño promedio por nanofocus que en los estudios donde se empleó STED y/o SIM. Por una parte, Lopez-Perez et al. (2016) reportaron en una línea celular de glioblastoma (U87 MG), sometida a irradiación de alta-LET (iones de carbono), que los foci de γ H2AX estaban compuestos de pequeñas subunidades elongadas de $\varnothing$ ~100 nm (designadas por los autores como “subfoci”) los cuales, a su vez, estaban compuestas de unidades circulares más pequeñas de $\varnothing$ ~40-60 nm (a las que se refieren como “*subfoci elements*”). En concordancia, se determinó que los foci de γ H2AX inducidos por exposición a baja-LET (rayos X) también estaban formados por nanoestructuras circulares de un tamaño

comparable ($\varnothing \sim 45$ nm) (Sisario et al. 2018). Hausmann et al. (2018), por otro lado, se enfocaron en determinar la cinética de formación y desaparición de los *nanoclusters* de γ H2AX en células HeLa expuestas a dosis crecientes de rayos X (≤ 2 Gy) y recuperación a diferentes tiempos post-daño ($0.5 \text{ h} \leq t \leq 8 \text{ h}$). Determinaron que el número de *nanofoci* era mayor a altas dosis y tiempos de recuperación post-daño tempranos (0.5 h), con una disminución ulterior de su número al incrementarse el período de recuperación. Este resultado concuerda con la ampliamente estudiada cinética de formación/desaparición de los foci (microscópicos) de γ H2AX (Kinner et al. 2008). Finalmente, es de mencionar, que aparte de los nanofoci confinados a las regiones de foci de γ H2AX en algunos trabajos (Lopez-Perez et al. (2016); Natale et al. 2017) se ha reportado la presencia de nanofoci dispersos en las áreas nucleares remanentes (ver la sección de discusión para más detalles).

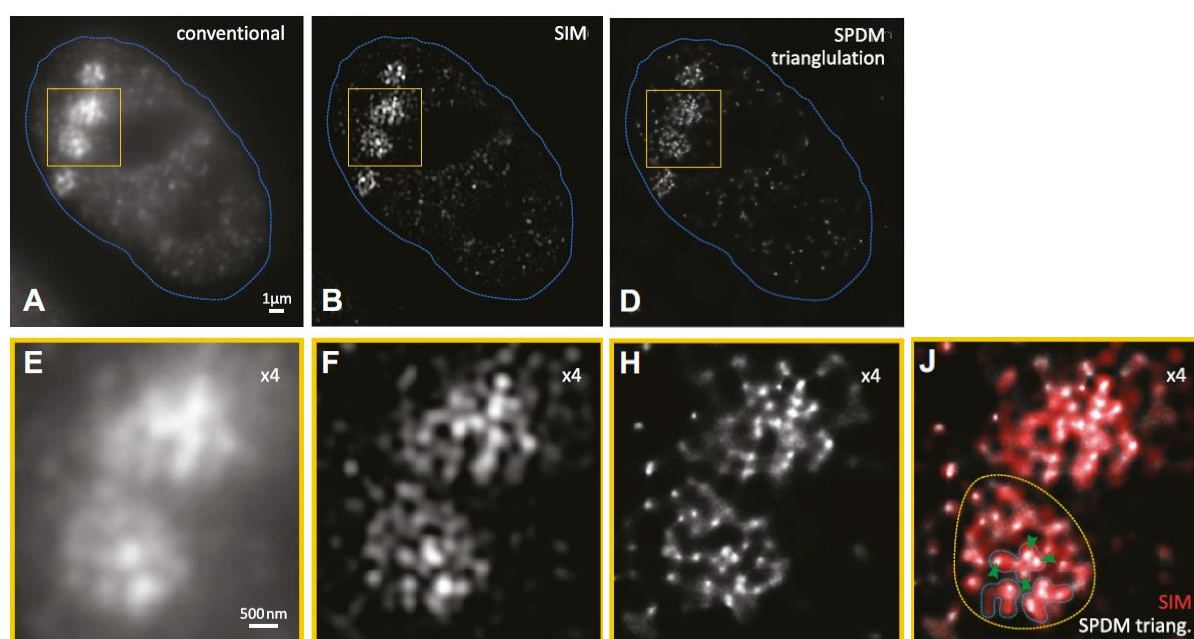


Figura 11.- Organización de los foci de γ H2AX a escala nanométrica. Se observan imágenes de un núcleo de células U87MG a los 30 min post-irradiación con rayos X por microscopía de fluorescencia convencional, SIM y SPDM (*Spectral Precision Distance Microscopy*, una variante de SMLM). En los paneles (A-C) se visualiza un núcleo completo (delimitado el contorno nuclear por la línea en azul), mientras que en los paneles (D-F) se muestra una sección ampliada (*zoomed*) de este núcleo (rectángulos amarillos). El incremento en resolución de SIM y SPDM revela que los foci de γ H2AX están compuestos por subestructuras más pequeñas. Como se observa en (G), los foci (limitados por la línea discontinua amarilla) se componen de subunidades menores (flechas verdes) denominados como “subfoci elements” o “nanofoci” (dependiendo de la publicación) (adaptado de Lopez-Perez et al. 2016).

2. Hipótesis

- 1) El daño genético primario (foci de γ H2AX), inducido por hidroximetilurea en núcleos MS/LS de células de mamíferos, se localiza predominantemente en regiones nucleares bajo síntesis de ADN (heterocromatina replicante) durante la inducción de daño.
- 2) Los foci de γ H2AX observables a nivel macroscópico por las microscopías de fluorescencia estándar presentan una sub-estructura a nivel nanoscópico que no puede determinarse (resolverse) por estas metodologías.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Profundizar en la interrelación entre daño genético y replicación del ADN abordando tanto aspectos funcionales (relación espacial entre foci de daño y foci de replicación) como estructurales (sub-organización a escala nanoscópica de los foci de reparación).

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar por microscopía confocal la localización de los *foci* de γ H2AX inducidos por el compuesto hidroximetilurea, respecto a regiones bajo síntesis del ADN, en núcleos interfásicos de CHO9 en fases MS/LS del ciclo celular (cuando se replican las regiones de heterocromatina) y contrastar estos resultados con los obtenidos previamente en células MS/LS expuestas a bleomicina.
- 2) Investigar la subestructura a nivel nanoscópico de los foci de γ H2AX inducidos por bleomicina en núcleos interfásicos de HeLa por microscopía de súper-resolución dSTORM (*direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) en colaboración con la Universidad de Würzburg (Alemania).

Las secciones de Materiales y Métodos, Resultados y Discusión serán presentadas por separado para cada uno de los objetivos específicos explicitándose con las letras (A) y (B) las secciones correspondientes a los objetivos (1) y (2) respectivamente.

4A. Materiales y Métodos

4.A.1 Mantenimiento y propagación de los cultivos celulares

Los cultivos de la línea celular de ovario de hámster chino CHO9 fueron cultivados en monocapa sobre placas de Petri de $\varnothing=95$ mm en medio de cultivo HAM-F12 (Capricorn Scientific) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Capricorn Scientific), glutamina (200 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (125 $\mu\text{g/mL}$) y mantenidos en estufa a 37° C y 5% de CO₂. Para los experimentos de inmunocitoquímica se sembraron, 24 h antes de la inducción de daño y marcado de las regiones bajo síntesis de ADN, 160.000 o 100.000 células sobre cubreobjetos estériles cuadrados de 15 mm² o esféricos de $\varnothing=12$ mm dentro de *multiwells* de 12 o 24 pocillos, respectivamente. Para los experimentos de MTT se sembraron por cuadruplicado, para cada condición experimental, 20.000 células por pocillo en *multiwells* de 96 pocillos 24 h antes de realizar los tratamientos. Como blanco se utilizaron dos pocillos que contenían únicamente medio de cultivo y SFB (es decir, no se sembraron células en ellos).

4.A.2 Tratamientos con Hidroxiurea y/o Bleomicina

La generación de daño en el ADN se indujo por exposición a HU (Sigma-Aldrich H8627) y/o BLEO (donación Laboratorio TEVA Uruguay, nombre comercial del producto: BILECO). Se prepararon soluciones stock de HU (400 mM diluida en agua ultrapura) y BLEO (5 mg/mL diluida en suero fisiológico). Los cultivos fueron expuestos por 15 o 30 min a diferentes dosis de HU (2-16 mM), BLEO (40 $\mu\text{g/mL}$) o tratamientos combinados de co-exposición a BLEO (40 $\mu\text{g/mL}$) e HU (2 o 8 mM). Para los experimentos de inmunocitoquímica, los cultivos fueron incubados post-tratamiento en medio de cultivo fresco por 30 min antes de ser fijados (PFA 4%), o bien fueron fijados en PFA 4% inmediatamente luego de finalizado el tratamiento (o sea, sin recuperación post-daño). Para los experimentos de MTT las células fueron incubadas por 24 h post-tratamiento en medio de cultivo y SFB previo a la evaluación de viabilidad celular.

4.A.3 Marcado de las regiones bajo síntesis de ADN durante la inducción de daño genético

Las regiones de cromatina replicante, en células en fase S durante el pulso de inducción de daño genético, fueron identificadas por incorporación del análogo de la timidina EdU durante la síntesis del ADN. El EdU (Thermo Fischer C10337) fue agregado a los cultivos durante los tratamientos previamente diluido en HAM-F12 a una concentración final de 10-20 μM a partir de una solución stock 10 mM en DMSO.

4.A.4 Inmunodetección de γ H2AX en núcleos interfásicos

Las monocapas celulares se lavaron en PBS 1X (3 x 3 min) y posteriormente se fijaron en paraformaldehído (PFA; 4% en PBS 1X) por 10 min. Luego de lavar en PBS 1X (3 x 3 min) las células fueron permeabilizadas en 0,5% de Tritón X-100/PBS 1X por 15 min. A continuación, fueron lavadas en PBS 1X (3 x 3 min) y se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas por incubación de 30 min en BSA 2%. Luego de lavar en PBS 1X (1 x 3 min) las células fueron incubadas por 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente (TA) con 20 μ L de un anticuerpo anti- γ H2AX desarrollado en ratón (Abcam ab26350, 1:350 en BSA 2%) o sólo con 20 μ L de BSA 2% (controles sin anticuerpo primario). En cualquier caso, luego de lavados (3 x 3 min) en PBS 1X, las muestras se incubaron (45 min en cámara húmeda a TA) con 20 μ L de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 546 (Thermo Fischer A-11030, 1:500 en PBS 1X). Luego de lavar los preparados en PBS 1X (3 x 3 min) se contratiñeron con DAPI (1,5 μ g/mL, Sigma-Aldrich) por 10 min. Finalmente, los preparados fueron montados en el *antifade* Prolong (Thermo Fischer P36930) y sellados con esmalte.

4.A.5 Identificación de cromatina replicante mediante detección del EdU incorporado

La detección del EdU se basa en una reacción química covalente, catalizada por cobre, entre un grupo azida (presente en el colorante Alexa Fluor elegido) y un grupo alquino (presente en el EdU). La misma se realizó como un paso adicional en la técnica de inmunodetección de γ H2AX, entre el bloqueo en BSA 2% y la incubación con anticuerpos primarios. Para ello, se utilizó el *kit Click-iT EdU Imaging* (Thermo Fischer C10337). Se preparó el siguiente *mix* de reacción (ejemplificado para un volumen final de 250 μ L): 215 μ L del buffer de reacción 1X *Click-iT* + 10 μ L de CuSO_4 + 0,6 μ L de azida*AlexaFluor488 + 25 μ L del aditivo de buffer de reacción (2,5 μ L de vitamina C en 22,5 μ L de agua deionizada). Los cubreobjetos fueron incubados con el *mix* de reacción por 30 min a TA en oscuridad, lavados en PBS 1X (3 x 3 min) y bloqueados nuevamente en BSA 2% por 20 min previo a la incubación con los anticuerpos primarios.

4.A.6 Obtención de imágenes por Microscopía Confocal

Para la obtención de imágenes se utilizó: 1) un microscopio LASER confocal ZEISS (LSM ZEISS 800; equipo institucional del IIBCE) y su software asociado (ZEN Blue 2.3) y 2) un microscopio LASER confocal Leica SP5 TCS II (Facultad de Medicina, UdelaR) y su software asociado (LAS AF Lite). Mediante estos equipos se pudo excitar secuencialmente las muestras con láseres de diodo 405 nm (DAPI), argón 488 nm (EdU) y helio-neón 543 nm (foci de γ H2AX). En ambos microscopios el tamaño de *pinhole* empleado para la adquisición

de imágenes fue de 1 unidad de Airy, diámetro que proporciona un buen compromiso entre el rechazo de luz fuera de foco y una intensidad adecuada de la señal recolectada. Por otra parte, la emisión de fluorescencia fue recolectada a través de canales espectrales de detección. Para el LSM ZEISS 800 los máximos de emisión de fluorescencia utilizados fueron de 465 nm (DAPI), 517 nm (EdU) y 572 nm (foci de γ H2AX). Para el Leica SP5 TCS II los intervalos de recolección de fluorescencia fueron de 415-485 nm (DAPI), 510-540 nm (EdU) y 550-622 nm (foci de γ H2AX).

La intensidad de los láseres, la ganancia de cada uno de los fotomultiplicadores (PMT) y los valores de *offset* (siempre menores a 0.1%) fueron ajustados de forma tal de recolectar imágenes en todo el rango dinámico (valores de 0 a 255) que poseen los detectores (8-bit) de los microscopios confocales utilizados. Para ello, se utilizaron las tablas de color disponibles en los programas de adquisición de imágenes, donde los valores de intensidad extremos se evidencian en colores diferenciales. Los parámetros de adquisición se ajustaron de forma tal de captar pocos o ninguno de los valores extremos en los canales de detección. Así, se evitó el recorte o la saturación de señal que ocurre cuando la magnitud de la señal excede el rango dinámico disponible y aparecen píxeles con valores de intensidad fuera de rango a los cuales se les asigna, erróneamente, el valor mínimo o máximo de la escala (0 o 255, respectivamente). Asimismo, los *settings* del microscopio fueron ajustados de forma tal de no registrar señal en los controles sin anticuerpos primarios y evitar el *bleed-through* entre las diferentes señales de fluorescencia. Se procuró, por otra parte, maximizar la relación intensidad-ruido, utilizando velocidades de escaneo moderadas y la realización de varios pasos de adquisición y promedio (*averaging*) sobre la misma imagen. Se utilizó un *line average* de 3, es decir, cada píxel fue escaneado 3 veces tomándose el valor promedio como valor final de intensidad para cada uno de los píxeles a fin de obtener una buena relación intensidad-ruido. Las restricciones impuestas por el riesgo de *photobleaching* de los fluoróforos y los tiempos de adquisición llevaron a un compromiso entre estos factores.

En cada uno de los preparados se escanearon al azar:

- 1) *stacks* (lotes) en z de campos generales a bajo aumento empleando un objetivo de inmersión en aceite 40X/NA:1.25 (Leica SP5 TCS II). Se adquirieron imágenes de 1024 x 1024 píxeles con un tamaño de pixel de 0.223 μ m x 0.223 μ m y un *step size* de 1 μ m entre planos. Se adquirieron de 8-12 planos por *z-stack*. Cada *stack* presentaba $70 \leq n \leq 100$ núcleos.

- 2) *stacks* en z a un mayor nivel de magnificación, con objetivos de inmersión en aceite 100X/NA:1.40 (Leica SP5 TCS II) y 63X/NA:1.40 (LSM ZEISS 800). Estas imágenes contuvieron $n \leq 10$ células. De estas imágenes se extrajeron las células MS/LS utilizadas para los análisis de colocalización. En el Leica SP5 TCS II se tomaron *z-stacks* de 512 x 512

píxeles con un tamaño de píxel de 50 nm x 50 nm con un step size de 0.5 μ m. En el LSM ZEISS 800 se adquirieron *z-stacks* de 1024 x 1024 píxeles con un tamaño de píxel de 100 nm x 100 nm con un *step size* de 1 μ m.

En todos los casos, los *stacks* de imágenes obtenidos fueron guardados en formato .tiff para su posterior procesamiento.

4.A.7 Procesamiento y análisis de imágenes en image J

Se utilizó el *software* libre ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) para el procesamiento y análisis de las imágenes.

4.A.7.1 Segmentación de las señales de foci de γ H2AX, EdU y DAPI

En primer lugar, se disminuyó la señal de background en los canales de fluorescencia de γ H2AX y EdU aplicando el filtro *subtract background* de ImageJ (ruta: Process/Subtract Background). El mismo implica la remoción en las imágenes del *background* que se presenta en forma continua y homogénea (*smooth*) empleando un algoritmo específico (*Rolling Ball*, Sternberg 1983) En nuestro caso, se aplicó la variante *sliding paraboloid* con un valor de radio $r=5$ píxeles (imágenes a 40X), $r=10$ píxeles (imágenes a 63X) y $r=15$ píxeles (imágenes a 100X). Estos valores fueron elegidos considerando que el radio a elegir debe ser mayor o igual al radio de los objetos de mayor tamaño presentes en la imagen de cada canal.

Con las imágenes resultantes se generaron, cuando fue necesario, máscaras (imágenes) binarias para cada uno de los canales empleando umbrales de intensidad (*thresholds*). Una imagen binaria es una imagen digital que tiene solamente dos valores posibles para cada píxel, donde uno de los valores representa los objetos de la imagen mientras que el otro representa el fondo de la misma. Se utilizaron los colores blanco y negro para representar los objetos y el fondo respectivamente. Los valores de *threshold* para cada canal de fluorescencia fueron definidos en base a la inspección visual de las imágenes (ruta: Image/Adjust/Threshold), siendo similares para todas las condiciones dentro de un mismo experimento. Los rangos de valores umbral de intensidad empleados en cada canal fueron:

Óptica / Equipo Confocal	DAPI	EdU	γ H2AX
Objetivo: 40X Microscopio: Leica SP5 TCS II	40-50	----	30-40
Objetivo: 100X Microscopio: Leica SP5 TCS II	30-40	30-45	40-55
Objetivo: 63X Microscopio: LSM ZEISS 800	20-35	60-80	50-60

El procesamiento de las imágenes mediante los comandos de *subtract background* y *threshold* fue realizado secuencialmente y en forma automática para todos los archivos de un mismo experimento mediante la opción de procesamiento en *batch* (ruta: Process/Batch/Macro).

Los análisis subsecuentes fueron realizados utilizando estas imágenes binarias. El brillo y contraste de las imágenes fue ajustado únicamente con fines ilustrativos cuando fue necesario. Los paneles de imágenes en la sección de resultados fueron armados en Adobe Photoshop CS5.

4.A.7.2 Determinación del nivel de marcación de γ H2AX a nivel global en los cultivos celulares

Utilizando las máscaras binarias de γ H2AX y DAPI, provenientes de campos generales a 40X, se calculó, para cada condición experimental, el porcentaje de área dañada (es decir, área γ H2AX+) respecto al área nuclear total (área DAPI+). Se consideraron n=12 campos por condición experimental, provenientes de 3 experimentos independientes. En cada caso se calculó por imagen el cociente:

$$\frac{\text{Número de píxeles positivos para } \gamma\text{H2AX}}{\text{Número de píxeles positivos para DAPI}} \times 100$$

4.A.7.3 Evaluación de la intensidad de fluorescencia de EdU

Se evaluó la intensidad de fluorescencia de EdU en los cultivos expuestos a HU, respecto a la intensidad en cultivos no expuestos al inductor de daño genético, en base a las imágenes provenientes de campos generales a 40X. Para ello, se calculó por núcleo el nivel promedio de intensidad de EdU con la herramienta *Mean gray value* dentro del menú *Measure* (ruta: Analyze/Measure). Para definir los contornos de cada núcleo se definieron ROI (*Regions Of Interest*) en la imagen de fluorescencia de EdU en base a las máscaras de DAPI (ruta: Analyze/Tools/ROI Manager). Posteriormente, se calculó el valor promedio de intensidad de EdU por campo. Se consideraron n=12 campos por condición experimental, provenientes de 3 experimentos independientes.

4.A.7.4 Evaluación de colocación en núcleos en fase MS/LS

La colocación de dos señales fluorescentes en una imagen digital puede ser definida como su tendencia a coexistir en el mismo grupo de píxeles (Ronneberger et al. 2008).

Para cada una de las condiciones experimentales consideradas se realizó manualmente un recorte rectangular (*crop*) de las células MS/LS (ruta: Image/Crop) presentes en cada una de las imágenes de campos a 63X, generándose, en cada caso, *stacks* de célula única. Se analizaron n≥32 núcleos por condición experimental. Las células se discriminaron como replicantes (fase S) o no replicantes (fases G1/G2) en base a la presencia o ausencia,

respectivamente, de marcación de EdU. A su vez, los núcleos replicantes se discriminaron en ES y MS/LS por la observación visual de los patrones de replicación. En este sentido, la marcación de EdU en las regiones de heterocromatina nuclear (periferia nuclear, áreas perinucleolares o cromocentros) permitió su clasificación como núcleos MS/LS.

En cada núcleo MS/LS se consideró el plano central para realizar la evaluación de colocación entre cromatina dañada (foci de γ H2AX) y cromatina replicante (regiones EdU+).

La estimación de colocación implicó el cálculo de áreas de píxeles solapantes utilizando las máscaras binarias de γ H2AX, EdU y DAPI. Así, se calcularon los siguientes cocientes:

(a) Proporción de cromatina replicante dañada (área γ H2AX+ $\cap$ área EdU+) respecto al total de cromatina dañada (área γ H2AX+):

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para EdU y } \gamma\text{H2AX}}{\text{número total de píxeles positivos para } \gamma\text{H2AX}}$$

(b) Proporción de cromatina replicante (área EdU+) respecto al área nuclear total (área DAPI+)

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para EdU}}{\text{número total de píxeles positivos para DAPI}}$$

Para cada núcleo se determinó el cociente (a):(b) y la media aritmética de los cocientes para cada población celular. Al cociente (a):(b) lo denominamos RDDI (*Replication-related Damage Distribution Index*). Si la marcación de γ H2AX se distribuye aleatoriamente (en forma independiente) en el núcleo respecto a las zonas replicantes se observarán valores de RDDI en el entorno de 1. Valores significativamente mayores o menores que 1 del RDDI indicarán una tendencia a colocalizar o anticlocalizar, respectivamente.

Los cálculos de las proporciones (a) y (b), que determinan los valores de RDDI en cada núcleo, fueron realizados en ImageJ determinando el coeficiente de colocación de Manders M1 (ver Manders et al. 1993 y fórmula debajo) a través del plug-in *Manders Coefficients* (ruta: Plugins/Colocalisation Analysis/Manders Coefficients).

$$M1 = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i},$$

S1 representa el valor de intensidad de señal de pixel en el canal 1; $S1_{i,coloc} = S1_i$ si $S2_i > 0$, siendo S2 el valor de intensidad de señal de pixel en el canal 2 (Zinchuk et al. 2007). En el caso de las máscaras binarias, donde los valores de intensidad de cada pixel son 0 o 1, el coeficiente M1 es equivalente a:

$$M1 = \frac{\text{número de píxeles positivos para S1 y S2}}{\text{número de píxeles positivos para S1}}$$

Así, las proporciones (a) y (b) pueden ser calculadas utilizando esta fórmula a partir de las imágenes que poseen los píxeles positivos para γ H2AX (máscara de γ H2AX), EdU (máscara de EdU y DAPI (máscara de DAPI).

4.A.7.5 Evaluación del nivel de marcación nuclear de γ H2AX en células MS/LS

Cuando fue necesario se determinó para cada célula, además del RDDI (subsección 4.A.7 4), la fracción de área nuclear γ H2AX+ según lo detallado en la subsección 4.A.7.2.

4.A.7.6 Evaluación de daño en células no replicantes (fases G1/G2)

En los ensayos donde se evaluaron conjuntamente cultivos expuestos a BLEO, BLEO + HU 2mM y BLEO + HU 8mM comparamos el nivel de daño, determinando el número de foci por célula y la proporción de área nuclear γ H2AX+ (subsección 4.A.8 ii), en la subpoblación de núcleos no replicantes. Para determinar el número de foci por núcleo G1/G2 (*stack*) utilizamos el plugin 3D Object Counter (ruta: Analyze/3D Object Counter) con un filtro de tamaño de vóxel mínimo (2 vóxeles).

4.A.8 Evaluación de viabilidad celular por ensayo de MTT

Este ensayo mide, colorimétricamente, la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; *Sigma-Aldrich* M5655) (color amarillo) a formazán (color púrpura) que ocurre en células metabólicamente activas (Liu et al. 1997). Luego de 24 h de finalizados los tratamientos de inducción de daño genético realizamos la evaluación de viabilidad celular por esta metodología. Para ello, sustituimos en cada pocillo el medio de cultivo + SFB por 100 μ L/pocillo de una solución de MTT. Esta solución se preparó a partir de un stock de MTT 10X (5 mg/mL en PBS) según: 9 mL PBS + 1 mL stock de MTT 5 mg/mL + 100 μ L stock 1 M de glucosa. Las células fueron incubadas por 2 h en la solución de MTT. Posteriormente, el MTT fue sustituido por DMSO (100 μ L/pocillo), lo cual provoca la disolución de los cristales de formazán generados durante la incubación. Inmediatamente después se leyó la absorbancia en un lector de placas (*Varioskan Flash*, equipo institucional del IIBCE) a (570-630) nm y se restó el valor del blanco a los demás valores obtenidos. Las medidas obtenidas se expresaron como porcentaje respecto al control (100%).

4.A.9 Análisis Estadístico

Se utilizó el programa Excel 2016 (test de *t* para una muestra contra valor 1) y la página online <https://astatsa.com> (ANOVA de una vía) para realizar, con un nivel de confianza del 95%, los siguientes análisis estadísticos:

- 1) Comparación de los valores promedio del porcentaje de área dañada (γ H2AX+) respecto al área nuclear total (DAPI+) entre cultivos control y expuestos a diferentes dosis de HU (ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).

- 2) Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de MTT entre cultivos control y expuestos a diferentes dosis de HU (ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).
- 3) Comparación de los valores promedio de intensidad de fluorescencia de EdU en cultivos expuestos a EdU 10 μm + HU respecto a aquellos expuestos solamente a EdU 10 μm (ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).
- 4) Colocalización de foci de γH2AX respecto a regiones replicantes (EdU+) en núcleos MS/LS expuestos a EdU 20 μm + HU, EdU 20 μm + BLEO o el tratamiento combinado de EdU 20 μm + HU + BLEO (test de *t* para una muestra contra valor 1 y ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).
- 5) Comparación de porcentajes de áreas nucleares $\gamma\text{H2AX}+$ (núcleos MS/LS y G1/G2) y número de foci por célula (núcleos G1/G2) en células expuestas a EdU 20 μm + HU, EdU 20 μm + BLEO o el tratamiento combinado de EdU 20 μm + HU + BLEO (test de *t* y ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).

5A. Resultados

Previamente investigamos, en células CHO9, la influencia de la síntesis de ADN en la distribución de los foci de γ H2AX inducidos por el tratamiento con el agente radiomimético BLEO, empleando microscopía confocal y estimación cuantitativa de colocalización. Como se mencionó previamente BLEO puede inducir la formación de foci de γ H2AX asociados a DSB. Con este agente, verificamos una localización preferencial de los foci en regiones de cromatina replicante (EdU+) tanto en fases ES como MS/LS. Más específicamente, en núcleos MS/LS, constatamos un posicionamiento recurrente de los foci en interfases replicantes/no-replicantes (EdU+/EdU-) (ver Figura 7) (Liddle et al. 2014). En esta tesis, procuramos profundizar en el estudio de la interrelación entre daño genético y replicación del ADN analizando, en CHO9, si los foci de γ H2AX inducidos por HU también mapean preferentemente en interfases EdU+/EdU- o, por el contrario, presentan una distribución nuclear diferente. A diferencia de BLEO, HU induce fosforilación de H2AX por estrés replicativo, y no por la generación de DSB. Este compuesto inhibe la enzima ribonucleótido reductasa, responsable de generar los dNTPs necesarios durante el proceso de duplicación del ADN.

5.A.1 El nivel de marcación de γ H2AX fue dependiente de la dosis de HU

En primera instancia, estudiamos el efecto del tratamiento con HU, tanto en relación a la marcación de γ H2AX como respecto a un posible efecto citotóxico, empleando diferentes dosis de este compuesto. En base a datos previos de la literatura (Cowell et al. 2007; Ward & Chen 2001) consideramos para estos experimentos iniciales el rango de 2 a 16 mM de HU. Como puede observarse en las imágenes *merge de γ H2AX/DAPI*, el grado de marcación nuclear de γ H2AX se incrementó desde un nivel extremadamente bajo en cultivos control a una señal apreciable conforme aumentaba la dosis de exposición a HU (Figura 12A-E). Empleando máscaras binarias para γ H2AX y DAPI estimamos, en cada caso, el nivel general de daño calculando el porcentaje de área positiva para γ H2AX (γ H2AX+) respecto al área nuclear total (es decir, positiva para DAPI, DAPI+). Verificamos un incremento progresivo de las regiones nucleares γ H2AX+ al aumentar la dosis de tratamiento con HU (Figura 12F, HU 2mM: 3.1% a HU 16mM: 16 %). En paralelo evaluamos, a las 24 h de recuperación post-daño, si el tratamiento con HU generaba una disminución significativa en la viabilidad celular respecto a los cultivos control, empleando la metodología de MTT. No observamos un descenso significativo en la señal de absorbancia en los cultivos expuestos a cualquiera de las dosis de HU (Figura 12G). Concluimos así que, a las dosis y tiempos de incubación ensayados con este agente, no ocurrió una detención significativa del ciclo celular y/o un efecto citotóxico de HU.

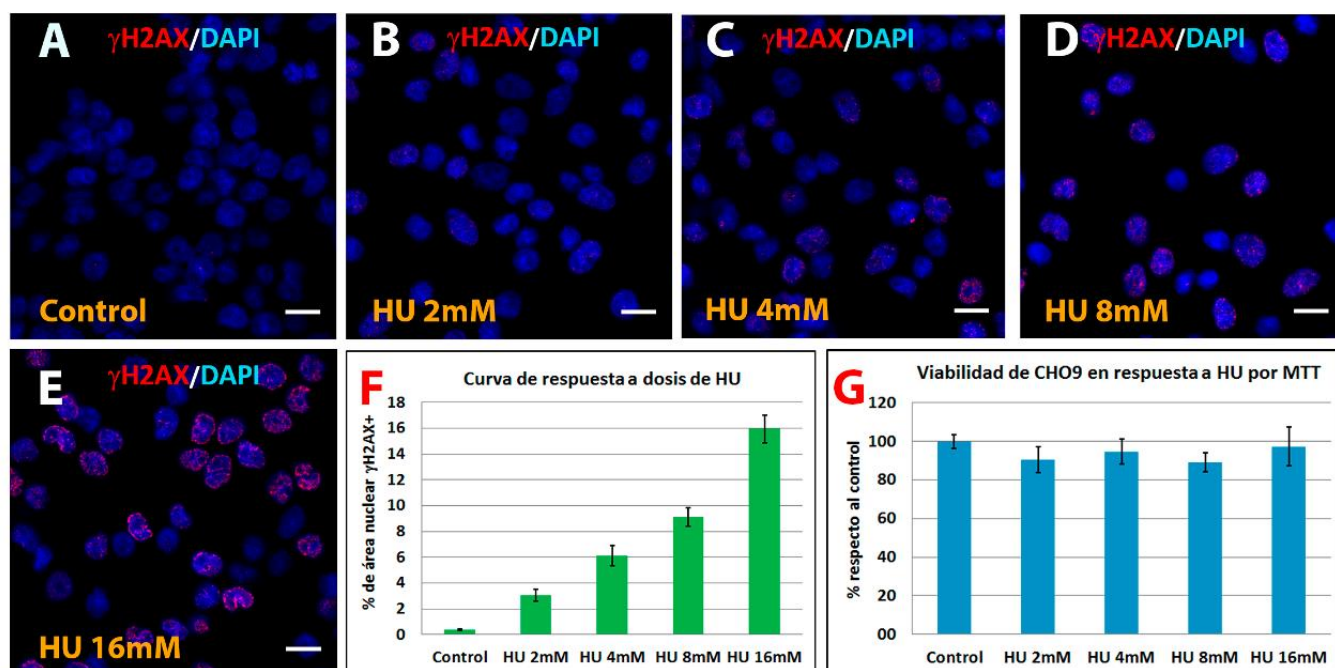


Figura 12.- Inducción de daño en el ADN y citotoxicidad dependiente de la dosis de hidroxurea (HU) en células CHO9. Los cultivos fueron expuestos por 30 min a diferentes dosis de HU (HU 2-16 mM) o al solvente de dilución (agua ultrapura; control) e incubados post-tratamiento en medio de cultivo fresco por 30 min antes de ser fijados (PFA 4%) e inmunomarcados para γ H2AX. (A-E) Imágenes *merge* de fluorescencia de los canales de γ H2AX y DAPI, provenientes de campos generales tomados a bajo aumento (40X, Leica SP5 TCS II), para cada condición experimental. Rojo: γ H2AX. Azul: contratiñición nuclear (DAPI). Barra: 15 μ m (F) Nivel de marcación nuclear de γ H2AX en cultivos control y expuestos a HU. A partir de las máscaras binarias de γ H2AX y DAPI se calculó, para cada condición experimental, el porcentaje de área dañada (γ H2AX+) respecto al área nuclear total (DAPI+). Se muestran los valores promedio ($\pm$ error estándar) por condición para n=12 campos provenientes de 3 experimentos independientes. El nivel de marcación de γ H2AX nuclear aumentó progresivamente al incrementarse la dosis de exposición a HU ($P < 0.05$; ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni). (G) Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de MTT, expresada como porcentaje respecto al control (promedio $\pm$ error estándar) para las diferentes dosis de HU. No se observó una disminución significativa en la señal medida de absorbancia en los cultivos expuestos a HU (ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).

5.A.2 HU produjo una inhibición significativa en la síntesis de ADN

Tomando como antecedente Liddle et al. (2014) comenzamos empleando una dosis de EdU 10 μ m, durante el pulso de inducción de daño, para la visualización de las regiones de cromatina replicante. Como se observa en la Figura 13 A-F, la señal de fluorescencia de EdU disminuyó dramáticamente en los cultivos tratados con HU frente a la obtenida en células expuestas sólo a EdU 10 μ m. De hecho, utilizando los *settings* apropiados para visualizar la señal de fluorescencia en EdU 10 μ m, la marcación resultó apenas perceptible en los cultivos tratados con HU. Este resultado evidenció la esperada inhibición en la síntesis de ADN ocasionada por este agente. Para cuantificar el impacto sobre la replicación del ADN por el tratamiento con HU determinamos la intensidad promedio de fluorescencia del EdU a partir de campos generales tomados a bajo aumento (40x). Verificamos un descenso en la intensidad de la señal de EdU (a valores $< 20\%$) en los cultivos expuestos a

HU respecto a EdU 10 μ m, siendo esta disminución similar entre las diferentes dosis de HU. En este sentido, como se explicita en la Figura 13H, resultó imposible ajustar apropiadamente la señal de fluorescencia usando *settings* similares para todas las condiciones experimentales (no expuestos o expuestos a HU) empleando una concentración de EdU de 10 μ m durante su pulso de incorporación al ADN. A causa de la gran divergencia de intensidad la señal se observa excesivamente saturada en EdU 10 μ m.

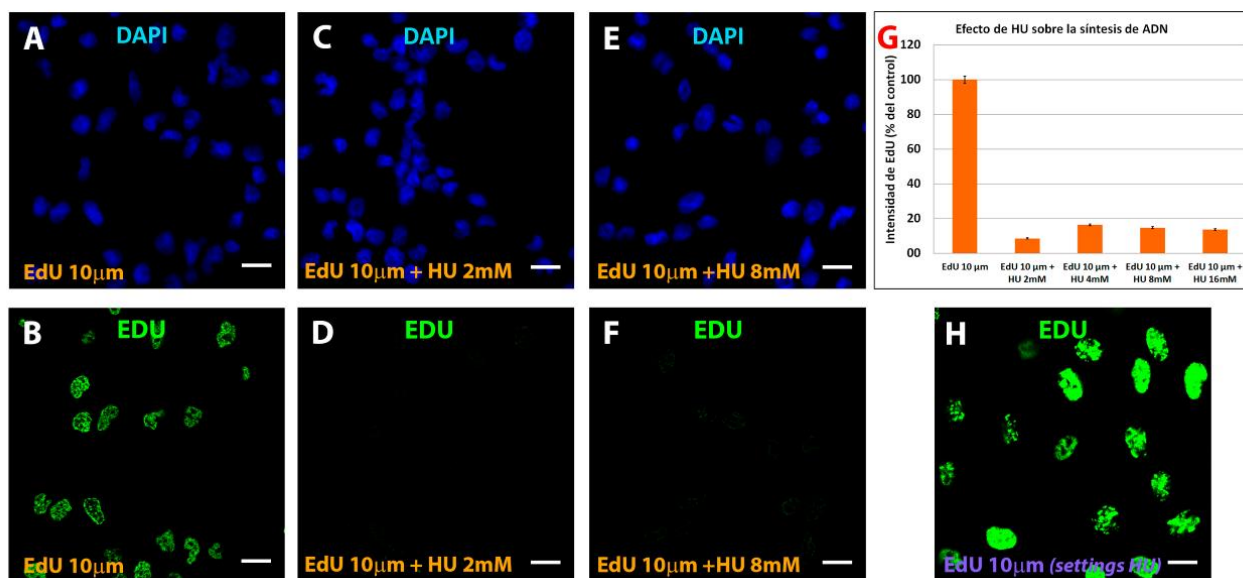


Figura 13.- Efecto de HU sobre la síntesis de ADN en células CHO9. Los cultivos fueron expuestos sólo a EdU 10 μ m o EdU 10 μ m y diferentes dosis de HU (2-16 mM) e incubados post-tratamiento en medio de cultivo fresco por 30 min antes de ser fijados (PFA 4%) e inmunomarcados para γ H2AX. Las regiones replicantes (EdU+) se visualizaron por *click-iT*. (A-F) Imágenes de planos provenientes de campos generales tomados a bajo aumento (40X, Leica SP5 TCS II) correspondientes a EdU 10 μ m (A-B), EdU 10 μ m + HU 2mM (C-D) y EdU 10 μ m + HU 8mM (E-F). Para cada condición se muestran por separado las imágenes de fluorescencia de DAPI (A, C, E) y EdU (B, D, F). Barra: 15 μ m. (G) Efecto de HU sobre la síntesis de ADN. Valores promedio ($\pm$ error estándar) de intensidad de fluorescencia de EdU en cultivos expuestos a HU (2-16 mM) respecto a la intensidad en EdU 10 μ m. Por condición se analizaron n=12 campos provenientes de 3 experimentos independientes. Verificamos una disminución significativa en la intensidad de la señal de EdU (a valores <20%) en los cultivos expuestos a HU respecto a EdU 10 μ m ($P < 0.001$; ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni). Entre estos cultivos no verificamos diferencias en la intensidad de EdU. (H) Imagen de un cultivo expuesto sólo a EdU 10 μ m bajo los *settings* de intensidad apropiados para observar una señal nítida de EdU en cultivos expuestos a HU. Debido a la gran diferencia de intensidad entre ambos casos la señal se observa excesivamente saturada en EdU 10 μ m.

5.A.3 γ H2AX inducida por HU se localizó preferencialmente sobre las regiones replicantes en núcleos MS/LS

En base a los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares, optamos por emplear las dosis de HU 2mM y HU 8mM por 30 min en los experimentos en células MS/LS de colocalización entre foci de γ H2AX y regiones replicantes (EdU+). Para estos experimentos empleamos una mayor concentración de EdU (20 μ M), a fin de obtener una marcación más intensa de las regiones replicantes que nos permitiera mapear los foci de γ H2AX respecto a las regiones EdU+. Asimismo, se evaluó la colocalización entre ambas marcaciones con tiempos de incubación menores (15 min) y no solamente tras 30 min de recuperación post-tratamiento en medio de cultivo sino también sin recuperación post-daño. Como se evidencia en las imágenes de fluorescencia *merge* DAPI/EdU/ γ H2AX de la Figura 14 (D,H), sólo presentaron marcación de γ H2AX aquellas células que se encontraban en fase S (células EdU+) durante el tratamiento con HU. Las células no replicantes (fases G1/G2) no presentaron efecto alguno como consecuencia de la exposición a este agente. Este resultado se verificó en todas las condiciones ensayadas.

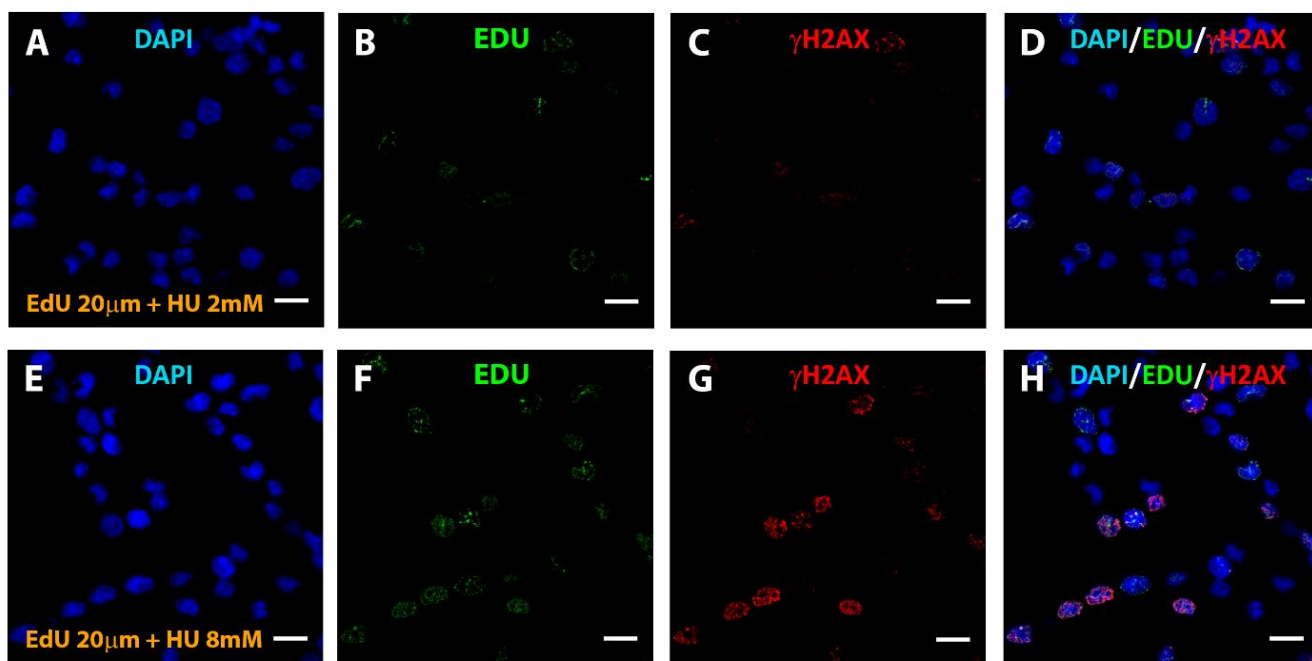


Figura 14.- Relación entre fase del ciclo celular y presencia de γ H2AX en cultivos de CHO9 tratados con HU. Imágenes a bajo nivel de magnificación (40X, Leica SP5 TCS II) correspondientes a cultivos expuestos simultáneamente a EdU 20 μ M + HU 2 mM (A-D) o EdU 20 μ M + HU 8 mM (E-H) por 30 min, con recuperación post-daño de 30 min en medio de cultivo fresco antes de ser fijados (PFA 4%) e inmunomarcados para γ H2AX. Las células fueron expuestas a una mayor concentración de EdU (20 μ M) durante el tratamiento con HU para poder visualizar claramente las regiones replicantes. (A, E) Imágenes correspondientes a los canales de DAPI (contratinción nuclear), (B, F) regiones EdU+ (replicantes), (C, G) γ H2AX (daño genético) y (D,H) *merge* de las señales de DAPI, EdU y γ H2AX. Barra: 15 μ m. Como puede observarse en las imágenes *merge* sólo presentaron marcación de γ H2AX las células que estaban bajo síntesis de ADN (células EdU+) durante el tratamiento con HU.

Como se explicita en la sección de Materiales y Métodos, el análisis del posicionamiento de γ H2AX respecto a cromatina replicante en cada condición experimental se realizó sobre células MS/LS individuales extraídas de campos a 63X. En la Figura 15 se muestran, como ejemplo, las imágenes de fluorescencia (planos centrales) para los canales de DAPI (A, F, K), EdU (B, G, L) y γ H2AX (C, H, M) de células individuales MS/LS para algunas de las condiciones ensayadas. Tanto las imágenes *merge* de fluorescencia (D, I, N) como el *merge* con las máscaras binarias para γ H2AX y EdU, sobre el canal de fluorescencia de DAPI (E, J, O), sugirieron un nivel significativo de solapamiento entre foci de γ H2AX y regiones EdU+ (se evidenciaron extensas regiones de solapamiento entre señales en amarillo). La localización de los foci de γ H2AX en relación a las áreas EdU+ (cromatina replicante) se evaluó utilizando un índice (denominado RDDI), obtenido a partir de las máscaras binarias de los canales de DAPI, EdU y γ H2AX. El RDDI compara, por núcleo, la proporción de cromatina replicante dañada respecto a la cromatina dañada total con la proporción de cromatina replicante respecto al área nuclear total (Figura 15P). Así pudimos calcular un valor promedio de RDDI en un número representativo de núcleos MS/LS ($n \geq 45$ núcleos por condición experimental). El análisis de colocalización reveló una correlación positiva muy alta ($6.0 < \text{RDDI} < 8.1$; valores significativamente superiores a 1) entre los foci de γ H2AX y las regiones replicantes (EdU+) en los cultivos expuestos a HU. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas en los valores de RDDI entre las diferentes dosis de HU empleadas (2 mM o 8mM por 15-30 min) o la presencia (30 min) o ausencia de recuperación en medio de cultivo post-inducción de daño. Así, verificamos una localización diferente de γ H2AX cuando su formación es inducida por estrés replicativo (y no por DSB). En el último caso, como ocurre al inducir daño al ADN con BLEO, los foci mapean mayoritariamente en interfases EdU+/EdU- (Liddle et al. 2014).

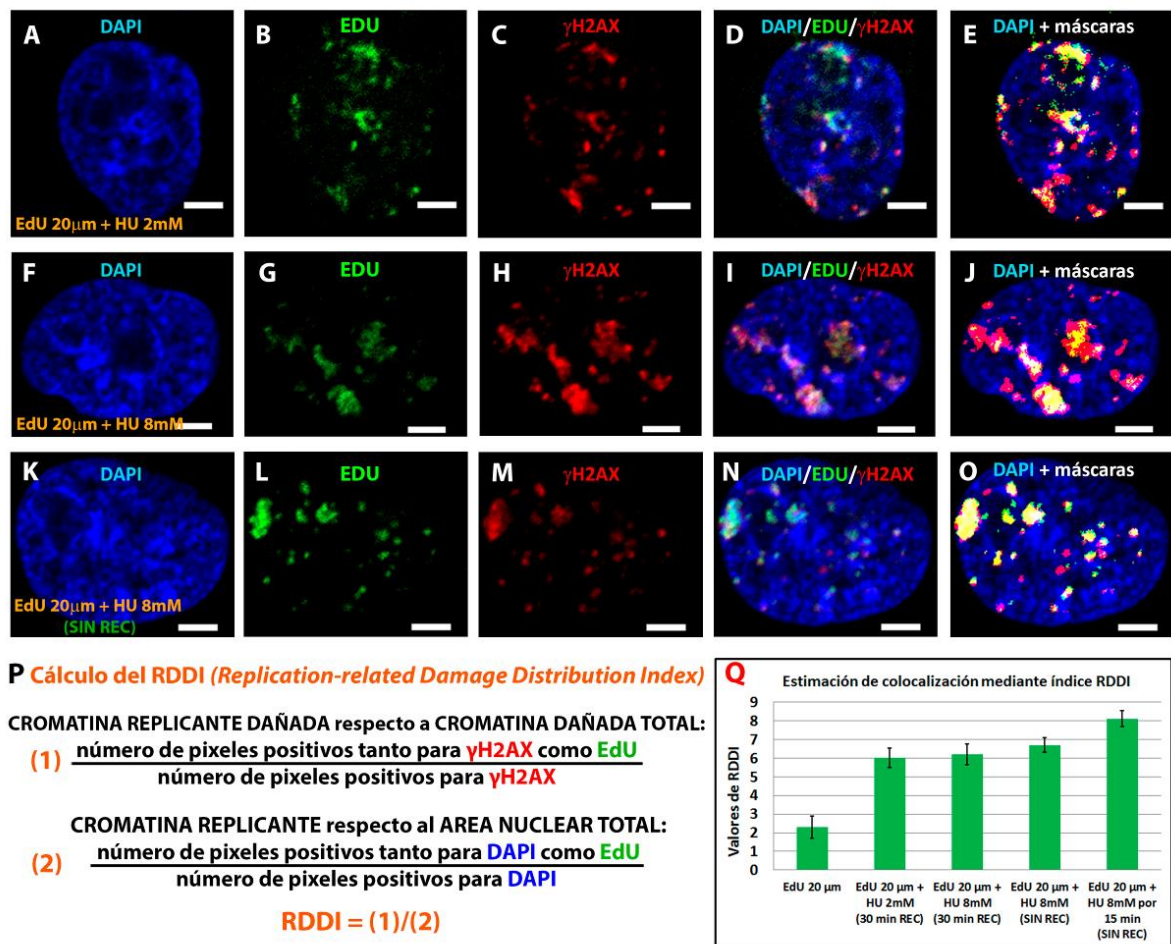


Figura 15.- Mapeo de foci de γ H2AX respecto a regiones replicantes (EdU+) en núcleos de CHO9 en fase MS/LS expuestos a HU. Los cultivos fueron expuestos a EdU 20 μ m, EdU 20 μ m + HU 2 mM o EdU 20 μ m + HU 8mM por 30 min y posterior recuperación post-daño de 30 min antes de ser fijados (PFA 4%) e inmunomarcados; o bien expuestos a EdU 20 μ m + HU 8mM por 30 ó 15 min sin recuperación post-daño (fijados en PFA 4% inmediatamente luego de finalizado el tratamiento). (A-O) Se muestran planos centrales de células individuales provenientes de cultivos expuestas a EdU 20 μ m + HU 2 mM (A-E) y EdU 20 μ m + HU 8mM (F-J) por 30 min y posterior recuperación post-daño o expuestas a EdU 20 μ m + HU 8mM (K-O) sin recuperación post-daño. Las imágenes fueron tomadas a un alto nivel de magnificación (63X, LSM ZEISS 800). Se muestran las imágenes de fluorescencia para los canales de DAPI (A, F, K), EdU (B, G, L), γ H2AX (C, H, M) y las imágenes *merge* de los canales de DAPI/EdU/ γ H2AX (D, I, N). Asimismo, se muestra la superposición de las máscaras binarias correspondientes a las señales de EdU y γ H2AX sobre el canal de fluorescencia de DAPI (E, J, O). Barra: 3 μ m. Las áreas de solapamiento en las máscaras binarias de EdU/ γ H2AX (verde/rojo) se representan en amarillo. En todos los casos se observó un alto grado de colocalización entre los foci de γ H2AX y las regiones EdU+. (P) Cálculo del RDDI. Fórmula para obtener su valor a partir de las máscaras binarias de los canales de DAPI, EdU y γ H2AX. (Q) Estimación de colocalización empleando el índice RDDI para cada una de las condiciones experimentales. Se analizaron 71>n>45 células en cada caso, provenientes de 3 experimentos independientes. El análisis de colocalización reveló una correlación positiva muy alta ($6.0 < \text{RDDI} < 8.1$) entre los foci de γ H2AX y las regiones replicantes (EdU+) en los cultivos expuestos a HU. En todos los casos, los RDDI fueron significativamente superiores a 1 (test de *t* contra valor 1, $P < 0.001$), el valor esperado si las marcas de γ H2AX y EdU mapearan en forma independiente una de otra. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas en los valores de RDDI entre los diferentes tratamientos con HU (ANOVA de una vía).

5.A.4 HU neutralizó fuertemente el efecto de BLEO en los cultivos expuestos a ambos agentes

Finalmente, realizamos experimentos de co-tratamiento con BLEO y HU a fin de determinar si el patrón de localización de foci de γ H2AX inducidos por BLEO, observado en núcleos MS/LS sobre interfases replicantes/no-replicantes (EdU+/EdU-), se modificaba bajo condiciones de estrés de replicación. Su desaparición de interfases EdU+/EdU- sugeriría que la decondensación de la cromatina durante MS/LS, asociada a la síntesis de ADN, pudo haber sido la responsable de suprimir la resistencia intrínseca de las regiones heterocromáticas a alojar foci de γ H2AX. Para evaluar este punto, realizamos experimentos donde se determinó los valores de RDDI en cultivos expuestos a BLEO (40 μ g/mL), HU (2 mM y HU 8mM) o HU + BLEO (para ambas dosis de HU) por 30 min sin recuperación post-inducción de daño. Paralelamente, evaluamos el nivel de marcación global de γ H2AX en cada condición experimental determinando la fracción de área nuclear γ H2AX+ en cada caso.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos para cada condición, ejemplificados en imágenes correspondientes a células MS/LS individuales (A-F). Comparando las imágenes correlativas de fluorescencia (A, C, E) y las máscaras binarias (B, D, F) observamos en las células MS/LS expuestas a HU + BLEO (ambas combinaciones), un patrón de localización de γ H2AX similar al detectado en núcleos MS/LS tratados sólo con HU. Es decir, un alto nivel de solapamiento entre las marcaciones de foci de γ H2AX y las regiones EdU+. Este patrón se reflejó en valores de RDDI similares entre núcleos MS/LS expuestos solamente a HU y tratados con HU + BLEO (para ambas dosis de HU) que resultaron ser muy superiores al observado en células expuestas sólo a BLEO ($6.2 < \text{RDDI} < 6.9$ versus $\text{RDDI}=1.8$; Figura 16G, grafico en naranja). En suma, evidenciamos en núcleos MS/LS expuestos simultáneamente a HU + BLEO, un efecto predominante de HU sobre BLEO, en el posicionamiento de los foci de γ H2AX respecto a regiones de cromatina replicante (EdU+). Respecto a los niveles globales de marcación de γ H2AX en MS/LS determinamos que no existió un aumento (ni aditivo ni sinérgico) en la marcación de γ H2AX nuclear debido al tratamiento combinado con ambos agentes, al comparar los resultados entre HU y HU + BLEO tanto para HU 2mM como HU 8mM (Figura 16G, grafico en rojo).

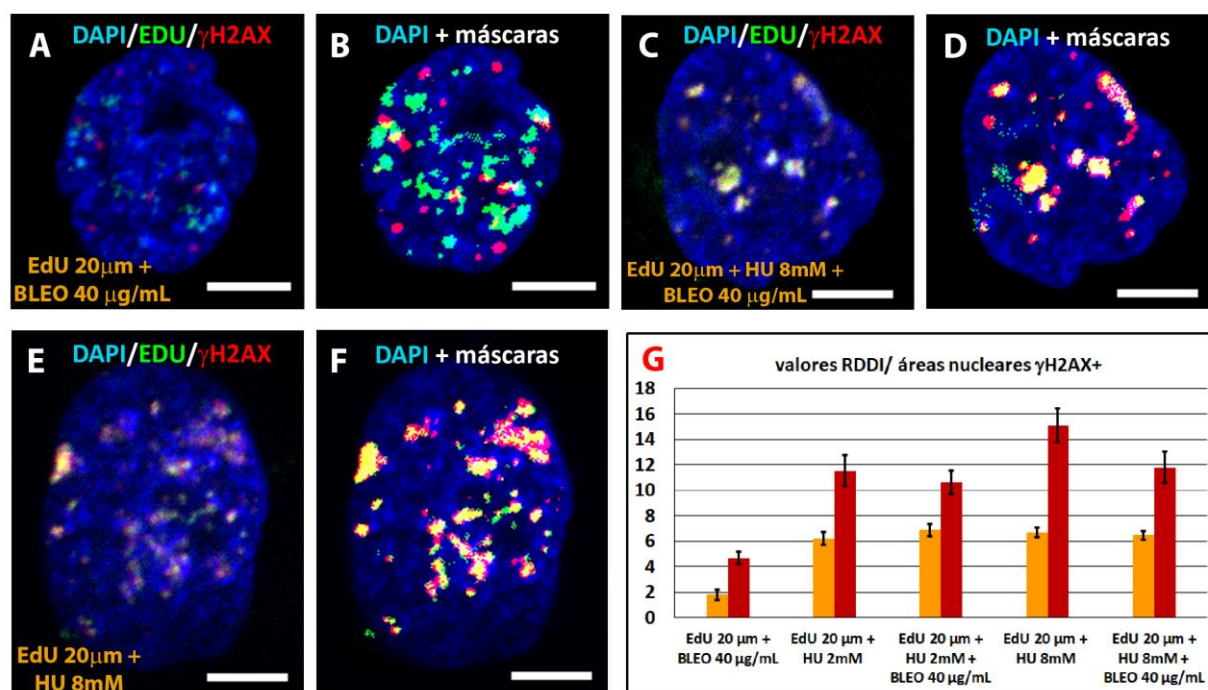


Figura 16.- Mapeo de foci de γ H2AX en relación a regiones replicantes (EdU+) en núcleos de CHO9 en fase MS/LS expuestos en forma combinada a BLEO e HU. Los cultivos fueron expuestos a BLEO 40 μ g/mL, HU 2 mM, HU 8mM o bien al tratamiento combinado con HU 2 mM + BLEO 40 μ g/mL o HU 8mM + BLEO 40 μ g/mL por 30 min sin recuperación post-daño previo a la fijación (PFA 4%) e inmunomarcación para detectar γ H2AX. Las regiones replicantes fueron identificadas, en todos los casos, mediante incubación con EdU 20 μ m durante el pulso de inducción de daño. (A-F) Se muestran planos centrales de células individuales provenientes de cultivos expuestas a EdU 20 μ m + BLEO 40 μ g/mL (A-B), EdU 20 μ m + HU 8mM (C-D) o EdU 20 μ m + HU 8 mM + BLEO 40 μ g/mL (E-F). Las imágenes fueron tomadas a un alto nivel de magnificación (63X, LSM ZEISS 800). Se muestran las imágenes *merge* de los canales de DAPI/EdU/ γ H2AX (A, C, E) y la superposición de las máscaras binarias correspondientes a las señales de EdU y γ H2AX sobre el canal de fluorescencia de DAPI (B, D, F). Barra: 3 μ m. Las áreas de solapamiento en las máscaras binarias de EdU/ γ H2AX (verde/rojo) aparecen representadas en amarillo. Se observa en los cultivos expuestos a HU + BLEO un patrón de localización de los foci de γ H2AX respecto a regiones EdU+ similar al hallado en cultivos expuestos sólo a HU (alto nivel de colocalización entre γ H2AX y regiones EdU+). Este patrón difiere al reportado en cultivos tratados solamente con BLEO donde los foci de γ H2AX se localizan en interfases EdU+/EdU- (Panel B y Liddle et al. 2014). (G) Estimación de colocalización empleando el índice RDDI (naranja) y porcentaje de área nuclear γ H2AX+ (rojo) para cada una de las condiciones experimentales. Se analizaron 45>n>32 células en cada caso, provenientes de 3 experimentos independientes. Se muestran valores promedio $\pm$ error estándar. El índice RDDI evidenció en todos los casos valores superiores a 1 (test de t contra valor 1, * P <0.01; ** P <0.001), indicando una correlación positiva entre foci de γ H2AX y regiones EdU+. Por otra parte, los cultivos expuestos a HU, ya sea exclusivamente o en combinación con BLEO, presentaron valores similares de RDDI ($6.2 < RDDI < 6.9$), difiriendo significativamente del valor detectado en BLEO ($RDDI=1.8$; ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni). En suma, evidenciamos en núcleos MS/LS expuestos a ambos agentes un efecto dominante de HU sobre BLEO respecto al posicionamiento de γ H2AX. Asimismo, no verificamos diferencias significativas en las áreas nucleares γ H2AX+ entre HU 2mM y HU 2mM + BLEO 40 μ g/mL (test de t, $p=0.56$) ni entre HU 8mM y HU 8mM + BLEO 40 μ g/mL (test de t, $p=0.21$).

Estos resultados podrían sugerir una interferencia directa de HU sobre la acción clastógena de BLEO a nivel general en los cultivos celulares expuestos a ambos agentes. Para evaluar esta hipótesis, comparamos el nivel de daño, determinando el número de foci por célula y la proporción de área nuclear γ H2AX+, en la subpoblación de núcleos no replicantes (fases G1/G2 del ciclo) de cultivos expuestos a BLEO, HU 2mM + BLEO y HU 8mM + BLEO. Constatamos en los núcleos G1/G2 expuestos simultáneamente a ambos agentes una disminución significativa en el número promedio de foci (BLEO 10.8; HU 2mM + BLEO 5.3; HU 8mM + BLEO 4.0; $p < 0.001$) y en la fracción de área nuclear γ H2AX+ (BLEO 3.5 %; HU 2mM + BLEO 1.4%; HU 8mM + BLEO 1.0%; $p < 0.001$) frente a aquellos expuestos sólo a BLEO (Figura 17). Este resultado implica que HU habría bloqueado, en gran medida, la acción clastógena de BLEO en los cultivos expuestos en forma combinada a HU + BLEO, tanto en células replicantes (fase S) como no replicantes (fases G1/G2).

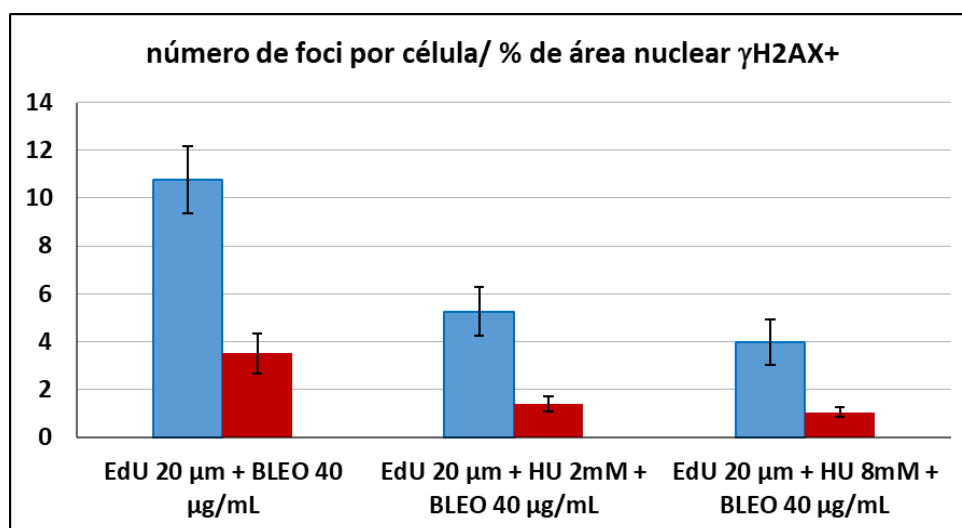


Figura 17.- Estimación del nivel de daño en el subgrupo de núcleos no replicantes (fases G1/G2) de cultivos expuestos a BLEO 40 μ g/mL, HU 2 mM + BLEO 40 μ g/mL o HU 8mM + BLEO 40 μ g/mL por 30 min sin recuperación post-daño previo a la fijación (PFA 4%) e inmunomarcación para detectar γ H2AX. Las regiones replicantes fueron identificadas mediante incubación con EdU 20 μ m durante el pulso de inducción de daño. Para cada condición experimental se determinó el promedio de foci por célula (columnas en celeste) y de la proporción de área nuclear γ H2AX+ (columnas en rojo) (media $\pm$ error estándar). Se analizaron 45>n>32 células en cada caso, provenientes de 3 experimentos independientes. Verificamos en esta subpoblación una disminución en el número promedio de foci ($p < 0.01$) y en la proporción de regiones nucleares γ H2AX+ ($p < 0.01$) en cultivos tratados simultáneamente con HU+ BLEO respecto a cultivos expuestos sólo a BLEO (ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni).

6A. Discusión

A fin de profundizar en el estudio de la interrelación entre daño genético y replicación del ADN analizamos la localización nuclear de los foci de γ H2AX respecto a regiones EdU+ en núcleos MS/LS de CHO9 sometidos a estrés replicativo utilizando HU, un compuesto que inhibe específicamente la acción de la enzima ribonucleótido reductasa. En primer lugar, estudiamos el efecto del tratamiento con HU en el rango de 2-16 mM evaluando el nivel de marcación de γ H2AX y la viabilidad celular determinada por ensayo de MTT. Verificamos un incremento progresivo de las regiones nucleares γ H2AX+ al aumentar la dosis de HU (HU 2mM: 3.1% a HU 16mM: 16 %). No obstante, no se observó una detención apreciable del ciclo celular y/o un efecto citotóxico de HU a las dosis y tiempos de incubación utilizados en el MTT (evaluado 24 h post-daño). Nuestro resultado indica que, probablemente, las horquillas de replicación detenidas durante la incubación con HU pudieron reiniciar adecuadamente la síntesis de ADN post-exposición al agente, en concordancia con estudios previos analizando la progresión de la síntesis de ADN a nivel del genoma completo en levaduras expuestas a HU (Alvino et al. 2007). Estos autores determinaron una progresión similar de la síntesis de ADN en cultivos no tratados o post-exposición a HU, constatándose sólo una velocidad de replicación más lenta en el último caso. Si bien no detectamos diferencias por MTT, trabajos previos utilizando el ensayo clonogénico determinaron una disminución de la sobrevivencia (evaluada tras 10 días de incubación) en células en fase S de CHO expuestas a diferentes dosis y tiempos de incubación con HU (Sinclair 1965). Es de mencionar que para HU 1mM el efecto fue dependiente del tiempo de exposición al compuesto, siendo la sobrevivencia de ~75% para 30 min de tratamiento con el agente. Para tiempos más prolongados, mayores a 1 h, la sobrevivencia fue menor a un 20%. La disminución de la sobrevivencia probablemente evidenció un efecto de retraso del ciclo celular, asociado al *checkpoint* de replicación producido por la interrupción de la síntesis de ADN (Ciccia y Elledge 2010), no evidenciable por MTT. Posteriormente fue reportado, en esta misma línea celular, que un tratamiento con HU 2mM por 6 h no generaba daño cromosómico (Yu y Sinclair 1968), reforzando nuestra hipótesis de una baja o nula inducción de muerte celular en nuestras condiciones experimentales (30 min de incubación con HU).

En experimentos posteriores incorporamos, durante la incubación con HU, un pulso de EdU 10 μ m para visualizar las regiones en activa replicación del ADN y así poder evaluar la relación espacial entre γ H2AX y EdU durante MS/LS, cuando replica la heterocromatina. La señal de fluorescencia de EdU disminuyó dramáticamente en los cultivos tratados con HU ($\approx$ al 15%) respecto a la obtenida en cultivos expuestos sólo a EdU 10 μ m. Este resultado evidenció el previsible efecto de inhibición en la síntesis de ADN ocasionada por HU. La disminución de señal fue semejante para todo el rango de dosis de HU. De hecho, se ha

verificado una inhibición completa de la ribonucleótido reductasa ya a bajas concentraciones y tiempos de incubación con este compuesto (0.1 mM por 10 min; también 3 mM por 5 min) (Bianchi et al. 1986). En nuestro caso, utilizamos tanto dosis (2-16 mM) como tiempos de incubación (30 min) francamente superiores por lo cual nuestros ensayos se desarrollaron probablemente bajo condiciones de inhibición total de la enzima. Así, la baja señal de EdU observada se correspondió probablemente con la inhibición del inicio de la síntesis en algunos casos y en otros con la detención del avance de horquillas de replicación. En cualquier caso, se ha demostrado, al menos en levaduras, que en presencia de HU aún persisten algunas horquillas de replicación intactas, aunque a una muy lenta tasa de síntesis de ADN (Sogo et al. 2002). Esto explicaría que nuestra señal de fluorescencia de EdU, si bien fue muy baja, no se extinguió por completo.

Tomando en consideración estos resultados preliminares empleamos una mayor concentración de EdU (20 μ M) en los ensayos posteriores, a fin de poder evaluar la colocalización entre foci de γ H2AX y regiones de cromatina EdU+ en células MS/LS individuales. EdU 20 μ M permitió visualizar estas áreas con una intensidad suficiente para evaluar la relación espacial entre las marcas de γ H2AX y EdU. Se ensayaron varias condiciones experimentales utilizando dos dosis de HU (HU 2mM y HU 8mM por 15-30 min) en ausencia o presencia (30 min) de recuperación post-daño. En todas las condiciones ensayadas sólo presentaron marcación de γ H2AX aquellas células que se encontraban en fase S (células EdU+) durante el tratamiento con HU. Las células no replicantes (fases G1/G2) no presentaron efecto alguno como consecuencia de la exposición a HU. HU interfiere específicamente la actividad de la ribonucleótido reductasa, la cual se encuentra activa únicamente en fase S. De hecho, en células de mamíferos, la actividad de esta enzima ya está suprimida en fases G0/G1 por la represión transcripcional del gen de R2 (Chabes et al. 2004).

El análisis de colocalización mediante el índice RDDI reveló una correlación positiva muy alta ($6.0 < \text{RDDI} < 8.1$) entre los foci de γ H2AX y las regiones replicantes (EdU+) en las células MS/LS expuestas a HU, no detectándose diferencias significativas en los valores de RDDI entre las diferentes condiciones experimentales. Los resultados cuantitativos obtenidos mediante el RDDI fueron consistentes con lo observado en las imágenes de fluorescencia, las cuales ya mostraban un nivel muy significativo de solapamiento entre foci de γ H2AX y regiones EdU+. Como se mencionó anteriormente (sección 1.6) varios trabajos han evidenciado un posicionamiento preferencial de los foci de γ H2AX sobre las regiones eucromáticas (Kim et al. 2007; Karagiannis et al. 2007; Falk et al. 2008; Vasireddy et al. 2010), lo cual se debería tanto a una mayor susceptibilidad a la inducción de daño genético en estas regiones como a una respuesta diferencial en regiones de eu- y heterocromatina. Es de mencionar que estos resultados se obtuvieron a nivel global en las poblaciones

celulares, sin discriminar los núcleos por fase del ciclo celular. A pesar de estos antecedentes, en nuestro caso evidenciamos en los núcleos MS/LS un posicionamiento de los foci de γ H2AX casi exclusivo sobre las regiones de heterocromatina replicante EdU+, no presentándose marcación de γ H2AX en un nivel apreciable en las regiones eucromáticas no replicantes (EdU-). Este resultado implica que la replicación del ADN moduló la localización de γ H2AX en los núcleos en fase S bajo exposición a HU. El estancamiento de las horquillas de replicación es seguramente la principal (o única) fuente de fosforilación de H2AX en este caso. En este sentido, la resistencia intrínseca de las regiones heterocromáticas a sufrir fosforilación de H2AX, debido a su alto nivel de condensación cromatínica, parece ser, al menos temporariamente, mitigado por el proceso “en marcha” de intento de replicación del ADN. Se ha demostrado que el estrés de replicación generado por HU (Sogo et al. 2002) genera regiones de decondensación cromatínica, hasta el nivel de ssADN, lo cual contribuiría a superar la barrera característica de las regiones heterocromáticas a ser fosforiladas. Cowell et al. (2007) estudiaron también la localización de γ H2AX en células replicantes luego del tratamiento con HU 2mM por 1 h. Las imágenes de fluorescencia sugieren que estos autores también detectaron en núcleos MS/LS un solapamiento total de γ H2AX con áreas heterocromáticas, identificadas en su caso por marcación de la proteína heterocromática HP1 α . En este estudio, no obstante, la clasificación de los núcleos en fases ES y MS/LS se basó en experimentos de sincronización celular y fijación a diferentes tiempos, pero no en la visualización directa de las regiones de ADN replicante (por ejemplo con pulsos de EdU). La existencia de un impacto de la síntesis de ADN sobre la distribución nuclear de γ H2AX fue reportado previamente por nuestro grupo en células CHO9 expuestas a BLEO (Liddle et al. 2014), donde los foci de γ H2AX se asocian mayormente a la presencia de DSB. Allí también determinamos una localización preferencial de γ H2AX en dominios cromatínicos de activa replicación (EdU+) durante el tratamiento con el radiomimético.

Sin embargo, en núcleos expuestos a BLEO los foci mapearon mayoritariamente en interfases EdU+/EdU- (Figura 16B y Liddle et al. 2014) exhibiendo un solapamiento menor entre las marcaciones de γ H2AX y EdU que en el caso de HU. Obtuvimos así patrones diferentes de localización de γ H2AX cuando su formación es inducida por estrés replicativo o a causa de DSB. Nuestros resultados sugerirían entonces que la localización en interfases EdU+/EdU- ocurre únicamente en el caso de foci asociados a DSB. Berniak et al. (2013) evidenciaron un patrón similar de distribución de los foci de γ H2AX inducidos por tratamiento con camptotecina en relación a los sitios EdU+ en núcleos A549. Debido al mecanismo de acción de este agente, los foci se habrían originado principalmente por DSB producidas a causa de horquillas de replicación colapsadas (y no directas como ocurre mayormente con BLEO). Para ambos agentes el posicionamiento recurrente en interfases EdU+/EdU- podría responder a movimientos cromatínicos post-daño ligados a la ya reportada decondensación

local provocada durante la DDR (Kruhlak et al. 2006). En este sentido, podría haberse producido un incremento de la distancia inicial entre los foci de γ H2AX asociados a la replicación y los sitios EdU+ al momento de fijación de las células o bien la migración de las lesiones a las regiones de interfase EdU+/EdU- con la concomitante propagación de la fosforilación de H2AX a γ H2AX para formar los foci apreciables microscópicamente. De hecho, ya se ha demostrado la migración de las DSB formadas en las regiones heterocromáticas hacia las interfases eucromatina/heterocromatina que para su reparación (Jakob et al. 2011; Chiolo et al. 2011).

La generación de horquillas de replicación con estructuras anormales conteniendo ADNss activa la respuesta al estrés de replicación, la cual está ante todo mediada por ATR. Junto con otros factores en *downstream*, ATR colabora con la estabilización y la reanudación de las horquillas de replicación estancadas, lo cual evita, al menos transitoriamente, la formación de daño en el ADN. Las horquillas de replicación que son estabilizadas por la vía ATR son capaces de reanudar su labor luego que la fuente de estrés ha sido removida (Nam y Cortez 2011). En este sentido, la demostración que las células CHO9 poseen una ATR activa (Sultana et al. 2013) torna improbable que un corto tratamiento con HU (15-30 min) pueda haber generado el colapso de horquillas de replicación (lo cual puede desembocar en la generación de DSB) (Peterman y Helleday 2010). De hecho, resultados de estudios previos sugieren que las horquillas de replicación estancadas, inducidas por HU, se mantienen estables y competentes para reanudar la síntesis de ADN por varias horas (Peterman et al. 2010), siendo necesario un tratamiento prolongado (≥ 12 h) para que colapsen a DSB. Estos autores también observaron que la señal de γ H2AX colocalizaba fuertemente con los foci de la proteína RPA. Este resultado indicaría que en el caso de células bajo estrés de replicación γ H2AX se limitaría a posicionarse sobre las regiones de ADNss generadas yuxtapuestas a las horquillas estancadas. Así, γ H2AX no sufriría una propagación tan extensa como en el caso de los foci originados por DSB ni sufriría movimientos cromatínicos post-daño asociados a decondensación los cuales podrían explicar el posicionamiento recurrente de los foci en las interfases EdU+/EdU-.

Realizamos también ensayos de co-tratamiento con BLEO + HU donde evaluamos si el patrón de localización de foci de γ H2AX se localizaba en interfases replicantes/no-replicantes (como ocurre en núcleos MS/LS expuestos sólo a BLEO) bajo condiciones de estrés de replicación. Para ello, determinamos los RDDI y el nivel de marcación nuclear global de γ H2AX en cultivos expuestos a BLEO (40 μ g/mL), HU (2 mM y 8 mM) o BLEO + HU (ambas combinaciones). Constatamos un patrón de distribución similar de γ H2AX en núcleos MS/LS expuestos únicamente a HU o tratados con HU + BLEO (para ambas dosis). Este patrón se reflejó en RDDI similares y porcentajes de área nuclear γ H2AX+ comparables

bajo estos esquemas experimentales. El efecto dominante de HU sobre BLEO no se limitó a los núcleos replicantes, sino que también se verificó en núcleos G1/G2. En esta subpoblación celular se produjo una disminución significativa en el número promedio de foci por célula y en la proporción de área nuclear γ H2AX+ comparando núcleos expuestos a BLEO + HU con núcleos tratados solo con BLEO. En suma, podemos concluir que HU habría impedido, por algún mecanismo, la inducción de daño por BLEO en los cultivos tratados en simultáneo con ambos agentes.

Se ha evidenciado que la capacidad citotóxica y mutagénica de BLEO depende de diversos factores, entre ellos la eficiencia en la captación del radiomimético a nivel de la membrana celular (Pron et al. 1993, 1999), ya que por su tamaño BLEO es incapaz de difundir a través de la misma, y la presencia de factores específicos imprescindibles para formar una BLEO activa. Se ha demostrado que BLEO requiere la presencia de un metal de transición reducido [Fe(II) o Cu(I)], oxígeno y un agente reductor para que se genere una BLEO activada. Únicamente la BLEO unida a estos metales puede catalizar la formación de SSB y DSB en el ADN (Burger et al. 1981). Al menos *in vivo* se forma en el plasma el complejo BLEO-Cu(II), el cual sería transportado al interior de las células (Kanao et al. 1973). Intracelularmente, BLEO-Cu(II) es reducido a BLEO-Cu(I). Este complejo puede entrar al núcleo e intercambiarse con Fe(II) formando BLEO-Fe(II) (Murray et al. 2018). En cualquier caso, tras reaccionar con O₂ cualquiera de las dos formas es capaz de iniciar el proceso de clivaje del ADN. Mediante espectrofotometría se ha constatado que HU es un agente quelante, pudiendo interactuar con iones de Cu(II), Fe(II) y Fe(III) y formar complejos con estos metales en un amplio rango de condiciones, por ejemplo, en una proporción 1:1 a pH 5 (Konstantinou et al. 2011). En este sentido, HU probablemente disminuyó considerablemente la concentración de estos iones dentro de las células, con la consiguiente supresión en la generación de la BLEO activada mutagénica en aquellos cultivos expuestos simultáneamente a ambos agentes.

4B. Materiales y métodos

4.B.1 Cultivo de células

Se cultivaron células HeLa (DSMZ, Alemania #161) en medio de cultivo RPMI 1640 con L-glutamina (Sigma-Aldrich R8758) y SFB al 10% (v/v) (Sigma-Aldrich F7524), 100 U/mL de penicilina- 0.1 mg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich P4333), 1% de solución de aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich F7524) y 1 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich S8636) en frascos de cultivo T25 a 37°C y 5% CO₂. Dos días antes de realizar los experimentos se sembraron 10.000 células/pocillo en portaobjetos en cámara Lab-Tek II de 8 pocillos (Nunc #154534, Thermo Fischer Scientific).

4.B.2 Tratamientos con BLEO e inhibidores de quinasas de H2AX

El daño en el ADN fue inducido mediante un pulso de BLEO de 45 min (Sigma-Aldrich #15361). Inicialmente, se realizó una curva dosis-respuesta (5-160 µg/mL de BLEO) y un análisis cinético (permitiendo una recuperación post-daño de 0-2 h en medio de cultivo fresco). La dosis de 20 µg/mL de BLEO (BLEO20) sin tiempo de recuperación (0 h) fue elegida para los experimentos posteriores.

Para inhibir ATM, ATR y DNA-PK, las células HeLa fueron pre-tratados por 1 h y luego co-expuestas a BLEO20 y los inhibidores (uno por uno y en combinaciones). Se utilizaron las siguientes concentraciones: 20 µM KU-55933 (ATMi, Sigma-Aldrich SML1109) en 0.4% DMSO, 20 µM VE-821 (ATRi, Sigma-Aldrich SML 1415) en 0.4% DMSO y/o 20 µM NU7026 (DNA-PKi, Sigma-Aldrich N1537) en 0.4% DMSO. Siempre se realizaron en paralelo controles del vehículo (disolvente).

4.B.3 Inmunomarcación de γ H2AX

Las células fueron fijadas por 10 min en una solución de PFA 3.7% mediante la dilución 1:10 en PBS de un stock de formaldehído al 37% (Sigma-Aldrich #252549). Luego, las monocapas celulares fueron lavadas en PBS (3 x 5 min), permeabilizadas (15 min en 0.5% Tritón X-100 en PBS), bloqueadas 30 min en 2% BSA en PBS, y luego incubadas durante 1 h a TA con un anticuerpo monoclonal de ratón anti- γ H2AX (Abcam, ab26350) diluido 1:500 en buffer de bloqueo. Se realizaron también controles sin anticuerpos primarios (esto es, expuestos solamente al *buffer* de bloqueo en esta etapa) a los que se les denominó como Ab control (*antibody control*). Luego de un lavado en 0.1% Tween-20 en PBS (PBS-T, 3 x 5 min), las células fueron incubadas por 45 min a TA con el anticuerpo secundario. Se utilizó un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 532 (dilución 1:500) (Life Technologies A-11002) o un fragmento F(ab')₂ de cabra anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 647 (dilución 1:500) (Life Technologies A-21237). Finalmente, las células fueron lavadas en

PBS-T (3 x 5 min) y mantenidas en PBS durante 1-5 días hasta la toma de imágenes por CLSM o dSTORM.

4.B.4 Microscopía Láser Confocal (CLSM)

El efecto de los inhibidores de quinasa de H2AX, ya sea en forma individual o combinado, en la formación de foci de γ H2AX fue evaluado por CLSM. Se obtuvieron *z-stacks* de 1,024×1,024 píxeles con un tamaño de pixel de 0.198×0.198 μ m y 1.0 μ m de *step size* entre secciones ópticas en un microscopio Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemania) equipado con láseres de excitación de longitudes de onda 555 nm (Alexa Fluor 532) y 639 nm (Alexa Fluor 647), y un objetivo de inmersión en aceite 63x (NA=1.4). Los settings de adquisición de imágenes se mantuvieron idénticos en cada experimento para poder realizar comparaciones entre diferentes tratamientos. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas en el programa Fiji (<https://fiji.sc/>) para determinar el número de foci de γ H2AX por núcleo en cada condición. Para ello, se segmentaron primeramente los foci de γ H2AX mediante umbrales (*thresholds*) de intensidad (valor constante por experimento entre condiciones). Luego, utilizamos el plugin *3D Object Counter* para contar el número total de foci por *stack* con un filtro de tamaño de 5-100 vóxeles. Se consideró un volumen máximo de 100 vóxeles para eliminar los objetos segmentados provenientes de células pan-nucleares para γ H2AX. Finalmente, se determinó el número de células (excluyendo las células pan-nucleares para γ H2AX) usando el plugin *Cell Counter*, lo cual nos permitió calcular el número de foci por núcleo para cada condición.

4.B.5 Registro de imágenes por dSTORM

Se tomaron imágenes por nanoscopía dSTORM de células individuales de células control y de cultivos expuestos a BLEO20, ya sea expuestos sólo a este compuesto o co-tratados con inhibidores de quinasas de H2AX. Puesto que la supresión de la formación de los foci de γ H2AX en núcleos de BLEO20 se maximizó bajo el co-tratamiento con los tres inhibidores de quinasas en simultáneo (ATMi, ATRi, DNA-PKi) (núcleos BLEO20 + 3i) esta condición fue la elegida para la toma de imágenes por dSTORM. Adicionalmente, para excluir la posibilidad de un cambio cualitativo en la nanoestructura de los foci de γ H2AX dependiente de la dosis y/o del tiempo de recuperación post-daño, se tomaron también imágenes de células expuestas a BLEO en el rango 5-160 μ g/mL o a las que se les permitió una recuperación post-daño de 0.5-2 h en medio de cultivo fresco.

Inmediatamente antes del registro de imágenes, el PBS fue remplazado por el *buffer* de *photoswitching*. Esta solución contenía 100 mM de clorhidrato de β -mercaptoetilamina (MEA, Sigma-Aldrich) en PBS para Alexa Fluor 532, o el mismo buffer con un sistema *scavenger* de oxígeno (2 % (w/v) glucosa, 4 U/mL glucosa oxidasa y 80 U/mL catalasa) para

Alexa Fluor 647. En ambos casos, el pH del *buffer* fue ajustado a 7.4 con KOH para alcanzar un efecto de *photoswitching* óptimo.

La toma de imágenes por súper-resolución se llevó a cabo como se describe en van de Linde et al. (2011). Esto es, se tomaron imágenes de dSTORM con un microscopio invertido (IX-71; Olympus) equipado con dos cámaras EMCCD de alta sensibilidad (ANDOR IXON DU-897) y una platina tipo *nosepiece* (IX2-NPs; Olympus) para minimizar el desvío (*drift*) en el eje z (o sea, evitar cambios en la distancia entre la muestra y el objetivo) durante el registro de imágenes. Para la excitación de Alexa Fluor 532 y Alexa Fluor 647 se utilizaron, respectivamente, un láser diodo de 532-nm y un láser diodo de 641-nm (Cube 640-100C, Coherent) limpiados (*cleaned*) espectralmente con un filtro (Laser Clean-up filter 640/10, Chroma).

Para cada una de las medidas de dSTORM seleccionamos primeramente la célula de interés y el plano focal más adecuado (un plano central) por luz transmitida. Luego, se activó la luz de fluorescencia y la célula fue centrada en el campo de la cámara a baja intensidad de láser. A continuación, la intensidad de irradiación fue incrementada ($\sim 5 \text{ kW/cm}^2$) para transferir la mayoría de los fluoróforos a su estado OFF. Cuando se observó un *photoblinking* adecuado (30-60 s más tarde), se registró un *stack* de imágenes de 20.000 *frames* con un tiempo de exposición de 15 ms por *frame* en modo de iluminación HILO (*Highly Inclined and Laminated Optical sheet*). En esta forma de iluminar la muestra, la luz láser es direccionado con un cierto ángulo a través de la misma. Esto permite una profundidad en la toma de imágenes de hasta 10 μm , con una relación señal:ruido ligeramente inferior al de la iluminación TIRF.

Las imágenes de súper-resolución fueron reconstruidas en el *software* rapidSTORM 3.3 (Wolter et al. 2012) con un umbral de intensidad mínima de 600 fotones y un tamaño de pixel de 10 nm.

Todas estas etapas (cultivo celular y tratamientos, inmunomarcación, CLSM y dSTORM) fueron realizadas en el Departamento de Biotecnología y Biofísica de la Universidad de Würzburg (Alemania).

4.B.6 Análisis cuantitativo de los datos

Se realizó un análisis de clusters sobre los archivos de localizaciones generados por el rapidSTORM 3.3, con el objetivo de detectar potenciales agregados de señal de γH2AX dentro de los núcleos, asociados con las regiones de foci de γH2AX o con las áreas nucleares remanentes. Adicionalmente, se comparó la distribución de las coordenadas de moléculas entre condiciones.

Para el análisis de clusters se cargaron las listas de las coordenadas de localizaciones en el programa SR-Tesseler (<http://www.iins.u-bordeaux.fr/team-sibarita-SR-Tesseler?lang=en>; Levet et al. 2015). SR-Tesseler realiza el cálculo de diagramas de Voronoï en 2D (teselación de Voronoï) (Aurenhammer, 1991) y permite la subsecuente segmentación de grupos de localizaciones como “objetos de interés” basado en uno o más parámetros calculados para cada una de las localizaciones en el diagrama. El procedimiento implica las siguientes etapas:

1. Teselación de Voronoï: Un diagrama de Voronoï es un conjunto de polígonos calculados a partir de las coordenadas x,y de las moléculas en los archivos de localización. Cada localización es un punto que define una región de Voronoï delimitada por un polígono que, en su interior, no tiene otra localización más cercana. Los polígonos de Voronoï quedan definidos a partir de segmentos rectos y puntos de unión de segmentos que separan cada región de sus vecinos: cada segmento recto es equidistante de dos localizaciones mientras que los puntos de unión entre segmentos están equidistantes de tres o más localizaciones diferentes (ver animación aclaratoria en: en.wikipedia.org/wiki/Voronoi_diagram#/media/File:Voronoi_growth_euclidean.gif).
2. Segmentación de objetos basada en parámetros: Una vez que los polígonos de Voronoï se han calculado, se definen los objetos (en nuestro caso, clusters de señal de γ H2AX) como conjuntos de localizaciones de polígonos de Voronoï adyacentes que presentan una densidad local similar (de primer orden) y/o yacen dentro de un rango dado de proximidad (distancia de corte, *cut distance*). La densidad de primer orden de cada localización se calcula considerando sus localizaciones vecinas (más cercanas que cualquier otra localización), y comparándola contra la densidad de una distribución de referencia que es espacialmente uniforme, calculada como el número de localizaciones dividido por el área de la imagen. Luego, un umbral de factor de densidad (α), el cual es un múltiplo de la densidad de localización de la imagen de referencia, se aplica a la lista de localizaciones del archivo: los objetos de interés segmentados son aquellos que tienen una densidad de localización igual o mayor que α . El parámetro *cut distance* (distancia de corte) define un máximo de separación entre localizaciones para que estas puedan considerarse como pertenecientes al mismo objeto. El parámetro *minimum area* define un valor umbral mínimo para que un objeto dado sea considerado como tal.

4.B.6.1 Segmentación de las regiones de foci de γ H2AX

Primeramente, se segmentaron las regiones de foci de γ H2AX en núcleos control y BLEO20 a fin de analizar por separado la señal de γ H2AX dentro de los foci de γ H2AX foci de la señal de γ H2AX presente en cualquier otro lugar del núcleo (ver Figura 23). En células BLEO20 + 3i, las cuales no exhibían foci de γ H2AX no se realizó este paso. Se realizó manualmente el dibujo del contorno nuclear (región de interés, ROI) para cada célula para confinar las mediciones a las señales de γ H2AX nucleares.

A continuación de la teselación de Voronoï, los foci de γ H2AX fueron segmentados como objetos del SR-Tesseler en las ROI nucleares ajustando α y el área mínima de focus a ser considerada. Puesto que se ha reportado un rango de áreas de focus de γ H2AX aproximadamente entre 0.1-0.8 μm^2 (Costes et al. 2010), consideramos áreas mayores o iguales a 0.025 μm^2 a fin de incluir, además potenciales foci de muy pequeño tamaño. El valor de α para llevar a cabo la segmentación de los foci fue elegido probando diferentes valores mientras se chequeaban visualmente los resultados de la segmentación (Figura 18). $\alpha=1.0$ (núcleos BLEO20) y $\alpha=2.0$ (controles) produjeron el mejor *match* con los foci de γ H2AX observados en las imágenes originales.

El resultado de la etapa de segmentación de objetos fue un archivo de texto (denominado *Export locs ID*), en el cual cada localización fue guardada y asociada a un *object index*. El *object index* indica a que focus (objeto) pertenecía cada localización, agrupándose con un index 0 aquellas localizaciones no asociadas a ningún focus. A partir de los datos de *Export locs ID* de cada imagen, se calcularon polígonos de envolvente convexa (*convex hull*) para cada objeto mediante la aplicación de un *script* en Python personalizado (*custom*), a fin de generar archivos por separado de: (a) localizaciones dentro de los foci de γ H2AX y (b) las localizaciones remanentes, no asociadas a foci. El *script* implementado comprende las siguientes etapas:

1. Para cada conjunto de localizaciones con el mismo *object index* se calculó un polígono de envolvente convexa (de Berg et al. 2000). En un polígono de envolvente convexa, algunas localizaciones se vuelven vértices de polígono, mientras que el resto se vuelven puntos interiores. Ambas fueron consideradas como localizaciones de foci, mientras que los puntos ubicados en el exterior de la envolvente convexa fueron consideradas localizaciones no asociadas a foci.
2. Se observó que algunas localizaciones del exterior yacían muy cerca de los polígonos de envolvente convexa pero permanecían afuera, lo cual resultaba en la aparición de halos rodeando la mayoría de los polígonos. Las localizaciones que forman los halos pertenecen a polígonos de Voronoï significativamente mayores (de

baja densidad) que aquellos incluidos en la segmentación (alta densidad) y no podrían ser incluidos en las regiones de foci de γ H2AX sin disminuir el valor α previamente optimizado.

3. Un parámetro de distancia d adicional se definió para incluir además las localizaciones que componían los halos dentro de las regiones de foci de γ H2AX segmentadas dentro del rango especificado por este parámetro. Se determinó que un valor de $d = 50$ nm resultaba apropiado para remover los halos (ver Figura 19).
4. Utilizando las localizaciones de cada envoltura convexa y aquellas ubicados dentro del umbral de distancia d , se calculó un nuevo conjunto de polígonos de envoltente convexa. Para poder aproximarse al área de cada focus se implementó mediante un *script* en Python el algoritmo *shoelace* para áreas de polígonos (Braden 1986), y se aplicó a los polígonos de envoltente convexa.
5. El *script* produce dos archivos de localización: uno sólo con las localizaciones de foci de γ H2AX y el otro con las localizaciones nucleares remanentes (no asociadas a foci).

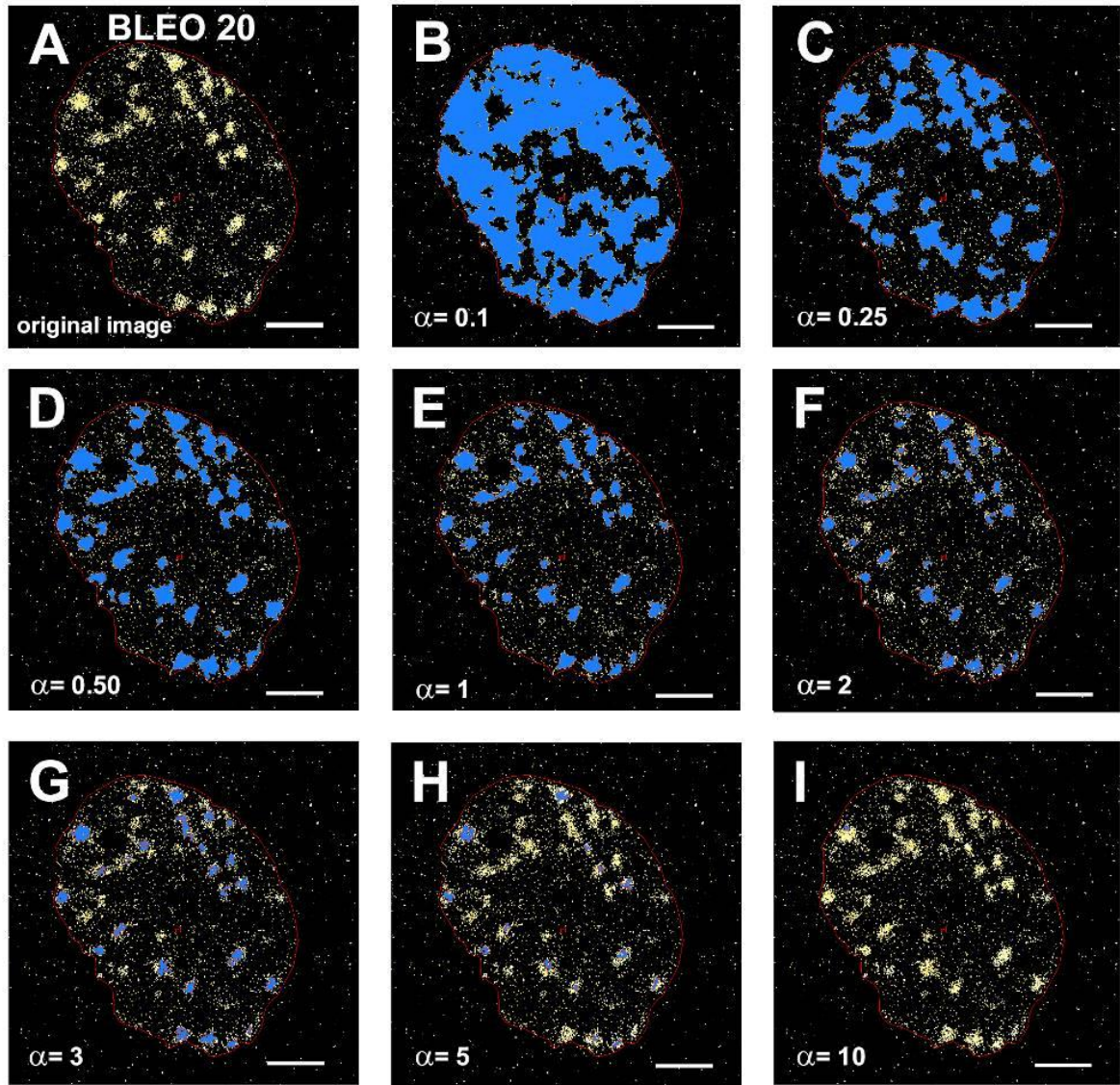


Figure 18.- Selección del umbral en el factor de densidad (α) para segmentar las regiones de foci de γ H2AX de los núcleos control y BLEO20. En cada caso, la inspección visual de los resultados de la segmentación fue considerada para ajustar el valor óptimo de α . Se ejemplifican los resultados en un núcleo BLEO20 (A-I). A partir de la imagen del archivo de localización (A), se muestran las imágenes de salida que albergan las regiones de foci de γ H2AX segmentadas obtenidas al aumentar los valores de α (0.1-10) (B-I). Las localizaciones correspondientes asociadas, en cada caso, a las regiones de foci de γ H2AX segmentadas después de aplicar los distintos α se representan en azul. El ROI nuclear (r1) está delineado por la línea roja. Barra: 3 μ m. Como se ve en la imagen, los valores de $\alpha \leq 0.25$ sobreestimaron el número de áreas nucleares asignadas como foci (B-C), mientras que la aplicación de valores de α dentro del rango [0.5, 2] (D-F) coincidió con los foci observados en la imagen original (A). El uso de $\alpha \geq 3$ resultó en un número creciente de foci no segmentados (G-I), ya que los valores de α se volvieron tan exigentes que la mayoría de las localizaciones pertenecientes a regiones de foci de γ H2AX fueron vinculadas incorrectamente a áreas de no-foci. En los núcleos BLEO20, $\alpha = 1.0$ fue el valor del parámetro que mejor igualó la segmentación de foci obtenida con las regiones de foci de γ H2AX. Dado que la densidad de localización media en todo el núcleo fue menor en los controles (307 localizaciones/ μ m²) que en los núcleos tratados con BLEO (620 localizaciones/ μ m²) se necesitó un valor de α más alto en estas células para lograr una segmentación adecuada. $\alpha = 2.0$ fue el valor que mejor ajustaba la segmentación de los foci con los foci de γ H2AX endógenos en las células control.

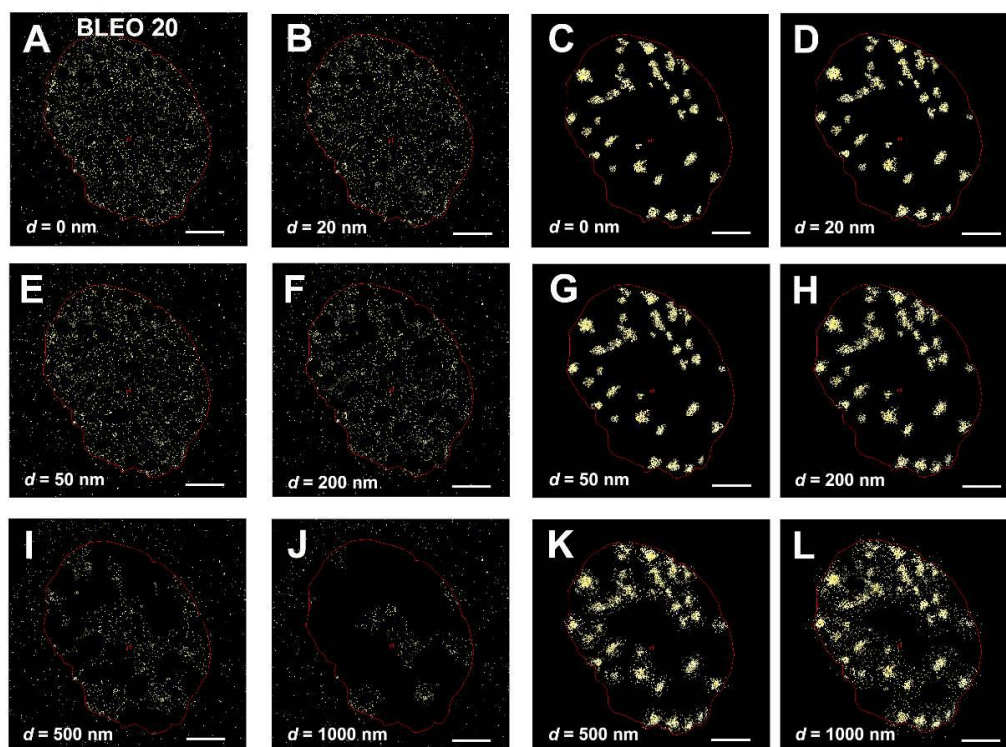


Figura 19.- Ajuste del parámetro de distancia d . Se implementó un *script* en Python para calcular los polígonos de envolvente convexa extendidos para cada focus de γ H2AX, parametrizados mediante una distancia d , con el propósito de producir dos nuevos archivos de localización a partir de cada imagen original (núcleos control y BLEO20 con las localizaciones asociadas a foci y regiones de no-foci) (ver Figura 23 para más detalles). Puesto que los parámetros para la segmentación de foci disponibles en el SR-Tesseler produjeron polígonos de envolvente convexa (regiones de foci) con localizaciones colindantes que no podían ser incluidas con ningún conjunto de valores del parámetro, se implementó dentro del *script* de Python un paso de post-procesamiento para incluir estas localizaciones. d es una distancia extra frontera desde cada envolvente convexa que define una vecindad a fin de incluir localizaciones más allá de los polígonos de envolvente convexa, reasignándolas como parte de las regiones de foci segmentadas. (A-L) Imágenes de salida para un núcleo de BLEO20 obtenidas con el aumento progresivo del valor de d (0-1000 nm). Se muestran los conjuntos de localizaciones asociadas a áreas de no-foci (A-B, E-F, I-J) y las localizaciones restantes correspondientes, asociadas a los foci de γ H2AX (C-D, G-H, K-L). La ROI nuclear (r1) se encuentra delimitada por la línea roja. Barra: 3 μ m. Como se observa en (A), la utilización sólo de los polígonos de envolvente convexa, sin una distancia adicional ($d=0$) para cada objeto (focus de γ H2AX) resultó en un halo de puntos (localizaciones) alrededor de cada focus de γ H2AX sustraído. $d=20$ produjo un impacto modesto en la desaparición de los halos (B), mientras que $d=50$ nm fue capaz de removerlos con éxito (E), reasignando las localizaciones de los halos a las áreas de foci agrupadas (G). vecindades más grandes ($d \geq 200$ nm) resultó en una sobre-segmentación, con localizaciones claramente fuera de los foci de γ H2AX asignadas a las regiones de foci (H-L).

4.B.6.2 Cuantificación de los nanofoci confinados a los foci de γ H2AX

Los archivos de localización que contenían únicamente las localizaciones de los foci de γ H2AX de núcleos control y BLEO20 fueron utilizadas para identificar los agregados (*clusters*) de señal de γ H2AX dentro de ellos. Los nanofoci fueron segmentados con los siguientes ajustes: $\alpha=20$, distancia de corte=20, y área mínima=50 nm². Para cada célula, se obtuvo una lista que constaba de los objetos segmentados junto con sus áreas individuales.

Siendo que la resolución lateral del dSTORM puede alcanzar 20-30 nm, y asumiendo que los nanofoci presentan una forma tipo circular, se consideró a los objetos con áreas de hasta 2000 nm² como nanofoci individuales, entre 2000-4000 nm² como 2 nanofoci (parcialmente) fusionados, y así sucesivamente. Siguiendo esta regla, se calcularon el número promedio y la densidad (número/ μ m²) de nanofoci por *focus* de γ H2AX en núcleos control y de BLEO20.

Las áreas de los nanofoci fueron estimadas como las áreas de los foci de γ H2AX, esto es, ajustando la distancia adicional d ($d=5$ nm) y aplicando el algoritmo *shoelace*. Luego se calcularon, los diámetros del área equivalente asumiendo una forma tipo circular de los nanofoci, de acuerdo con la fórmula: $diameter = \sqrt{4 \cdot area / \pi}$

4.B.6.3 Cuantificación de la señal de γ H2AX dispersa en las regiones nucleares sin foci de γ H2AX

Se emplearon los archivos de localización de los núcleos BLEO20 + 3i así como los de las células del control o BLEO20 que comprendían las localizaciones nucleares remanentes no asociadas a foci para evaluar la presencia de la marca de γ H2AX dispersa. Esta señal fue segmentada con los siguientes ajustes: $\alpha=5$, distancia de corte=20 y área mínima=50 nm². El número promedio de señal de γ H2AX dispersa por sección nuclear fue calculada como en la sección anterior. Para determinar las densidades nucleares, se calcularon las áreas de las ROI con el algoritmo *shoelace* (como con los foci de γ H2AX). Además, la presencia de señal dispersa fue calculado en las imágenes de *Ab control* para establecer su importancia en cultivos incubados solamente con el anticuerpo secundario.

4.B.7 Análisis estadístico

Cuando fue necesario se realizaron los siguientes ensayos estadísticos en Microsoft Excel 2016 (test de t para dos muestras no pareado) y en la página online <https://astatsa.com> (ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni) con un nivel de confianza del 95%.

5.B. Resultados

5.B.1 Foci de γ H2AX inducidos por BLEO: curva dosis-respuesta, cinética de los foci y sensibilidad a los inhibidores de las quinasas ATM, ATR y DNA-PK

A fin de seleccionar las condiciones apropiadas de trabajo para llevar a cabo un análisis completo por dSTORM en células HeLa, se llevaron a cabo experimentos preliminares variando la dosis de exposición a BLEO (rango: 5-160 μ g/mL) y el tiempo de recuperación post-daño (0-2 h). La curva dosis-respuesta mostró un nivel estable en el número de foci de γ H2AX entre BLEO 5-80 μ g/mL, con un incremento luego de la exposición a BLEO 160 μ g/mL (Figura 20A).

Consideramos que para nuestro propósito la dosis de BLEO 20 μ g/mL (BLEO20) era suficiente para provocar un aumento considerable en el número de foci, triplicando los detectados en células control. El estudio de cinética temprana (0-2 h post-tratamiento) evidenció una leve tendencia al aumento en el número de foci, la cual, no obstante, no fue estadísticamente significativa (Figura 20B). Por este motivo, elegimos el esquema experimental más sencillo, o sea, fijar las células inmediatamente luego del tratamiento de 45 min.

La especificidad de la señal de γ H2AX fue testeada empleando inhibidores de las quinasas de H2AX (ATM, ATR and DNA-PK), con el objetivo de suprimir la fosforilación de H2AX a γ H2AX luego de la inducción de daño con BLEO. Como se observa en la Figura 20A, la formación de foci de γ H2AX fue principalmente dependiente de ATM. En contraposición, la inhibición de ATR y/o DNA-PK no generó efecto por sí misma. Su efecto fue evidente sólo si ATM también se inhibía. Puesto que el uso de los tres inhibidores en simultáneo disminuyó el número de foci al nivel del control elegimos esta combinación para realizar la toma de imágenes por dSTORM.

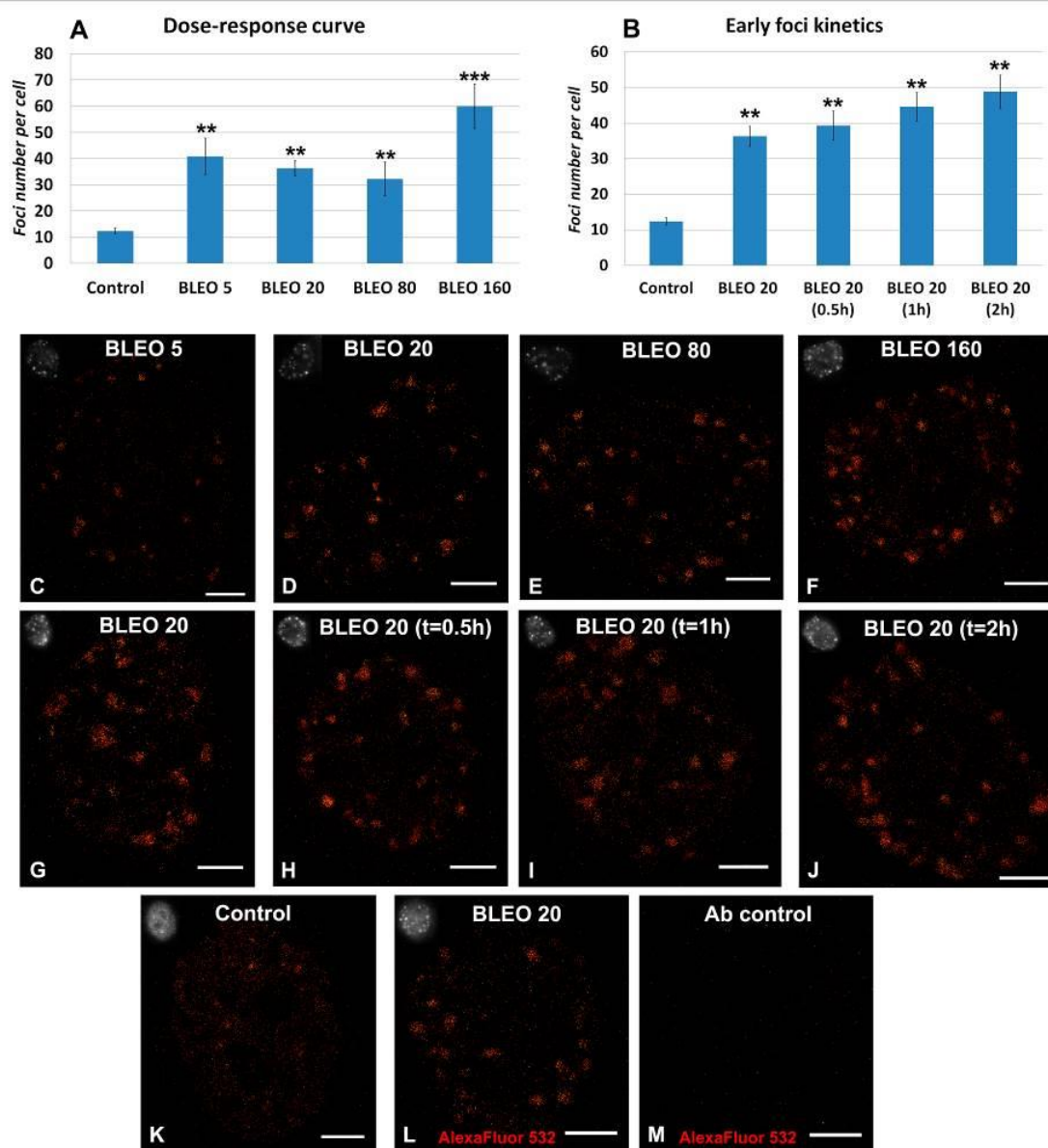


Figura 20.- Señal nuclear de γ H2AX por microscopía de súper-resolución dSTORM bajo diferentes condiciones de exposición a BLEO y tiempos de recuperación post-daño. Las células no se trataron (Control) o fueron expuestas a diferentes dosis de BLEO: 5 μ g/mL (BLEO5), 20 μ g/mL (BLEO20), 80 μ g/mL (BLEO80) y 160 μ g/mL (BLEO160) por 45 min antes de la fijación (PFA 3.7%). Además, en el caso de células expuestas a BLEO20 por 45 min, se realizaron también recuperaciones en medio de cultivo fresco a diferentes tiempos post-daño (0.5 h, 1 h y 2 h) previo a ser fijadas e inmunomarcadas. (A-B) Número promedio de foci por célula (media $\pm$ error estándar) en relación a la dosis de BLEO (sin tiempo de recuperación) (A) o en cultivos tratados con BLEO20 y sometidos a diferentes tiempos de recuperación post-daño (0-2 h) (B). Para cada condición se analizaron 11 < n < 32 núcleos, provenientes de, al menos, dos experimentos independientes (**: p < 0.01, ***: p < 0.001 con respecto al control por ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni). Se obtuvo un nivel apropiado de inducción de foci de γ H2AX en todo el rango de dosis (5-160 μ g/mL) (A). Se detectó un aumento en el número de foci sólo para BLEO160 en comparación con las otras dosis de BLEO (p < 0.05). Se observó un resultado similar entre los cultivos expuestos a BLEO20 pero recuperados a distintos tiempos post-daño (0-2 h) (B). (C-M) Se muestran imágenes dSTORM representativas de núcleos HeLa para cada condición. Barra: 3 μ m. La inmunomarcación se realizó ya sea con anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647 (C-K) o Alexa Fluor 532 (L-M). Recuadro en esquina superior izquierda: imágenes correspondientes de γ H2AX para cada núcleo por microscopía de epifluorescencia estándar.

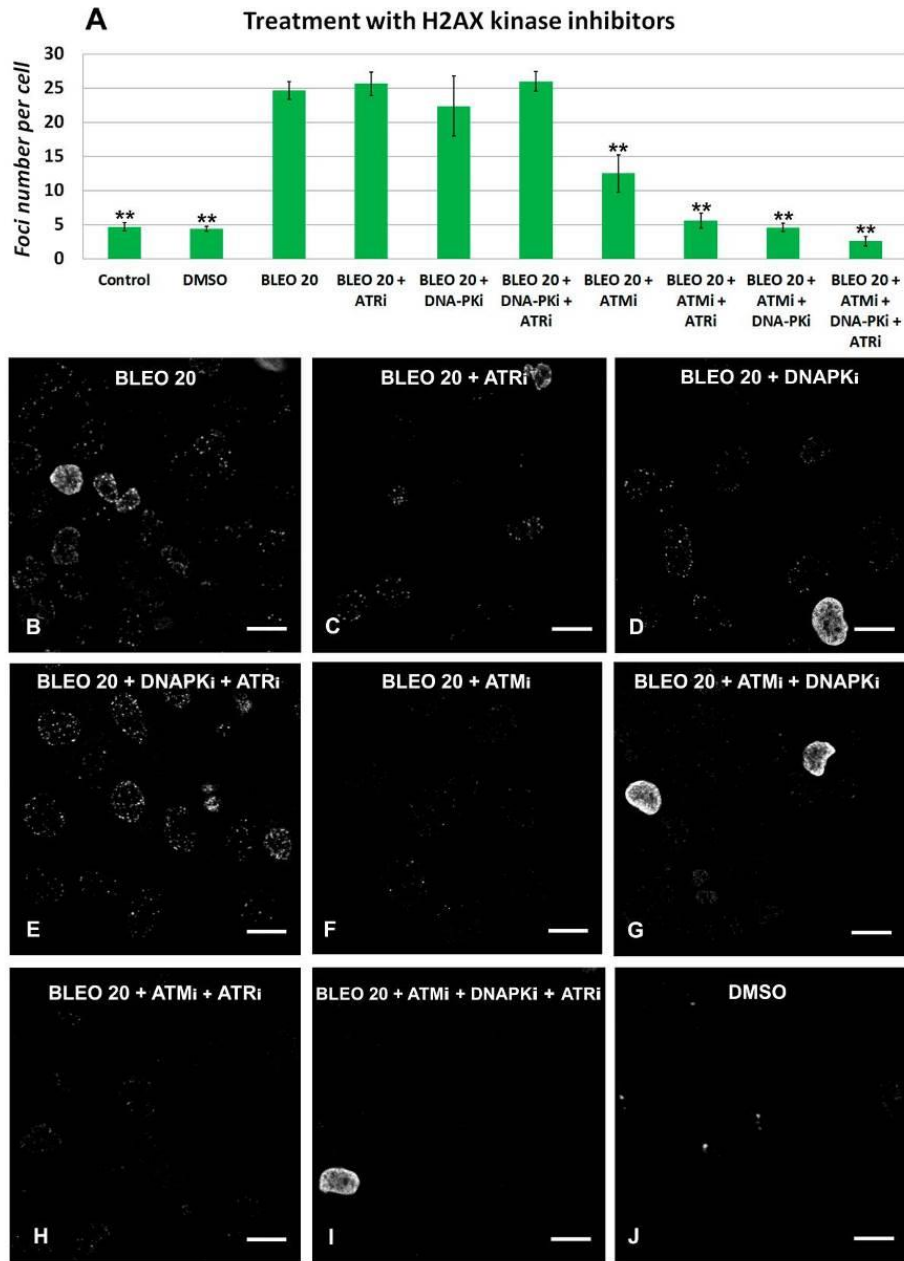


Figura 21.- La supresión de la formación de foci de γ H2AX se maximizó bajo el tratamiento simultáneo con los inhibidores de ATM, ATR y DNA-PK. Las células HeLa fueron pre-tratadas por 1 h con 20 μ M de los inhibidores de ATM, ATR y/o DNA-PK (indicados como ATMi, ATRi y DNA-PKi, respectivamente), ya sea solos o en combinaciones, y luego co-expuestas por 45 min a BLEO20 y el/los inhibidor(es) antes de ser fijados en 3.7% PFA e inmunomarcados para γ H2AX (Alexa Fluor 532 o Alexa Fluor 647). Asimismo, se examinaron cultivos celulares no tratados (controles), expuestos sólo a BLEO20 o al solvente de los inhibidores (control del vehículo; 1.2% DMSO). (A) Numero de foci por célula (media $\pm$ error estándar) para cada condición. Se analizaron 10-20 z-stacks con varios núcleos por campo, provenientes de tres experimentos independientes. Se examinaron en cada caso de 250-650 células. Se detectó una disminución del número de foci sólo en los cultivos tratados con BLEO, expuestos ya sea sólo a ATMi o en combinación con los otros inhibidores, cuando se los comparó con los cultivos tratados sólo con BLEO20 o con BLEO20 junto a ATRi y/o DNA-PKi (**: $p < 0.01$ respecto a BLEO20 mediante ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni). (B-J) Planos representativos de cultivos expuestos a cada condición. La inmunomarcación de γ H2AX se muestra en gris. Barra: 15 μ m.

5.B.2 La señal de γ H2AX pan-nuclear no se suprimió por el tratamiento combinado con los inhibidores de las quinasas ATM, ATR y DNA-PK

Es de mencionar que, ocasionalmente, se observaron células pan-nucleares para γ H2AX en todos los cultivos tratados con BLEO, aún bajo el tratamiento simultáneo con los tres inhibidores de quinasas (Figura 21B-J). Como se mencionó en la introducción se ha demostrado que esta fosforilación generalizada de γ H2AX, implicando toda la cromatina, puede estar involucrada en procesos de apoptosis (Solier et al. 2009), incluso inducida por exposición a BLEO (Liddle et al. 2014). Se ha descrito que esta fosforilación pan-nuclear de H2AX a γ H2AX es regulada por un conjunto de quinasas diferentes a ATM, ATR y DNA-PK, incluyendo Mst-1 en la vía JNK1/caspasa-3 (Cook et al. 2009) y p38 en una vía pro-apoptótica MAPK diferente (Dong et al. 2014). En este sentido, es esperable que esta fosforilación pan-nuclear de H2AX no fuera afectada por los inhibidores específicos que se utilizaron para suprimir la actividad de ATM, ATR y DNA-PK.

5.B.3 Tanto los foci de γ H2AX endógenos como los inducidos por BLEO estaban organizados en subestructuras nanométricas

A continuación, investigamos la estructura de los foci de γ H2AX a escala nanométrica por dSTORM. En los cultivos expuestos a BLEO20 observamos agrupamientos de señal de γ H2AX (o sea, nanofoci) como subestructuras de los foci de γ H2AX observados por microscopía de fluorescencia estándar (Figura 22B, F, J). Los foci de γ H2AX endógenos en las células control presentaron una organización nanométrica similar (Figura 22A, E, I). Por otra parte, no se detectaron modificaciones sustanciales en la sub-organización de los foci de γ H2AX ya sea con diferentes dosis (Figura 20C-F) o tiempos de recuperación post-daño (Figura 20G-J). Para chequear la fiabilidad de los resultados de dSTORM, usamos un anticuerpo secundario diferente para detectar γ H2AX, el cual llevó a un resultado similar (Figura 20L). Como se muestra en la Figura 21C, los foci inducidos por BLEO desaparecieron completamente de las imágenes reconstruidas de dSTORM cuando las células fueron simultáneamente tratadas con los 3 inhibidores (núcleos BLEO20 + 3i).

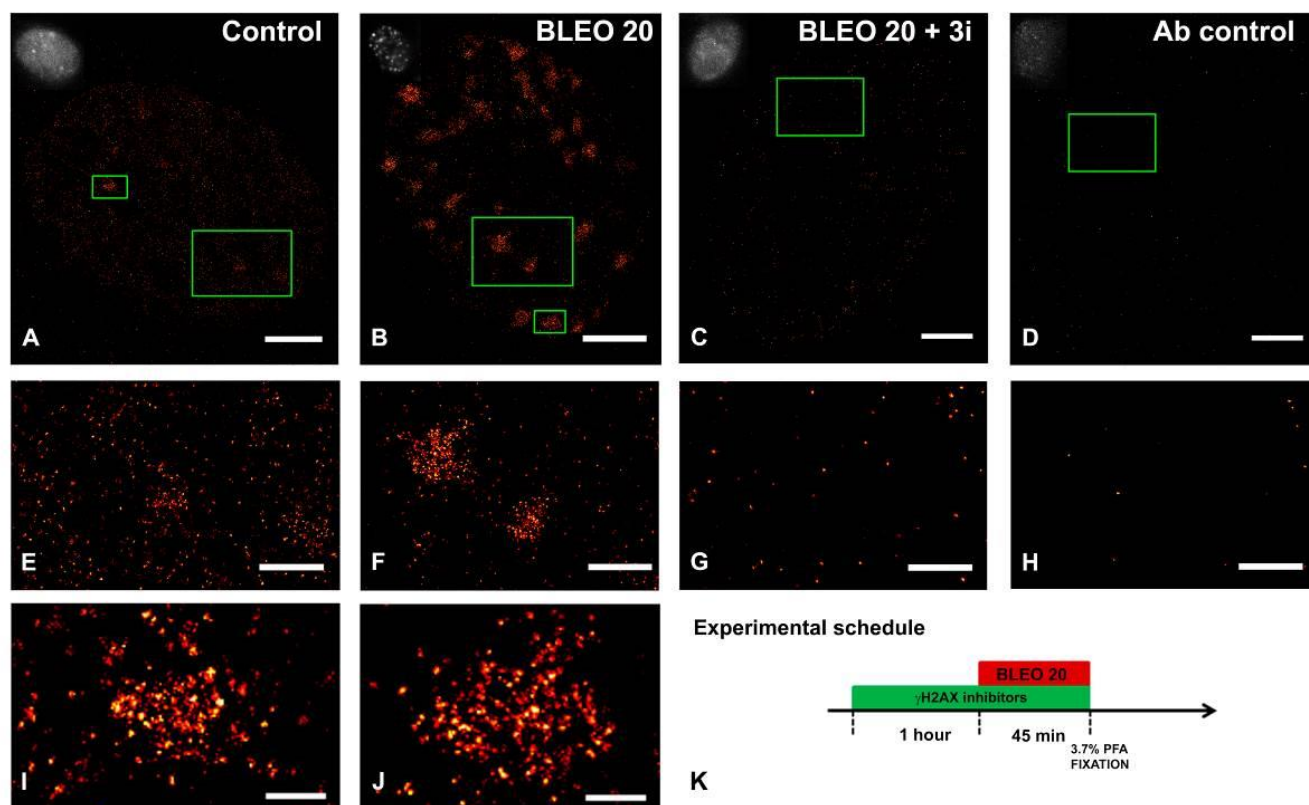


Figura 22.- Los foci de γ H2AX en células control o inducidos por el tratamiento con BLEO se componen de subestructuras nanométricas más pequeñas (nanofoci) como se evidencia por microscopía de súper-resolución dSTORM. Células HeLa no tratadas (A) o expuestas a 20 μ g/mL de BLEO (BLEO20) por 45 min únicamente (B,D) o con (C) un pre- (1 h) y co-tratamiento con los inhibidores de quinasas combinados, es decir KU-55933 (ATMi), VE-821 (ATRi) y NU7026 (DNA-PKi) (20 μ M cada uno). Posteriormente, las células fueron fijadas en 3.7 % PFA e inmunomarcadas indirectamente con un anticuerpo primario de ratón anti- γ H2AX (abcam, ab26350) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 647 (A-C) o expuestos sólo al anticuerpo secundario (D). (A-D) Imágenes de todo el núcleo reconstruidas en rapidSTORM 3.3. Barra: 3 μ m. Recuadro en esquina superior izquierda: imágenes correspondientes de γ H2AX para cada núcleo por microscopía de epifluorescencia estándar. (E-H) Vistas ampliadas (recuadros grandes en verde) de (A-D). Barra: 1 μ m. (I-J) Vistas ampliadas (recuadros pequeños en verde) de (A-B). Barra: 300 nm. Los foci de γ H2AX, tanto de núcleos control como tratados con BLEO, se organizaron en subestructuras nanoscópicas (A-B; I-J). Los foci inducidos por BLEO desaparecieron cuando las células fueron expuestas a los inhibidores de las quinasas de H2AX (comparar B con C). Por otra parte, las células incubadas con el anticuerpo primario anti- γ H2AX presentaron una señal puntillada de γ H2AX esparcida a lo largo del núcleo (comparar las señales en E-G con la señal en H). Como era esperable, no se observó señal cuando la inmunomarcación se realizó en ausencia de anticuerpos primarios (D, H). (K) Esquema experimental. Las células HeLa fueron pre-tratadas por 1 h con 20 μ M de los inhibidores de ATM, ATR y DNA-PK and luego co-expuestas por 45 min a BLEO20 y los inhibidores antes de ser fijadas en 3.7% PFA.

5.B.4 Segmentación nuclear de acuerdo al status de γ H2AX: el área promedio de los foci inducidos por BLEO duplicó el área promedio de los foci en controles

Además de la señal nanométrica dentro de los foci de γ H2AX, en todos los casos se detectó una marca de γ H2AX puntillada dispersa a través del núcleo, siempre y cuando las células hubieran sido incubadas con el anticuerpo primario anti- γ H2AX (comparar las señales en las Figuras 22E-G versus 22H).

A fin de analizar separadamente las señales de γ H2AX agrupadas dentro de los foci de γ H2AX y la señal dispersa de las áreas nucleares remanentes, generamos primeramente dos imágenes de cada archivo de localización original de núcleos de control y BLEO20 combinando la segmentación de SR-Tesseler y un *script* en Python personalizado basado en la envoltura convexa de las regiones de foci (ver diagrama de flujo en la Figura 23 y Materiales y Métodos). Aunque pudimos segmentar con éxito las áreas foci de γ H2AX del resto del núcleo en el SR-Tesseler (Figura 23C), en las imágenes desprovistas de foci persistió un halo de localizaciones circundando cada focus extraído (Figura 23D). Para abordar este tema, extendimos el conjunto de localizaciones a ser extraída desde estas imágenes (50 nm de distancia adicional desde la frontera de cada envoltura convexa) para incorporarlas a sus respectivos foci. El resultado fueron conjuntos de imágenes de núcleos control y BLEO20 teniendo exclusivamente regiones de foci de γ H2AX (Figura 23E) o las áreas complementarias de no-foci (Figura 23F).

Como resultado del procesamiento descrito, se obtuvieron áreas promedio de foci de $0.41 \mu\text{m}^2$ (BLEO20) y $0.19 \mu\text{m}^2$ (controles). Como se observa en el histograma de distribución de áreas (Figura 24), los foci inducidos por BLEO presentaron una mayor heterogeneidad de tamaño que los foci endógenos, los cuales poseían preponderantemente áreas $\leq 0.3 \mu\text{m}^2$ (~88% del total). En el caso de los núcleos expuestos al radiomimético una subpoblación (7.5%) de los foci presentó áreas $> 1 \mu\text{m}^2$. Estos podrían corresponderse mayormente a dos (o más) foci parcialmente solapados que no pudieron ser completamente separados durante la segmentación. De hecho, como se mencionó en la introducción, BLEO es capaz de inducir DSB agrupadas (*clustered DSB*; Regulus et al. 2007) y por ende foci de γ H2AX en estrecha cercanía.

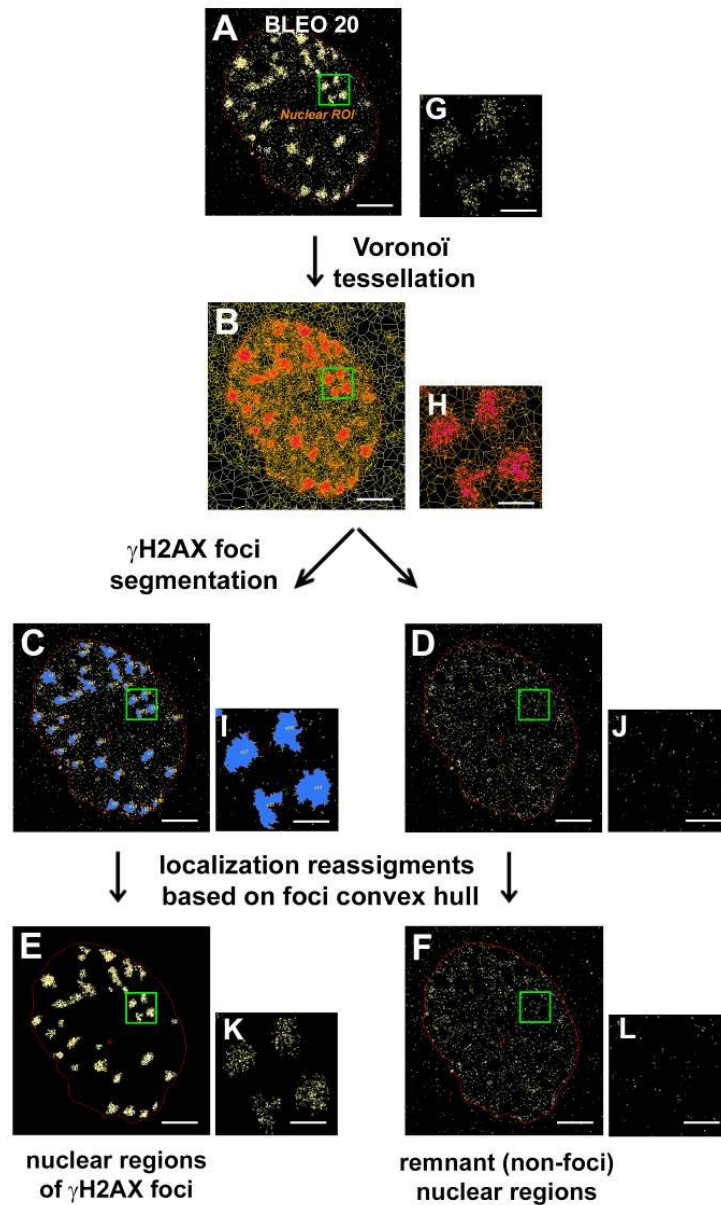


Figura 23.- Segmentación de imágenes de núcleos control y de BLEO20 en (i) regiones que poseen foci de γ H2AX y (ii) las regiones remanentes (de no-foci). Se utilizó el programa SR-Tesseler para definir las regiones de foci y se implementó un *script* personalizado en Python para filtrar localizaciones en base a las envolturas convexas de las regiones de foci (ver Materiales y Métodos). (A-F) Se ejemplifica en un núcleo de BLEO20 los pasos realizados para obtener dos imágenes por separado a partir de cada imagen original. (A) imagen a partir del archivo de localizaciones, (B) teselación de Voronoï, y (C) segmentación subsecuente de las regiones de foci de γ H2AX (azul) del núcleo completo en SR-Tesseler ajustando $\alpha=1$ y área mínima $=0.025 \mu\text{m}^2$. (D) Imagen resultante con las localizaciones pertenecientes a los foci de γ H2AX (C) sustraídas de la imagen (A). Un halo de puntos (localizaciones) alrededor de cada focus de γ H2AX sustraído permaneció en la imagen. Para corregir esto, se calculó una envoltura convexa para cada focus, con una distancia frontera adicional de 50 nm para filtrar un conjunto ampliado de localizaciones. Mediante este procedimiento, las localizaciones pertenecientes a los halos fueron removidas de (D) y reasignadas a (E). El resultado final fue un conjunto de imágenes sólo con las regiones de foci de γ H2AX (E) o las regiones nucleares remanentes de no-foci (F). La ROI nuclear (r1) se encuentra delimitada por la línea roja. Barra: 3 μm . (G-L) Vistas ampliadas ($\times 4$) (recuadros en verde) de las imágenes A-F, respectivamente. Barra: 750 nm.

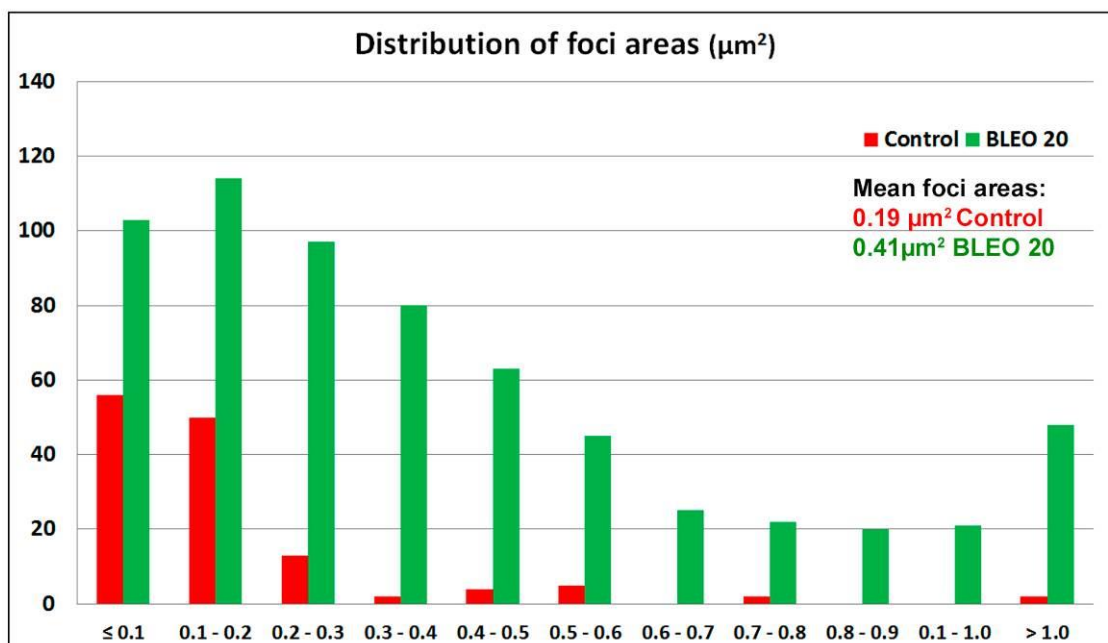


Figura 24.- Distribución de tamaños de foci de γ H2AX para células control y BLEO20 luego de su segmentación por SR-Tesseler y un *script* para incorporar localizaciones de su inmediata vecindad. Se muestran los histogramas de áreas de objetos segmentados (en μm^2) para cada una de las poblaciones. En conjunto, se consideraron $n=135$ (control) y $n=638$ (BLEO20) foci de γ H2AX provenientes de $n=11$ (control) and $n=21$ (BLEO20) células (datos provenientes de tres experimentos independientes). Sobre el área del gráfico se explicitan las áreas promedio de foci encontradas en cada caso. Como se observa en el histograma, los foci inducidos por exposición a BLEO presentaron una gran diversidad de tamaños en comparación con los foci endógenos de los controles. En conjunto, los foci de BLEO20 duplicaron promedialmente en área a los foci de células control.

5.B.5 Los foci de γ H2AX inducidos por BLEO contenían en promedio casi el doble de nanofoci que los foci endógenos de células control

Se usaron imágenes de núcleos control y BLEO20 que poseían solamente las regiones de foci de γ H2AX segmentadas (Figura 25A, E) para cuantificar los nanofoci de γ H2AX dentro de cada focus de γ H2AX. Para ello, se implementó la segmentación por SR-Tesseler en este conjunto de imágenes (Figura 25B, F) para identificar estos clusters nuclear más pequeños en el contexto de un mucho mayor focus microscópico de γ H2AX. En este caso, ya que las localizaciones exhibían un patrón nuclear punteado (granulado) de clusters densos y de pequeño tamaño, fue necesario aplicar un alto umbral de *factor de densidad* ($\alpha=20$) para conseguir una segmentación satisfactoria de los nanofoci. Las imágenes con aumento (Figura 25C-D, G-H) evidenciaron que cada focus estaba formado por nanofoci individuales en un número variable.

Ya sea para los núcleos control (Figura 25J) o BLEO20 (Figura 25K) individuales el número de nanofoci por focus fue independiente del número de foci por célula. Los foci de γ H2AX (de mayor tamaño) en núcleos BLEO20 exhibieron una densidad similar de nanofoci por

focus que los foci endógenos en controles, y en consecuencia, más nanofoci por focus (media: 22.7 en células tratadas *versus* 13.2 en controles; Figura 25L-M).

5.B.6 El nucleoplasma de células control y tratadas con BLEO presentaron nanofoci dispersos fuera de los foci de γ H2AX, los cuales fueron parcialmente sensibles a los inhibidores de quinasas

Como se mencionó previamente, aparte de los nanofoci confinados a los foci de γ H2AX, advertimos en todas las condiciones una marca de γ H2AX ubicua y puntillada diseminada en todo el núcleo. En este sentido, seleccionamos el conjunto de imágenes que comprendían las regiones de no-foci de núcleos control (Figura 26A) y BLEO20 (Figura 26B), las imágenes correspondientes a BLEO20 + 3i (inherentemente sin foci de γ H2AX) (Figura 26C) y las células *Ab control* (Figura 26D), y calculamos su número de nanofoci y densidad promedio luego de la segmentación por SR-Tesseler.

Descartamos que pudiera existir una contribución significativa *per se* del anticuerpo secundario a la señal de γ H2AX puntillada puesto que la cantidad de marca en las células *Ab control* fue despreciable (Figura 26L). Los núcleos control y BLEO20 presentaron densidades similares de nanofoci de γ H2AX dispersos por sección nuclear (~ 3 nanofoci/ μm^2), sugiriendo que los nanofoci de γ H2AX dispersos presentaban un origen endógeno (no relacionado con la inducción de daño en el ADN por el tratamiento con BLEO). A favor de la especificidad de la señal, cabe mencionar que las células BLEO20 + 3i presentaron una disminución del 50% en la densidad de señal en comparación con las células expuestas sólo a BLEO20. El diámetro promedio estimado de los nanofoci (~ 50 nm) permaneció invariable entre los nanofoci agrupados y desagrupados en todas las condiciones (Figura 26M).

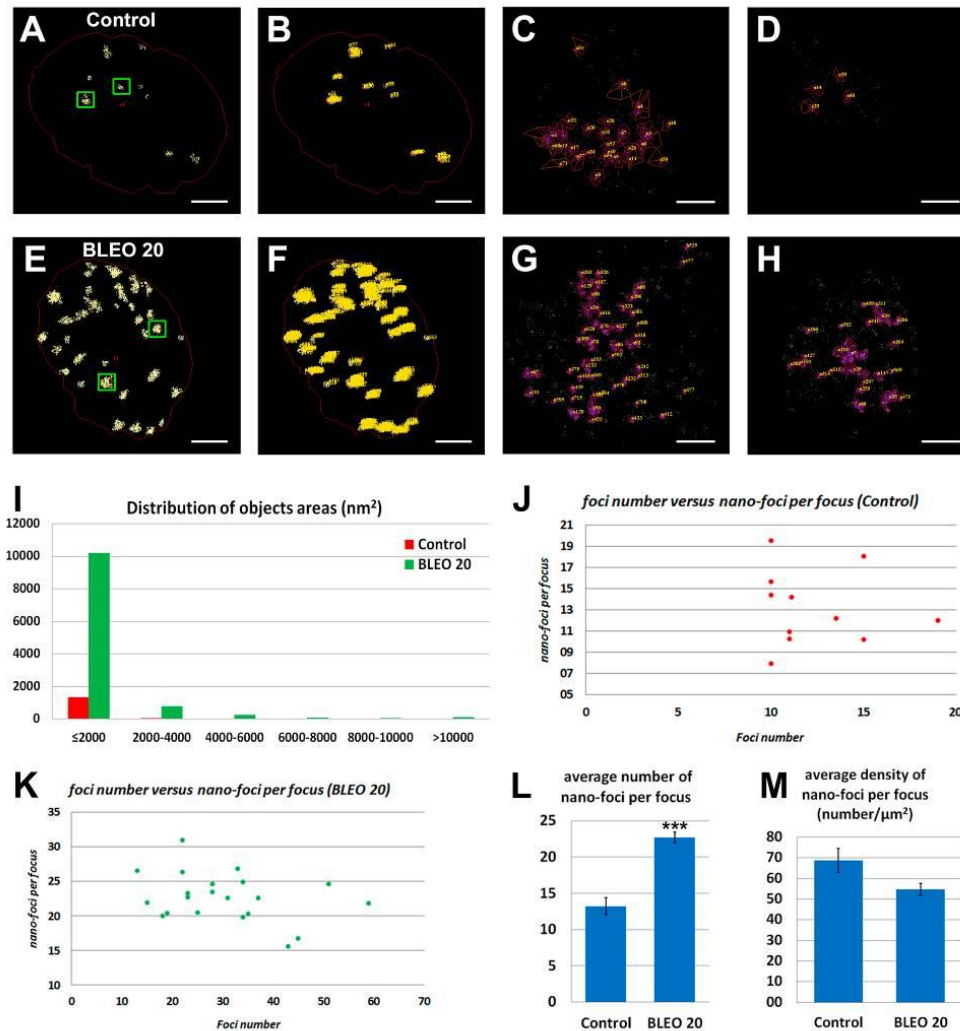


Figura 25.- Cuantificación de los nanofoci confinados a las regiones de foci de γ H2AX por SR-Tesseler. Se muestran imágenes de núcleos (A-D) control y (E-H) BLEO20. (A,E) Imágenes de núcleos albergando únicamente las regiones de foci de γ H2AX segmentadas. Las ROI nucleares (r1) se encuentran delimitadas por la línea roja. (B,F) Segmentación en SR-Tesseler de los nanofoci de γ H2AX de (A,E) mediante el ajuste de $\alpha=20$, distancia de corte=20 y área mínima=50 nm². (A-B; E-F) Barra: 3 μ m. (C-D; G-H) Vistas ampliadas (x16) de los recuadros en verde indicados en (A) y (E), respectivamente. Barra: 200 nm. Las imágenes con aumento muestran que cada focus de γ H2AX está formado por nanofoci individuales en número variable. (I-M) En conjunto, se analizaron n=1392 (control) y n=11471 (BLEO20) objetos segmentados provenientes de n=11 (control) and n=21 (BLEO20) células (datos provenientes de tres experimentos independientes). (I) Histogramas que muestran la distribución de áreas de objetos (nm²) para núcleos control y BLEO20. Como se discutió anteriormente (ver materiales y métodos) se consideró a los objetos segmentados con áreas entre 50-2000 nm² como nanofoci individuales, entre 2000-4000 nm² como dos nanofoci (al menos parcialmente) fusionados y así sucesivamente. Como se observa en los histogramas, la mayoría de los objetos resultaron ser nanofoci individuales en ambos casos (95% y 89% para núcleos BLEO20 y control, respectivamente). (J-K) Gráficos de número de foci versus número de nanofoci por focus para cada núcleo control (J) y BLEO20 (K) analizado. Como se observa en los gráficos, tanto para núcleos control como BLEO20 no se observó una correlación aparente entre estas variables (valores de los coeficientes de correlación lineal de $r=0.0052$ y $r=0.0042$, respectivamente). (L) Número y (M) densidad (número/ μ m²) de nanofoci por focus de γ H2AX (media $\pm$ error estándar) para núcleos control y BLEO20. Aunque se detectó un número más alto en promedio de nanofoci per focus en BLEO20 comparado con los controles (22.7 versus 13.2; ***: $p<0.001$; test de t para dos muestras no pareado), se hallaron densidades promedio comparables debido que los foci en controles presentaban, promedialmente, áreas más pequeñas.

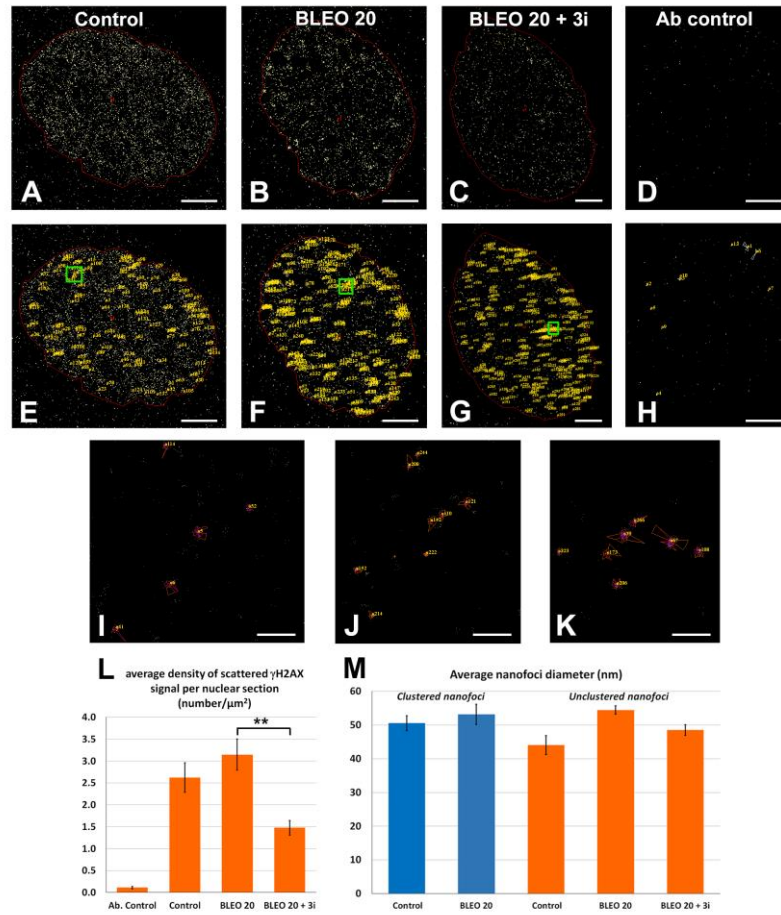


Figura 26.- Cuantificación de los nanofoci dispersos en las regiones nucleares desprovistas de foci de γ H2AX por SR-Tesseler. Se muestran imágenes de núcleos (A,E,I) Control, (B,F,J) BLEO20, (C,G,K) BLEO20 + 3i y (D,H) *Ab control*. (A-B) Imágenes con las regiones remanentes (de no-foci) de núcleos control y BLEO20 (ver Figura 21). (C-D) Imágenes a partir de los archivos de localización de núcleos BLEO20 + 3i y *Ab control* en SR-Tesseler. (E-H) Segmentación de la señal de γ H2AX dispersa de (A-D) en SR-Tesseler ajustando a $\alpha=5$, distancia de corte=20 y área mínima=50 nm². (A-H) Barra: 3 μm . Las ROI nucleares (r1) se encuentran delimitadas por la línea roja. (I-K) Vistas ampliadas (x16) de los recuadros en verde indicados en (E-G), respectivamente. Barra: 200 nm. (L) Densidad (número/ μm^2) de señal de γ H2AX dispersa por sección nuclear (media $\pm$ error estándar) para células control, BLEO20 y BLEO20 + 3i (n=11). En total, n=3405 (control), n=8060 (BLEO20) y n=2998 (BLEO20 + 3i) objetos segmentados fueron analizados. Como en *Ab control* (n=8) las ROI nucleares no pueden ser definidas con precisión se consideró, en estas imágenes, la densidad promedio para la imagen total (datos provenientes de tres experimentos independientes). Se determinó una densidad similar de la señal γ H2AX dispersa por sección nuclear entre núcleos control y BLEO20. Por el contrario, las células BLEO20 + 3i presentaron una menor densidad promedio en comparación con las células expuestas a BLEO20 (**; p<0.01; ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni). La densidad de la señal en *Ab control* fue insignificante en comparación a la señal en las muestras incubadas sólo con el anticuerpo primario anti- γ H2AX. M) Diámetros estimados (nm) de nanofoci agrupados (columnas en azul) y dispersos (columnas en naranja) (media $\pm$ error estándar) para núcleos control, BLEO20 y BLEO20 + 3i. Primeramente, las áreas de nanofoci fueron calculadas como las áreas de foci de γ H2AX, o sea, ajustando el parámetro d y aplicando luego el algoritmo *shoelace*. Luego, se calcularon los diámetros considerando una forma tipo circular de los nanofoci. Los valores medios estimados estuvieron en el rango ~44 nm (control, desagrupados) y ~54 nm (BLEO20, desagrupados). Sin embargo, las diferencias en los diámetros de los nanofoci no fueron significativas entre condiciones (p $\geq$ 0.16) ni cuando los nanofoci agrupados fueron comparados con los nanofoci desagrupados dentro de un determinado tratamiento (p $\geq$ 0.14).

5.B.7 Presencia de (presuntos) nanofoci dispersos fuera de las ROI nucleares

Es de mencionar que en todas las condiciones se observó la presencia de señal de γ H2AX puntillada fuera de las regiones nucleares, presumiblemente en áreas citoplásmicas (Figura 27). Al día de hoy, la aparición de γ H2AX en el citoplasma ha sido reportada únicamente en relación a la muerte celular dependiente del receptor quinasa A tropomiosina (TrkA)/JNK1 en células U2OS, la cual es independiente de la inducción de daño en el ADN (Jung et al. 2008). Como en nuestras imágenes las fronteras externas del citoplasma no pueden ser definidas con precisión, no fue técnicamente posible calcular y comparar las densidades de señal entre diferentes condiciones experimentales. Investigaciones adicionales (no enmarcadas en este Doctorado) serían necesarias para poder determinar si la señal citoplásmica detectada se corresponde, o no, con la presencia de γ H2AX citoplásmica.

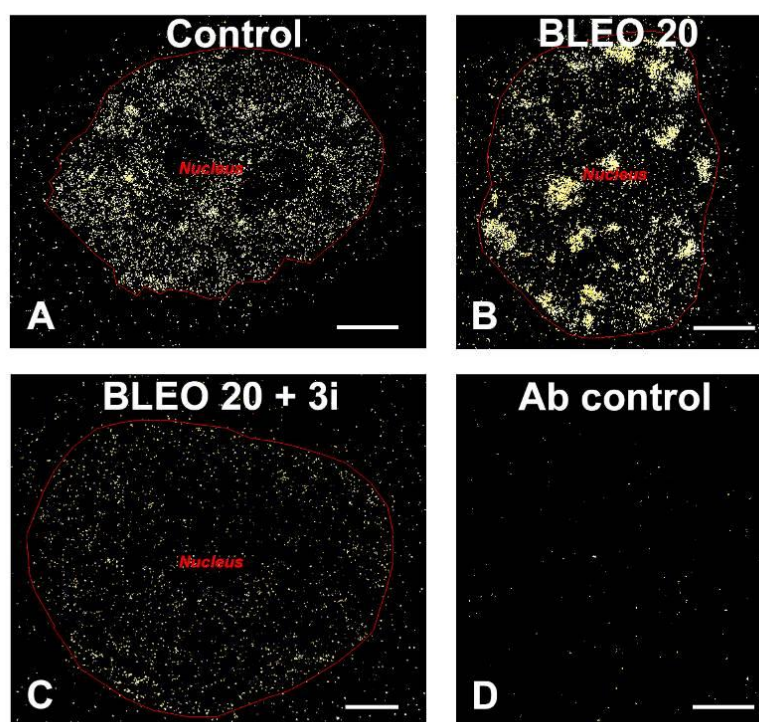


Figura 27.- Presencia de señal de γ H2AX puntillada fuera del núcleo. Se muestran imágenes, a partir de los archivos de localización, de núcleos (A) Control, (B) BLEO20, (C) BLEO20 + 3i y (D) *Ab control* en SR-Tesseler. Las ROI nucleares (r1) se encuentran delimitadas por la línea roja. Barra: 3 μ m. Como se observa en las imágenes, en todas las condiciones la señal de γ H2AX dispersa también se observó en zonas externas a las ROI nucleares (o sea, probablemente en áreas citoplásmicas). Mediante el trazado de ROI en estas regiones (no se muestran) pudimos verificar que esta señal podía ser correctamente segmentada con los mismos parámetros que la marca nuclear puntillada de γ H2AX. No obstante, las densidades de señal no fueron calculadas exhaustivamente ya que los límites citoplásmicos no pudieron ser definidos con exactitud. De todos modos, para todas las condiciones la densidad extranuclear fue considerablemente más baja que la densidad de γ H2AX puntillada dentro de las ROI nucleares (de 2-5 veces menor dependiendo de la condición, estimación en líneas generales).

6.B Discusión

En el contexto de este trabajo de tesis hemos demostrado que en células HeLa los foci de γ H2AX inducidos por BLEO20 se organizan en clusters de nanofoci. En comparación con los foci endógenos, los más abundantes foci generados por exposición a BLEO son cualitativamente similares (aun utilizando altas dosis de BLEO, hasta 160 $\mu\text{g/mL}$) aunque cuantitativamente diferentes, puesto que duplican (aproximadamente) a los foci endógenos en tamaño y número de nanofoci en su interior.

La presencia de foci de γ H2AX endógenos ha sido atribuida a DSB producidas por el estancamiento y el colapso de horquillas de replicación (Gelot et al. 2015), asociadas a la transcripción, bien en sí misma (implicando sobre todo a la hebra no transcrita, la cual queda particularmente expuesta durante el proceso) o debido a la colisión entre las maquinarias de replicación y transcripción (Vitelli et al. 2017) y surgidas en regiones del núcleo implicadas en la organización 3D del genoma (Bouwman y Crosetto 2018). En diversas líneas celulares (incluyendo HeLa) y cultivos primarios se ha reportado que los foci de γ H2AX endógenos presentan, en promedio, tamaños más pequeños comparado con los foci asociados a daño en el ADN (McManus y Hendzel 2005; Costes et al. 2006, 2010). En nuestro caso obtuvimos valores concordantes, presentando los foci asociados a daño un tamaño significativamente mayor a los foci endógenos de las células control ($0.41 \mu\text{m}^2$ versus $0.19 \mu\text{m}^2$). Este resultado respalda nuestra estrategia original de una segmentación refinada de los foci mediante la combinación de SR-Tesseler con un *script* que implicaba un parámetro de distancia de vecindad para incluir localizaciones de los alrededores de los objetos.

En relación a los foci de γ H2AX inducidos por BLEO, determinamos un nivel similar en el número de foci en el rango de BLEO 5-80 $\mu\text{g/mL}$, incrementándose luego de la exposición a BLEO 160 $\mu\text{g/mL}$. Nuestros resultados previos en células CHO9 habían mostrado un número similar de foci entre BLEO 40 $\mu\text{g/mL}$ y BLEO 160 $\mu\text{g/mL}$ (Liddle et al. 2014). En cualquier caso, es claro que no se produce un incremento lineal en el número de foci al aumentar la dosis del agente radiomimético. Varios factores podrían haber contribuido a este resultado general. A saber: i) son necesarios transportadores de membrana para permitir el acceso de las moléculas de BLEO a las células, lo cual podría haber limitado su ingreso en un rango de dosis. BLEO se une a una proteína receptora en la membrana plasmática que es luego transferida al interior de vesículas endocíticas intracelulares mediante endocitosis mediada por receptor (Pron et al. 1993, 1999); ii) podría haber jugado un rol la enzima bleomicina hidrolasa, la cual puede proveer de resistencia a BLEO (Chen et al. 2012) y iii) se ha descrito una sensibilidad diferencial de las células a este agente dependiendo de la fase del ciclo celular (Olive y Banath 1993), siendo más sensibles las células en G1/G2 que en

fase S. Es de mencionar que además se ha demostrado por ensayo Cometa, al menos en células HeLa, que la BLEO genera un nivel de daño heterogéneo, muy variable de célula a célula en comparación con el inducido por radiaciones ionizantes (Grigaravicius et al. 2009). En suma, no podemos descartar que tal vez fuera necesario un mayor número de células para comparar el número de foci entre diferentes dosis en caso de que este hubiese sido el objetivo primordial de nuestra investigación. En relación al tratamiento con los inhibidores de quinasas, el hecho que los foci hayan sido, ante todo, dependientes de ATM sugiere que se originaron por DSB en el ADN y no de horquillas de replicación estancadas/colapsadas (lo cual habría implicado, fundamentalmente, una fosforilación de H2AX dependiente de ATR). La intervención preferencial de ATM sobre DNA-PK para generar γ H2AX concuerda con lo reportado por Burma et al. (2001) induciendo daño con radiaciones ionizantes.

Nuestros resultados en células HeLa expuestas a BLEO empleando microscopía dSTORM concuerdan con otros trabajos recientes que, aprovechando el incremento en resolución óptica que ofrecen las técnicas de nanoscopia, han permitido dilucidar la organización interna de los foci macroscópicos de γ H2AX (de la microscopía de fluorescencia convencional) en estructuras de menor tamaño (nanofoci). La organización en nanofoci de los foci de γ H2AX ha sido verificada empleando radiaciones ionizantes tanto de alta-LET (Lopez-Perez et al. 2016) como de baja-LET (Sisario et al. 2018; Hausmann et al. 2018; Natale et al. 2018) e incluso contrastando, en un mismo trabajo, los resultados obtenidos mediante ambos tipos de radiaciones (Reindl et al. 2017). Estos autores determinaron por STED, en células HeLa, que si bien el tamaño promedio de los foci de γ H2AX luego de la irradiación con alta-LET era significativamente mayor comparado con los inducidos por irradiación de baja-LET, la nano-organización de varias proteínas de reparación del ADN que forman foci (γ H2AX, 53BP1 y Rad51) era similar, sin importar la naturaleza de la LET aplicada. En nuestro caso, empleamos el radiomimético químico BLEO, el cual es capaz de inducir tanto DSB únicas como DSB agrupadas (*clustered*), causando así un impacto heterogéneo en el ADN, intermedio entre las radiaciones de alta y baja-LET (Regulus et al. 2007). En concordancia con Reindl et al. (2017), si bien observamos una heterogeneidad significativa en los tamaños de foci inducidos por BLEO (ver Figura 24), no observamos ninguna diferencia evidente en la organización nano-estructural (número y/o densidad de nanofoci) dentro de los foci de γ H2AX asociadas a potenciales DSB únicas o agrupadas.

A pesar de los muy disímiles fundamentos y dinámicas de adquisición de imágenes que presentan las metodologías de SIM, STED y SMLM, en todas las técnicas se verificaron resultados concordantes con respecto a la organización de los foci de γ H2AX en entidades nanoscópicas discretas. La fuerte consistencia en los hallazgos por súper-resolución sugiere que los resultados obtenidos no fueron generados por potenciales artefactos asociados a la reconstrucción de imágenes por dSTORM. Se ha demostrado que los nanofoci asociados a

las regiones de foci microscópicos no se agrupan en forma estocástica (Lopez-Perez et al. 2016). En este sentido, se ha postulado que los nanofoci individuales podrían indicar nucleosomas particulares conteniendo γ H2AX, mientras que sub-agrupamientos de los mismos representarían la estructura cromatínica local base para las unidades elementales de reparación de DSB en los sitios de ruptura (Lopez-Perez et al. 2016; Natale et al. 2017). Como mencionan Lopez-Perez et al. (2016) la organización de la cromatina en pequeños bucles (*loops*) separados por espacio intercromatínico (en el contexto de organización en territorios cromosómicos, ver Cremer et al. 2015) puede explicar satisfactoriamente la existencia de los *gaps* que se observan entre sub-agrupamientos de nanofoci de γ H2AX. De hecho, se ha demostrado que estos sub-agrupamientos están, mayormente, flanqueados por el factor CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Natale et al. 2017), el cual actúa principalmente como regulador de la arquitectura cromatínica mediante la formación y el mantenimiento de bucles de cromatina (Phillips y Corces 2009). Es de mencionar que no hay una convergencia total en la caracterización a nivel cuantitativo de los nanofoci intra-foci. Sin duda, las diferencias en las técnicas de nanoscopía y métodos de análisis de *clusters* empleados en cada estudio pueden dar cuenta de las divergencias en lo cuantitativo halladas en este incipiente campo de investigación. En nuestro caso determinamos, en promedio, 13.2 y 22.7 nanofoci por focus para núcleos control y BLEO 20, respectivamente. Estos resultados son comparables con lo reportado por dSTORM en células irradiadas con rayos X (Sisario et al. 2018), donde los autores determinaron en células DK-MG ~16 y ~20 nanofoci por focus para células control e irradiadas, respectivamente. Asimismo, aunque no calculado directamente, puede inferirse a partir de los datos reportados por Lopez-Perez et al. (2016), una densidad intra-foci (inducidos por irradiación con iones pesados) de 75 nanofoci/ μm^2 en su estudio, siendo en nuestro caso del mismo rango (~ 60 nanofoci/ μm^2). En todos estos estudios (incluyendo el nuestro) lo reportado son los valores promedio para una sección transversal nuclear en particular de cada célula analizada.

Como un aporte original a los estudios sobre foci de reparación del ADN por metodologías nanoscópicas nos propusimos evaluar por dSTORM la presencia/ausencia de los nanofoci de γ H2AX en células desafiadas con los inhibidores específicos de las quinasas que fosforilan H2AX a γ H2AX. En este sentido, pudimos confirmar la especificidad de la marcación de γ H2AX reconstruida a partir de los datos de SMLM pues los nanofoci de γ H2AX organizados como clusters en las regiones de foci desaparecieron completamente de las imágenes de dSTORM cuando las células expuestas a BLEO fueron tratadas simultáneamente con inhibidores específicos de ATM, ATR y DNA-PK.

Además de los nanofoci confinados a los foci de γ H2AX detectamos también nanofoci de γ H2AX dispersos (señal de γ H2AX puntillada) en el espacio nucleoplásmico remanente, tanto en células control como de BLEO20. Una señal de γ H2AX nuclear de este tipo, puntillada y ubicua, ha sido poco reportada (ver más adelante). Por este motivo, nos propusimos caracterizar con mayor detalle esta señal en nuestro sistema experimental, generando un *script* personalizado en Phyton para poder analizar en SR-Tesseler esta marcación por separado respecto a la señal generada por los nanofoci confinados a regiones de foci de γ H2AX (ver Figura 23). Como resultado del análisis, concluimos que los nanofoci de γ H2AX dispersos estaban presentes en igual medida y en baja densidad (~ 3 nanofoci/ μm^2) en núcleos control y de BLEO20. Este hallazgo sugiere la existencia de un nivel endógeno de fosforilación de H2AX, de baja (o nula) expansión sobre el ADN, independiente de la inducción de daño en la molécula. Lopez-Perez et al. (2016) reportaron también la presencia una señal de γ H2AX de este tipo (dispersa y ubicua) en células U87 MG tanto en controles como luego de la irradiación con iones de carbono, donde la inducción de DSB (y por tanto de foci de γ H2AX) se restringe a las trayectorias individuales (*tracks*) de estas partículas dentro del núcleo. En este estudio, los niveles de nanofoci endógenos e inducidos no fueron similares, sino que se verificó un incremento en su número luego de la irradiación con iones. Los autores hipotetizan que, aunque cuestionable, el incremento desde el nivel de nanofoci endógenos dispersos al nivel de nanofoci dispersos *off-track* inducidos por los iones de carbono podría ser atribuido a DSB aisladas inducidas por una radiación indirecta derivada (por expansión) de los *tracks* de iones. En todo caso, un efecto expansivo semejante en el núcleo no es esperable por la exposición a BLEO. Natale et al. (2017) reportaron también nanofoci de γ H2AX dispersos por todo el núcleo, tanto en células HeLa control o tras la exposición a rayos X (designados por los autores como *unclustered* frente a los organizados en clusters). No obstante, en este estudio no se realiza un análisis específico de los mismos (sólo se analiza el segundo grupo) ni se discute su relación con los foci microscópicos de γ H2AX.

Este nivel basal de marcación de γ H2AX podría responder a DSB endógenas transitorias, generadas durante el metabolismo del ADN (ver segundo párrafo de la discusión), pero que no llegan a disparar una respuesta de reparación del ADN activa (es decir, inducir foci de γ H2AX microscópicos). Así, los nanofoci de γ H2AX aislados podrían representar la base (*priming* γ H2AX) para potenciales unidades de reparación de DSB, previo a un potencial compromiso de estas unidades con alguna de las vías de reparación del ADN. Interesantemente, Szilard et al. (2010) revelaron en levaduras por la técnica ChIP-chip un enriquecimiento de γ H2AX endógena en *loci* susceptibles al estancamiento de horquillas de replicación y posterior ruptura, de los cuales la mitad mapeaban en genes reprimidos que

codificaban proteínas. Asimismo, los sitios de localización de H2AX y γ H2AX endógena e inducida por radiaciones ionizantes han sido mapeados a escala genómica en células humanas tanto proliferantes como en reposo (Seo et al. 2012). En las células proliferantes se observó un enriquecimiento de γ H2AX endógena en regiones sub-teloméricas y en los sitios activos de comienzo de la transcripción. También se verificó que ya, previo a su fosforilación, H2AX mapeaba específicamente en estos *hotspots* endógenos. Luego de la irradiación, los sitios de enriquecimiento de γ H2AX coincidían con las regiones de transcripción activa aunque se extendían a toda la extensión del gen (no se concentraban en los sitios de inicio de la transcripción). La demanda celular para reparación del ADN se correlaciona con la capacidad de las células para proliferar. Así, en células terminales diferenciadas este proceso está globalmente atenuado (Nospikel y Hanawalt 2002). En contraposición, en células tumorales, con rápidos ciclos de división celular, hay una alta demanda por una respuesta al daño, lo cual refleja posiblemente estrés asociado a la replicación y transcripción durante los rápidos ciclos de división celular. En este sentido, los nanofoci de γ H2AX dispersos que detectamos en una línea celular de origen tumoral como HeLa podrían representar un alto nivel basal de γ H2AX endógeno, distribuido por todo el genoma, necesario para proveer suficiente protección frente a la inducción de un número potencialmente elevado de DSB endógenas. Finalmente, los nanofoci dispersos podrían no estar representando DSB sino otro tipo de lesión en el ADN, como SSB y lesiones menores o bien funciones biológicas no asociadas a la DDR como las reseñadas por Turinetti y Giachino (2015).

En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que la presencia de los nanofoci de γ H2AX dispersos es evaluada tras intentar inhibir deliberadamente la formación de γ H2AX. En presencia de los inhibidores específicos de las quinasas ATM, ATR y DNA-PK, la marcación dispersa de γ H2AX no se eliminó completamente, aunque disminuyó en su densidad nuclear (~50 %). Esto podría responder a múltiples factores no excluyentes. En primer lugar, aunque las concentraciones (20 μ M) de KU-55933, VE-821 y NU7026 que utilizamos para inhibir a ATM, ATR y DNA-PK estaban muy por encima de sus valores de IC₅₀ (12.9 nM, 13 nM y 230 nM en ensayos en sistemas *cell-free*, respectivamente) y no se detectaron foci en su presencia, no puede descartarse que el pre-tratamiento de 1 h no haya sido suficiente para alcanzar una inhibición completa de las quinasas blanco o que el tiempo de vida media de los nanofoci dispersos pre-existentes fuera mayor que 1 h. Ensayamos pre-tratamientos de mayor duración (24 h) con los tres inhibidores, los cuales resultaron en un nivel considerable de citotoxicidad, evidenciado esto por una muy baja densidad de células por campo y una gran proporción (~ 75%) de las células remanentes pan-nucleares para γ H2AX, algunas de las cuales ya presentaban morfología nuclear típica de la apoptosis. Por otra parte, la acción de otras quinasas capaces de fosforilar H2AX en Ser139 podrían explicar la

señal de γ H2AX remanente. La activación de los miembros de la familia MAPK p38 y Mst-1 (dando lugar a una marcación pan-nuclear de γ H2AX) ha sido reportada únicamente en contextos de apoptosis (Cook et al. 2009; Dong et al. 2014). En contraposición, se ha demostrado que una quinasa de cromatina nucleosomal recientemente descrita, denominada VRK1, es capaz de fosforilar H2AX a γ H2AX en respuesta a daño en el ADN inducido por irradiación γ (Salzano et al. 2015). Significativamente, los autores demostraron que el efecto de VRK1 en la formación de γ H2AX no resultó afectada por KU-55933 (el inhibidor específico de ATM) ni por cafeína (inhibidor general de quinasas PI3K). Asimismo, determinaron que ya en condiciones basales VRK1 interactúa en forma directa y estable con H2AX, lo cual deja abierta la posibilidad de un rol específico de esta quinasa en la fosforilación endógena de la histona. En la misma línea, si los nanofoci dispersos indican DSB transitorias que no despiertan una reparación activa del ADN, o si representan otro tipo de lesión, no es necesariamente esperable un efecto de supresión total por la inhibición específica de las quinasas que fosforilan “canónicamente” a H2AX. Tercero, no puede ser formalmente descartada una marcación no específica del anticuerpo primario anti- γ H2AX a otras estructuras nucleares (aparte de γ H2AX). Esto parece ser, no obstante, poco probable pues los nanofoci dispersos han sido reportados por otros. Por último, aunque γ H2AX puede ser defosforilada *in situ* por PP2A (Chowdhury et al. 2005) y PP4 (Nakada et al. 2008), una fracción significativa de γ H2AX puede ser liberada de la cromatina por el intercambio con H2AX no fosforilada, como lo revelaron Svetlova et al. (2007) en experimentos de FRAP utilizando GFP-H2AX. De esta manera, la defosforilación de γ H2AX puede ocurrir también en el nucleoplasma, lejos del sitio de lesión de DSB correspondiente. En este contexto, la señal de γ H2AX puntillada que perduró, aún después del tratamiento combinado con los inhibidores de quinasas, podría indicar γ H2AX persistente, ya disociada de la cromatina.

7. Conclusiones y Perspectivas

En el contexto de esta Tesis de Doctorado determinamos, mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal, una localización preferencial de las regiones γ H2AX+ sobre áreas cromáticas bajo síntesis del ADN (EdU+) en núcleos MS/LS expuestos a HU de la línea celular CHO9. Así, evidenciamos un cambio en la localización de γ H2AX cuando su formación es inducida por estrés de replicación, y no por un agente radiomimético inductor de DSB como la BLEO (donde γ H2AX mapea mayormente en interfases EdU+/EdU-). Por otra parte, mediante experimentos de co-tratamiento con ambos agentes (HU y BLEO) constatamos que HU bloqueó la acción clastógena de BLEO en los cultivos tratados con ambos agentes. Estos hallazgos podrían ser complementados mediante las siguientes aproximaciones:

- (1) estudiar la localización de γ H2AX, respecto a regiones de heterocromatina replicante EdU+, inducida por el compuesto Emetina. Este compuesto bloquea la replicación del ADN por un mecanismo diferente a HU, pues inhibe específicamente la síntesis de fragmentos de Okazaki en la hebra retrasada (Burhans et al. 1991). Así podremos determinar si ocurre un posicionamiento similar de γ H2AX al observado por exposición a HU cuando los cultivos son expuestos a un agente que induce estrés replicativo por un mecanismo totalmente diferente.
- (2) evaluar directamente la presencia de DSB en cultivos expuestos a HU y/o tratados con BLEO mediante el ensayo de TUNEL. Esta metodología permite visualizar directamente las DSB inducidas mediante microscopía de fluorescencia. A su vez, TUNEL podría combinarse eventualmente con la inmunomarcación de γ H2AX. De esta manera, sería posible corroborar que los foci inducidos por BLEO se corresponden con DSB mientras que los inducidos por HU se corresponden únicamente con horquillas de replicación detenidas.
- (3) complementando el punto anterior, inmunodetectar junto con γ H2AX, otra proteína de la DDR asociada específicamente a DSB. Al menos a nivel general, la colocalización de las marcas de γ H2AX y la proteína 53BP1 ha sido considerada un marcador confiable de la presencia de foci de reparación del daño asociados a DSB (Markova et al. 2007; Martin et al. 2013).

Por otra parte, investigamos en células HeLa la sub-estructura a escala nanoscópica de los foci de γ H2AX, tanto endógenos como inducidos por exposición a diferentes esquemas de tratamiento con BLEO (esto es, dosis y tiempos de recuperación post-daño), mediante microscopía de súper-resolución dSTORM. Evidenciamos que los foci poseían una nano-organización interna compuesta por nanofoci, confirmando lo reportado en otros trabajos recientes y superando así la descripción estructural clásica reportada por microscopía de fluorescencia estándar. Las células HeLa control presentaron tanto nanofoci agrupados,

confinados a unos pocos foci de γ H2AX microscópicos, como nanofoci de γ H2AX dispersos por el espacio nuclear remanente. Tras la exposición a BLEO, los foci de γ H2AX se incrementaron en número y tamaño. Pese a ello su nano-organización resultó comparable a la detectada en los foci de células control. Por otro lado, la densidad nuclear de nanofoci dispersos permaneció invariable, sugiriendo un posible origen endógeno. Para verificar la especificidad de la señal de γ H2AX detectada, también registramos por dSTORM células expuestas a BLEO, pero tratadas simultáneamente con inhibidores específicos de las quinasas canónicas (ATM, ATR y DNA-PK) que generan γ H2AX post-daño. El agregado conjunto de los tres inhibidores específicos de las quinasas canónicas eliminó los nanofoci agrupados inducidos por BLEO aunque sólo parcialmente los nanofoci dispersos endógenos.

Una señal de γ H2AX nuclear de estas características, puntillada y generalizada, ha podido ser visualizada sólo recientemente gracias al desarrollo de diversas técnicas de *imaging* a escala nanométrica. Por ello, ha sido poco caracterizada y su significado biológico permanece incierto. A fin de esclarecer tal hallazgo, futuros estudios podrían abordar las siguientes interrogantes:

(1) estudiar en otras estirpes celulares y empleando otros agentes inductores de daño si el número de nanofoci endógenos se mantiene estable (como observamos con BLEO) o si se incrementa (como se determinó con iones pesados) tras la inducción de daño. En lo que respecta a los tipos celulares, como ya se mencionó, el requerimiento de reparación del ADN está relacionado con el nivel de proliferación (Nouspikel y Hanawalt 2002). Si esta marcación es dependiente de DSB transitorias que no generan una inducción potente de reparación veremos mayor nivel de γ H2AX dispersa en células de origen tumoral frente a células totalmente diferenciadas. Respecto a los agentes inductores de daño, la comparación entre las densidades nucleares de γ H2AX dispersa endógena e inducida podría determinar si ocurre un cierto efecto expansivo clastogénico, de menor magnitud, fuera del *track* recorrido por parte de radiaciones de alta-LET.

(2) establecer si esta marcación presenta relación, tanto en condiciones control como de daño inducido, con las diferentes fases del ciclo celular. Mediante experimentos de dos colores, evaluando simultáneamente las marcaciones de γ H2AX y EdU, podría establecerse el posible rol de la replicación del ADN en la formación de estos nanofoci. Asimismo, podría evaluarse el papel de otros procesos del metabolismo del ADN, como la transcripción, en la generación de los nanofoci dispersos a través de experimentos de dos colores empleando 5-bromouridina trifosfato (BrUTP) (Solovjeva et al. 2007) o 5-etinil uridina (5-EU) (Dimitrova 2011). Aunque engorroso en lo técnico diversos estudios han evidenciado la posibilidad de

realizar satisfactoriamente dSTORM para 2 colores en diversas condiciones experimentales (van de Linde et al. 2013).

(3) Adicionalmente, nuevas estrategias para intentar eliminar los nanofoci dispersos residuales podrían aportar nuevos indicios sobre su origen. No puede descartarse que el pre-tratamiento de 1 h con KU-55933, VE-821 y NU7026 haya sido insuficiente para inhibir completamente las quinasas canónicas blanco (ATM, ATR y DNA-PK), ni que los nanofoci presentaran tiempos de vida media superiores a 1 h. En este sentido, esquemas alternativos de tratamiento con estos inhibidores, de mayor duración pero que eviten, a su vez, la inducción de citotoxicidad significativa, podrían clarificar finalmente si estas quinasas participan en esta fosforilación de H2AX ubicua, pero de extensión limitada.

(4) Finalmente, resta por ser determinado si la señal de γ H2AX remanente puede ser explicada por la acción de alguna otra quinasa capaz de fosforilar H2AX en Ser139. Como se comentó anteriormente, se ha descrito una quinasa VRK1, que en condiciones basales interactúa directamente con H2AX (Salzano et al. 2015) y que, por lo tanto, podría intervenir en la generación de nanofoci endógenos. Por una parte, Salzano et al. (2015) han reportado una supresión significativa de VRK1 mediante las metodologías de interferencia por ARN. Por otro lado, Serafim et al. (2019) han desarrollado recientemente un inhibidor específico para esta proteína basado en un esqueleto de piridina. En este sentido, sería de gran interés evaluar la distribución de γ H2AX por dSTORM tras inhibir específicamente VRK1 por cualquiera de estas vías.

8. Bibliografía

- Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Delrow J, Brewer BJ, Raghuraman MK (2007) Replication in Hydroxyurea: It's a Matter of Time. *Mol Cell Biol* 27:6396-6406
- Aten J, Stap J, Krawczyk P, van Oven C, Hoebe R, Essers J, Kanaar R (2004) Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303:92-95
- Aurenhammer F (1991) Voronoi Diagrams - A Survey of a Fundamental Geometric Data Structure. *ACM Computing Surveys* 23:345-405
- Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, Freireich EJ (1976) Pulse cytophotometric analysis of cell cycle perturbation with bleomycin in vitro. *Cancer Res* 36:1182-1187
- Barlow JH, Faryabi RB, Callén E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun HW, McKinnon P, Wright G, et al. (2013) Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* 152:620-632
- Bartova E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S (2008) Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56:711-721
- Bekker-Jensen S, Mailand N (2010) Assembly and function of DNA double-strand break repair *foci* in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 9:1219-1228
- Berniak K, Rybak P, Bernas T et al. (2013) Relationship between DNA damage response, initiated by camptothecin or oxidative stress, and DNA replication, analyzed by quantitative 3D image analysis. *Cytometry A* 83:913-924
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R et al. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313:1642-1645
- Bianchi V, Pontis E, Reichard P (1986) Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *J Biol Chem* 261:16037-16042
- Bonne-Andrea C, Wong M, Alberts B (1990) In vitro replication through nucleosomes without histone displacement. *Nature* 343:719-726
- Bouwman B, Crosetto N (2018) Endogenous DNA Double-Strand Breaks during DNA Transactions: Emerging Insights and Methods for Genome-Wide Profiling. *Genes (Basel)* 9: E632
- Braden B (1986) The surveyor's area formula. *The College Mathematics Journal* 17:326-337
- Burger RM, Peisach J, Horwitz SB (1981) Activated bleomycin: a transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem* 256:11636-11644
- Burhans WC, Vassilev LT, Wu J, Sogo JM, Nallaseth FS, DePamphilis ML (1991) Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation. *EMBO J* 10:4351-4360
- Burma S, Chen B, Murphy M, Kurimasa A, Chen D (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462-42467

- Caron H, van Schaik B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus M, van Asperen R, Boon K, Voute P, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R (2001) The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science* 291:1289-1292
- Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio M, Fernandez-Capetillo O, Pilch D, Sedelnikova O, Eckhaus M, Ried T, Bonner W, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675-679
- Chabes AL, Bjorklund S, Thelander L (2004) S Phase-Specific Transcription of the Mouse Ribonucleotide Reductase R2 Gene Requires Both a Proximal Repressive E2f-Binding Site and an Upstream Promoter Activating Region. *J Biol Chem* 279:10796-10807
- Chang DJ, Cimprich KA (2009) DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol* 5:82-90
- Chatterjee N, Walker G (2017) Mechanisms of DNA Damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58:235-263
- Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A (2000) Response to RAG-Mediated V(D)J Cleavage by NBS1 and γ -H2AX. *Science* 290:1962-1965
- Chen J, Chen Y, He Q (2012) Action of bleomycin is affected by bleomycin hydrolase but not by caveolin-1. *Int J Oncol* 41:2245-2252
- Chen J, Ghorai M, Kenney G, Stubbe J (2008) Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 36:3781-3790
- Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: Toward better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-112
- Cheung P, Lau P (2005) Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 19:563-573
- Chiolo I, Minoda A, Colmenares S et al. (2011) Double-Strand Breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 145:732-744
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20:801-809
- Ciccio A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40:179-204
- Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG (2009) Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 458:591-596
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ (2001) ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294:1713-1716
- Costanzo V, Shechter D, Lupardus PJ, Cimprich KA, Gottesman M, Gautier J (2003) An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell* 11:203-213

- Costes SV, Boisière A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH (2006) Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat Res* 165:505-515
- Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B (2010) Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat Res* 704:78-87
- Cowell I, Sunter N, Singh P, Austin C, Durkacz B, Tilby M (2007) γ H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS ONE* 2: e1057
- Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S (2006) Chromosome territories - a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18:307-316
- Cremer T, Cremer M, Hübner B, Strickfaden H, Smeets D, Popken J, Sterr M, Markaki Y, Rippe K, Cremer C (2015) The 4D nucleome: evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments. *FEBS Lett* 589:2931-2943
- de Berg M, van Kreveld M, van Overmars M, Schwarzkopf O (2000) Computational Geometry: Algorithms and Applications, Springer, pp. 2-8
- de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver J (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of γ H2AX in the S phase after UV damage contain double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6870-6875
- Deriano L, Roth D (2013) Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet* 47:433-455
- Di Tomaso M, Liddle P, Lafon-Hughes L, Reyes-Ábalos AL, Folle G (2013) Chromatin damage patterns shift according to eu/heterochromatin replication. En: "The mechanism of DNA replication" (Capítulo 14), Stuart D (Ed), Intech. doi: 10.5772/51847
- Di Tomaso M, Martínez-López W, Folle G, Palitti F (2006) Modulation of chromosome damage localization by DNA replication timing. *Int J Radiat Biol* 82:877-886
- Di Tomaso M, Martínez-López W, Palitti F (2010) Asynchronously replicating eu/heterochromatic regions shape chromosome damage. *Cytogenet Genome Res* 128:111-117
- Dillon N (2004) Heterochromatin structure and function. *Biol Cell* 96:631-637
- Dimitrova D, Gilbert D (1999) The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1-phase. *Mol Cell* 4:983-993
- Dimitrova D (2011) DNA replication initiation patterns and spatial dynamics of the human ribosomal RNA gene loci. *J Cell Sci* 124:2743-2752
- Dong Y, Xiong M, Duan L, Liu Z, Niu T, Luo Y, Wu X, Xu C, Lu C (2014) H2AX phosphorylation regulated by p38 is involved in Bim expression and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells induced by imatinib. *Apoptosis* 19:1281-1292
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Cote J (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* 16: 979-990

- Falck J, Coates J, Jackson SP (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434:605-611
- Falk M, Lukasova E, Kozubek S (2008) Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation. *Biochim Biophys Acta* 1783:2398-2414
- Falk M, Lukasova E, Kozubek S (2010) Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat Res* 704:88-100
- Folle G, Boccardo E, Obe G (1997) Localization of chromosome breakpoints induced by DNase I in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chromosoma* 106:391-399
- Folle G, Martínez-López W, Boccardo E, Obe G (1998) Localization of chromosome breakpoints: implications of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mutat Res* 404:17-26
- Folle G, Liddle P, Lafon-Hughes L, Di Tomaso M (2010) Close encounters: RIDGEs, hyperacetylated chromatin, radiation breakpoints and genes differentially expressed in tumors cluster at specific human chromosome regions. *Cytogenet Genome Res* 128:17-27
- Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju J, Thorson JS, Shen B (2005) Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem Rev* 105:739-758
- Gelot C, Magdalou I, Lopez BS (2015) Replication stress in Mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes* 6: 267-298
- Giloni L, Takeshita M, Johnson F, Iden C, Grollman AP (1981) Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *J Biol Chem* 256:8608-8615.
- Goodarzi A, Noon A, Deckbar D et al. (2008) ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Mol Cell* 31:67-177
- Goodarzi A, Kurka T, Jeggo P (2011) KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat Struct Mol Biol* 18:831-839
- Grigaravicius P, Rapp A, Greulich KO (2009) A direct view by immunofluorescent comet assay (IFCA) of DNA damage induced by nicking and cutting enzymes, ionizing ^{137}Cs radiation, UV-A laser microbeam irradiation and the radiomimetic drug bleomycin. *Mutagenesis* 24:191-197
- Gupta A, Hunt CR, Chakraborty S, Pandita RK, Yordy J, Ramnarain DB, Horikoshi N, Pandita TK (2014) Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Radiat Res* 181:1-8
- Håkansson P, Hofer A, Thelander L (2006) Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* 281:7834-7841
- Hausmann M, Wagner E, Lee JH, Schrock G, Schaufler W, Krufczik M, Papenfuß F, Port M, Bestvater F, Scherthan H (2018) Super-resolution localization microscopy of radiation-induced histone H2AX-phosphorylation in relation to H3K9-trimethylation in HeLa cells. *Nanoscale* 10:4320-4331

- Heilemann M, van de Linde S, Schüttpeitz M et al. (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:6172-6176
- Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Bot* 69:726-818
- Henner WD, Grunberg SM, Haseltine WA (1982) Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *J Biol Chem* 257:11750-11754
- Henikoff S, Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:133-153
- Herrick J (2011) Genetic variation and DNA replication timing, or why is there late replicating DNA? *Evolution* 65:3031-3047
- Holmquist G, Ashley T (2006) Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* 114:96-125
- Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I, Nicolas E, Massip L, Trouche D, Legube G (2010) High-resolution profiling of γ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J* 29:1446-1457
- Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H (2005) Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun* 336:807-812.
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071-1078
- Jakob B, Splinter J, Conrad S, Voss K, Zink D, Durante M, Löbrich M, Taucher-Scholz G (2011) DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res* 39:6489-6499
- Jeon Y, Bekiranov S, Karnani N, Kapranov P, Ghosh S, MacAlpine D, Lee C, Hwang D, Gingeras T, Dutta A (2005) Temporal profile of replication of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6419-6424
- Jung EJ, Kim CW, Kim DR (2008) Cytosolic accumulation of γ H2AX is associated with tropomyosin-related kinase A-induced cell death in U2OS cells. *Exp Mol Med* 40:276-285
- Kanao M, Tomita S, Ishihara S, Murakami A, Okada H (1973) Chelation of bleomycin with copper in vivo. *Chemotherapy* 21:1305-1310
- Karagiannis T, Harikrishnan K, El-Osta A (2007) Disparity of histone deacetylase inhibition on repair of radiation-induced DNA damage on euchromatin and constitutive heterochromatin compartments. *Oncogene* 26: 3963-3971
- Kim J, Kruhlak M, Dotiwala F, Nussenzweig A, Haber J (2007) Heterochromatin is refractory to γ H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol* 178:209-218
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Lliakis (2008) γ H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36:5678-5694

- Konstantinou E, Pashalidis I, Kolnagou A, Kontoghiorghes GJ (2001) Interactions of hydroxycarbamide (hydroxyurea) with iron and copper: implications on toxicity and therapeutic strategies. *Hemoglobin* 35:237-246
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705
- Krakoff IH, Brown NC, Reichard P (1968) Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res* 28:1559-1565
- Kruhlak M, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller W, McNally J, Bazett-Jones D, Nussenzweig A (2006) Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 172:823-834
- Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Liddle P, Toledo A, Reyes-Abalos AL, Folle GA (2013). Preferential localization of γ H2AX foci in euchromatin of retina rod cells after DNA damage induction. *Chromosome Res* 21:789-803
- Lee J, Paull T (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308:551-554
- Levet F, Hosy E, Kechkar A, Butler C, Beghin A, Choquet D, Sibarita JB (2015) SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat Methods* 12:1065-1071
- Liddle P, Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Reyes-Ábalos AL, Jara J, Cerda M, Härtel S, Folle GA (2014) Bleomycin-induced γ H2AX foci map preferentially to replicating domains in CHO9 interphase nuclei. *Chromosome Res* 22:463-481
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69:581-593
- Lopez Perez R, Best G, Nicolay NH, Greubel C, Rossberger S, Reindl J, Dollinger G, Weber KJ, Cremer C, Huber PE (2016) Superresolution light microscopy shows nanostructure of carbon ion radiation-induced DNA double-strand break repair foci. *FASEB J* 30:2767-2776
- Loupart M, Krause S, Heck M (2000) Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 10:1547-1556
- Ma H, Samarabandu J, Devdhar R, Acharya R, Cheng P, Meng C, Berezney R (1998) Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol* 143:1415-1425
- Manders M, Verbeek F, Aten J (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. *J Microsc* 169:375-382
- Markova E, Schultz N, Belyaev IY (2007) Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 83:319-329
- Martin OA, Ivashkevich A, Choo S, Woodbine L, Jeggo PA, Martin RF, Lobachevsky P (2013) Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity. *DNA Repair* 12:844-855

- Martínez-López W, Folle G, Obe G, Jeppesen P (2001) Chromosome regions enriched in hyperacetylated histone H4 are preferred sites for endonuclease- and radiation-induced breakpoints. *Chromosome Res* 9:69-75
- McManus K, Hendzel M (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025
- Meyer B, Voss KO, Tobias F, Jakob B, Durante M, Taucher-Scholz G (2013) Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic Acids Res* 41:6109-6118
- Misteli T, Soutoglou E (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:243-254
- Mladenov E, Iliakis G (2011) The pathways of double-strand break repair. En: "DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors" (Capítulo 8), Storici F (Ed), Intech. doi: 10.5772/871
- Murray V, Chen JK, Chung LH (2018) The Interaction of the Metallo-Glycopeptide Anti-Tumour Drug Bleomycin with DNA. *Int J Mol Sci* 19. pii:E1372
- Murray V, Chen JK, Galea AM (2014) The anti-tumor drug bleomycin preferentially cleaves at the transcription start sites of actively transcribed genes in human cells. *Cell Mol Life Sci* 71: 1505-1512
- Nam EA, Cortez D (2011) ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* 436:527-536.
- Natale F, Rapp A, Yu W, Maiser A, Harz H, Scholl A, Grulich S, Anton T, Hörl D, Chen W, Durante M, Taucher-Scholz G, Leonhardt H, Cardoso MC (2017) Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. *Nat Commun* 8:15760
- Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9:1019-1026
- Nguyen HT, Murray V (2012) The DNA sequence specificity of bleomycin cleavage in telomeric sequences in human cells. *J Biol Inorg Chem* 17:1209-1215
- Noon A, Shibata A, Rief N, Löbrich M, Stewart G, Jeggo P, Goodarzi A (2010) 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* 12:177-184
- Nordlund P, Reichard P (2006) Ribonucleotide Reductases. *Annu Rev Biochem* 75:681-706
- Nospikel T, Hanawalt PC (2002) DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair* 1:59-75.
- Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7:3-12
- O'Keefe RT, Henderson SC, Spector DL (1992) Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific α -satellite DNA sequences. *J Cell Biol* 116:1095-1110

- Olive PL, Banath JP (1993) Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol* 64:349-58
- Petermann E, Helleday T (2010) Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:683-687
- Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T (2010) Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 37:492-502
- Phillips JE, Corces VG (2009) CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137:1194-1211
- Pokholok D, Harbison C, Levine S, Cole M, Hannett N, Lee T, Bell G, Walker K, Rolfe P, Herbolsheimer E (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122:517-527
- Polo SE, Jackson SP (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 25:409-433
- Povirk L, Han Y, Steighner R (1989) Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry* 28:5808-5814
- Pron G, Belehradek J Jr, Mir LM (1993) Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 194:333-337
- Pron G, Mahrour N, Orlowski S, Tounekti O, Poddevin B, Belehradek J Jr, Mir LM (1999) Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochem Pharmacol* 57:45-56
- Regulus P, Duroux B, Bayle PA, Favier A, Cadet J, Ravanat JL (2007) Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14032-14037
- Reichard P (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 57:349-374
- Reindl J, Drexler GA, Girst S, Greubel C, Siebenwirth C, Drexler SE, Dollinger G, Friedl AA (2015) Nanoscopic exclusion between Rad51 and 53BP1 after ion irradiation in human HeLa cells. *Phys Biol* 12:066005
- Reindl J, Girst S, Walsh DW, Greubel C, Schwarz B, Siebenwirth C, Drexler GA, Friedl AA, Dollinger G (2017) Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced γ H2AX, 53BP1 and Rad51 foci. *Sci Rep* 7:40616
- Requejo-Isidro J (2013) Fluorescence nanoscopy. Methods and applications. *J Chem Biol* 6:97-120
- Rogakou E, Pilch D, Orr A, Ivanova V, Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
- Rogakou E, Boon C, Redon C, Bonner W (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* 146:905-915

- Ronneberger O, Baddeley D, Scheipl F, Verveer PJ, Burkhardt H, Cremer C, Fahrmeir L, Cremer T, Joffe B (2008) Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res* 16:523-562
- Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5057-5062
- Rust MJ, Bates M, Zhuang XW (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3:793-795
- Ryba T, Hiratani I, Lu J, Itoh M, Kulik M, Zhang J, Dalton S, Gilbert D (2010) Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res* 20:761-770
- Rybak P, Hoang A, Bujnowicz L, Bernas T, Berniak K, Zarębski M, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J (2016) Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γ H2AX) is not associated with DNA double-strand breaks. *Oncotarget* 7:49574-49587
- Sadoni N, Langer S, Fauth C et al. (1999) Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146:1211-1226
- Salic A, Mitchison T (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2415-2420
- Salzano M, Sanz-García M, Monsalve DM, Moura DS, Lazo PA (2015) VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics* 10:373-383
- Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190:165-175
- Schipler A, Iliakis G (2013) DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res* 41:7589-7605
- Seo J, Kim SC, Lee HS, Kim JK, Shon HJ, Salleh NL, Desai KV, Lee JH, Kang ES, Kim JS, Choi JK (2012) Genome-wide profiles of H2AX and γ -H2AX differentiate endogenous and exogenous DNA damage hotspots in human cells. *Nucleic Acid Res* 40:5965-5974
- Seol JH, Shim EY, Lee SE (2018) Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat Res* 809:81-87
- Serafim RAM, de Souza Gama FH, Dutra LA, Dos Reis CV, Vasconcelos SNS, da Silva A, Takarada JE, Di Pillo F, Azevedo H, Mascarello A, Elkins JM, Massirer KB, Gileadi O, Guimarães CRW, Couñago RM (2019) Development of Pyridine-based Inhibitors for the Human Vaccinia-related Kinases 1 and 2. *ACS Med Chem Lett* 10:1266-1271
- Sinclair WK (1965) Hydroxyurea: differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. *Science* 150:1729-1731
- Singh A, Xu YJ (2016) The cell killing mechanism of hydroxyurea. *Genes (Basel)* 7:99 doi:10.3390/genes7110099

Sirbu BM, Couch FB, Feigerle JT, Bhaskara S, Hiebert SW, Cortez D (2011) Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Genes Dev* 25:1320-1327

Sisario D, Memmel S, Doose S, Neubauer J, Zimmermann H, Flentje M, Djuzenova CS, Sauer M, Sukhorukov V (2018) Nanostructure of DNA repair foci revealed by superresolution microscopy. *FASEB J* 32:6469-6477

Skalniková M, Bártošová E, Ulman V et al. (2007) Distinct patterns of histone methylation and acetylation in human interphase nuclei. *Physiol Res* 56:797-806

Solovei I, Kreysing M, Lanctôt C, Kösem S, Peichl L, Cremer T, Guck J, Joffe B (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137:356-368

Solovjeva LV, Svetlova MP, Chagin VO, Tomilin NV (2007) Inhibition of transcription at radiation-induced nuclear foci of phosphorylated histone H2AX in mammalian cells. *Chromosome Res* 15:787-797

Solier S, Sordet O, Kohn KW, Pommier Y (2009) Death receptor-induced activation of the chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathway. *Mol Cell Biol* 29:68-82

Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297:599-602

Sternberg S (1983) Biomedical Image Processing. *Computer* 16:22-34

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res* 64:2390-2396

Sultana R, Abdel-Fatah T, Perry C, Moseley P, Albarakti N, Mohan V, Seedhouse C, Chan S, Madhusudan S (2013) Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase inhibition is synthetically lethal in XRCC1 deficient ovarian cancer cells. *PLoS One* 8:e57098

Svetlova M, Solovjeva L, Nishi K, Nazarov I, Siino J, Tomilin N (2007) Elimination of radiation-induced gamma-H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. *Biochem Biophys Res Commun* 358:650-654

Symington LS, Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45:247-71

Szillard RK, Jacques PE, Laramée L, Cheng B, Galicia S, Bataille AR, Yeung M, Mendez M, Bergeron M, Robert F, et al (2010) Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of gamma-H2AX. *Nat Struct Mol Biol* 17: 299-305

Takata H, Hanafusa T, Mori T, Shimura M, Iida Y, Ishikawa K, Yoshikawa K, Yoshikawa Y, Maeshima K (2013) Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLoS One* 8:e75622

Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14:2989-3002

- Tobey RA (1972) A simple, rapid technique for determination of the effects of chemotherapeutic agents on mammalian cell-cycle traverse. *Cancer Res* 32:309-316
- Tounekti O, Kenani A, Foray N, Orlowski S, Mir L (2001) The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer* 84:1272-1279
- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28:1-13
- Turinetto V, Giachino C (2015) Multiple facets of histone variant H2AX: A DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 43:2489-2498
- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y (1966) New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 19:200-209
- van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* 6:991-1009
- van de Linde S, Aufmkolk S, Franke C, Holm T, Klein T, Löschberger A, Proppert S, Wolter S, Sauer M (2013) Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem Biol* 20:8-18
- Vanderwall D, Lui S, Wu W, Turner C, Kozarich J, Stubbe J (1997) A model of the structure of HOO-Co-bleomycin bound to d(CCAGTACTGG)₂: recognition at the d(GpT) site and implications for double-strand cleavage. *Chem Biol* 4:373-387
- Vasireddy R, Karagiannis T, El-Osta A (2010) γ -radiation-induced γ H2AX formation occurs preferentially in actively transcribing euchromatic loci. *Cell Mol Life Sci* 67:291-294
- Versteeg R, van Schaik B, van Batenburg M, Roos M, Monajemi R, Caron H, Bussemaker H, van Kampen A (2003) The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res* 13:1998-2004
- Vitelli V, Galbiati A, Iannelli F, Pessina F, Sharma S, d'Adda di Fagagna F (2017) Recent Advancements in DNA Damage-Transcription Crosstalk and High-Resolution Mapping of DNA Breaks. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 18: 87-113
- Ward I, Chen J (2001) Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *J Biol Chem* 276:47759-44762
- Watters G, Smart D, Harvey J et al. (2009) H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res* 679: 50-58
- White D, Rafalska-Metcalf IU, Ivanov AV, Corsinotti A, Peng H, Lee SC, Trono D, Janicki SM, Rauscher FJ 3rd (2012) The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation. *Mol Cancer Res* 10: 401-414
- Wolter S, Löschberger A, Holm T, Aufmkolk S, Devauballe MC, van de Linde S, Sauer M (2012) rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat Methods* 9:1040-1041

- Woodfine K, Fiegler H, Beare D, Collins J, McCann O, Young B, Debernardi S, Mott R, Dunham I, Carter N (2004) Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet* 13:191-202
- Yang S, Rhind N, Bechhoefer J (2010) Modeling genome-wide replication kinetics reveals a mechanism for regulation of replication timing. *Mol Syst Biol* 6:404
- Yu CK, Sinclair WK (1968) Cytological effects on Chinese hamster cells of synchronizing concentrations of hydroxyurea. *J Cell Physiol* 72:39-42
- Zeman MK, Cimprich KA (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16:2-9
- Zhao H, Halicka HD, Li J et al. (2013) DNA damage signaling, impairment of cell cycle progression, and apoptosis triggered by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry A* 83:979-988
- Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T (2007) Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem* 40:101-111
- Zinner R, Albiez H, Walter J, Peters AH, Cremer T, Cremer M (2006) Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol* 125:3-19
- Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8:870-876.

9. Anexo: Publicaciones asociadas con esta tesis

Como resultado del trabajo de tesis se publicó un artículo conteniendo gran parte de los datos obtenidos durante el Doctorado, el cual se adjunta como anexo.

Liddle P, Jara-Wilde J, Lafon-Hughes L, Castro I, Härtel S and Folle GA (2020) dSTORM microscopy evidences in HeLa cells clustered and scattered γ H2AX nanofoci sensitive to ATM, DNA-PK, and ATR kinase inhibitors. Molecular and Cellular Biochemistry. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03809-4>

También se participó como autor en el siguiente trabajo, del cual dejamos la cita bibliográfica.

Reyes-Ábalos AL, Liddle P, Folle GA, Di Tomaso MV (2018) γ H2AX prefers late replicating metaphase chromosome regions. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 836:114-121. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.06.001



dSTORM microscopy evidences in HeLa cells clustered and scattered γ H2AX nanofoci sensitive to ATM, DNA-PK, and ATR kinase inhibitors

Pablo Liddle¹ · Jorge Jara-Wilde^{2,3} · Laura Lafon-Hughes¹ · Iván Castro² · Steffen Härtel^{2,4} · Gustavo Folle¹

Received: 31 December 2019 / Accepted: 18 June 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

In response to DNA double-strand breaks (DSB), histone H2AX is phosphorylated around the lesion by a feed forward signal amplification loop, originating γ H2AX foci detectable by immunofluorescence and confocal microscopy as elliptical areas of uniform intensity. We exploited the significant increase in resolution ($\sim \times 10$) provided by single-molecule localization microscopy (SMLM) to investigate at nanometer scale the distribution of γ H2AX signals either endogenous (controls) or induced by the radiomimetic bleomycin (BLEO) in HeLa cells. In both conditions, clustered substructures (nanofoci) confined to γ H2AX foci and scattered nanofoci throughout the remnant nuclear area were detected. SR-Tesseler software (Voronoi tessellation-based segmentation) was combined with a custom Python script to first separate clustered nanofoci inside γ H2AX foci from scattered nanofoci, and then to perform a cluster analysis upon each nanofoci type. Compared to controls, γ H2AX foci in BLEO-treated nuclei presented on average larger areas (0.41 versus $0.19 \mu\text{m}^2$), more nanofoci per focus (22.7 versus 13.2) and comparable nanofoci densities (~ 60 nanofoci/ μm^2). Scattered γ H2AX nanofoci were equally present (~ 3 nanofoci/ μm^2), suggesting an endogenous origin. BLEO-treated cells were challenged with specific inhibitors of canonical H2AX kinases, namely: KU-55933, VE-821 and NU-7026 for ATM, ATR and DNA-PK, respectively. Under treatment with pooled inhibitors, clustered nanofoci vanished from super-resolution images while scattered nanofoci decreased ($\sim 50\%$) in density. Residual scattered nanofoci could reflect, among other alternatives, H2AX phosphorylation mediated by VRK1, a recently described non-canonical H2AX kinase. In addition to H2AX findings, an analytical approach to quantify clusters of highly differing density from SMLM data is put forward.

Keywords DNA damage · γ H2AX nanofoci · ATM/ATR/DNA-PK inhibitors · SMLM microscopy · Voronoi tessellation

Abbreviations

γ H2AX Histone H2AX phosphorylated on serine 139
ATM Ataxia telangiectasia mutated

ATR ATM and Rad3-related
BLEO Bleomycin
CLSM Confocal laser scanning microscopy
DDR DNA damage response
DNA-PK DNA-dependent protein kinase
DSB Double-strand break
dSTORM Direct stochastic optical reconstruction microscopy
IR Ionizing radiation
LET Linear energy transfer
MAPK Mitogen-activated protein kinase
PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase
ROI Region of interest
SIM Structured illumination microscopy
SMLM Single-molecule localization microscopy
STED Stimulated emission depletion microscopy
TSS Transcription start site

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11010-020-03809-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pablo Liddle
pablo.liddle@gmail.com

¹ Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

² SCIAN-Lab, Biomedical Neuroscience Institute (BNI), Santiago, Chile

³ Departamento de Ciencias de la Computación, Universidad de Chile, Santiago, Chile

⁴ Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Introduction

Cells respond to DNA damage by activating a complex set of biochemical signaling pathways, known as the DNA damage response (DDR), which aims to restore DNA integrity and maintain genomic stability. Critical regulators of the DDR are remodeling and chromatin-modifying activities. A very important chromatin modification in response to DNA double-strand breaks, DSB [1] or stalled replication forks [2] is the phosphorylation of the histone H2A variant H2AX on a conserved C-terminal serine residue, generating γ H2AX. The phosphorylation begins few minutes after DNA damage induction, reaches a maximum (plateau) 15–60 min later, and decays steadily afterwards [3]. It spreads 1–2 Mb around the lesion, allowing immunodetection as microscopically visible ($\varnothing \sim 0.4\text{--}1.0\ \mu\text{m}$) γ H2AX foci by standard fluorescence microscopy [4]. Although the presence of γ H2AX is not required for initial damage recognition, it is critical for the efficient recruitment and/or retention of DNA repair factors at the lesion site thus amplifying the DNA damage signaling [5]. Phosphorylation of H2AX to γ H2AX in the surroundings of lesion sites is mediated by ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related) and DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), which are members of the PI3K (phosphatidylinositol 3-kinases) family of protein kinases. ATM and DNA-PK phosphorylate H2AX in response to directly induced DSB, while at stalled forks generated during replication stress, H2AX phosphorylation is primarily mediated by ATR [2].

DSB are the most critical DNA lesion since they directly compromise genome integrity. If the lesion is left partially or entirely unrepaired, it can trigger cell death or lead to chromosome breaks and translocations related with human diseases and cancer proneness [6]. Endogenous processes, such as DNA replication [7], transcription [8], 3D genome folding [9] or V(D)J recombination in developing thymocytes [10] can induce DSB. Additionally, DSB can be induced by physical (mainly ionizing radiations, IR) and chemical agents (known as radiomimetics) which are able to insult DNA by a direct free radical attack on the deoxyribose backbone.

Bleomycin (BLEO) is a radiomimetic chemical isolated from *Streptomyces verticillus* [11] that consists of a closely related family of glycopeptides. By means of a 5'-G-Py-3' sequence preference for rupturing DNA structure, it generates single strand breaks (SSB) and DSB [12]. BLEO was initially compared to low linear energy transfer (LET) radiations [13], which mainly generate individual DSB, and hence single DNA repair foci well separated one from each other [14]. Nonetheless, BLEO causes also clustered DNA lesions [15, 16], which can comprise clustered

DSB among others. These lesions imply the presence of two or more lesions in close proximity [17] and are normally associated to high-LET radiation [18]. In case of clustered DSB DNA repair foci are not necessarily recognizable as individual focus [14]. Due to its genotoxicity, it has been extensively used in chemotherapy for treatment of several types of cancer, such as testicular cancer, certain lymphomas and squamous cell carcinomas.

Conventional fluorescence microscopy is diffraction-limited to $\sim 200\ \text{nm}$ and $\sim 500\ \text{nm}$ lateral and axial resolution, respectively, which implies that smaller macromolecular complexes such as DNA repair foci appear blurred and their in-depth organization cannot be unraveled. Under these conditions the visualization of γ H2AX foci is restricted to rounded/elliptical nuclear areas of homogeneous intensity, as we noticed in CHO cells when imaging BLEO-induced foci by confocal microscopy [19].

In the last years, a few works have applied what is collectively termed “super-resolution microscopy” or “nanoscopy” to investigate DNA damage repair foci at the nanometer scale. The resolution of such techniques nearly approaches the molecular level (10–100 nm) [20]. By stimulated emission depletion microscopy (STED) Reindl et al. [21, 22] determined that γ H2AX and 53BP1 foci, induced either after low- (protons) or high-LET (carbon ions) irradiation in HeLa cells, presented inner nanostructures of round/elongated shape with diameters of $\sim 130\ \text{nm}$. Natale et al. [23] arrived at comparable results by combining structured illumination microscopy (SIM) and STED also in HeLa cells but X-ray-exposed. They reported a spatial organization of γ H2AX foci in nanoclusters, which in turn, were composed of several smaller structures, referred as nanofoci, with estimated mean diameters of $\sim 200\ \text{nm}$ (SIM) and $\sim 160\ \text{nm}$ (STED). Either by immunodetection of phospho-Ku70, which directly associates to broken DNA ends, or using TUNEL assay they concluded that each cluster (rather than nanofoci) corresponded to one DSB.

Among nanoscopies single-molecule localization microscopy (SMLM) provides the highest lateral resolution ($\sim 20\ \text{nm}$). Indeed, a similar arrangement of circular nanostructures clustered inside γ H2AX foci but with a smaller diameter range ($\varnothing = 40\text{--}60\ \text{nm}$) was reported by SMLM in a glioblastoma cell line exposed to carbon ions [24]. Based on their size, the authors claimed that these entities, denoted as subfoci elements, may correspond to individual nucleosomes containing γ H2AX within DSB repair foci. In agreement, X-ray induced γ H2AX in other glioblastoma cell lines were found to be composed of circular nanostructures with a comparable size ($\varnothing \sim 45\ \text{nm}$) [25].

Strikingly, Lopez Perez et al. [24] also reported the presence of isolated nanofoci, outside γ H2AX foci but ubiquitously scattered elsewhere in nuclei from control and irradiated cells. A similar distinction between nanofoci, i.e.

clustered in γ H2AX foci versus unclustered, was mentioned by Natale et al. [23]. Given the potential implications such isolated all-over γ H2AX nanofoci could have in DNA repair dynamics, they deserve further research.

As a new contribution to the field, here we aimed to separately evaluate clustered nanofoci within γ H2AX from unclustered nanofoci in control and BLEO-treated HeLa cells imaged by direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM), a SMLM technique. A custom cluster analysis method was implemented to individually quantify the two kinds of nanofoci. In addition, to glimpse into their biological characterization, their presence was determined after a deliberate inhibition of the canonical H2AX kinases ATM, ATR and DNA-PK.

Materials and methods

Cell culture

HeLa cells (DSMZ, Germany #161) were routinely cultured in RPMI 1640 with L-glutamine (Sigma-Aldrich R8758) plus 10% (v/v) fetal calf serum (FBS, Sigma-Aldrich F7524), 100 U/mL penicillin 0.1 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich P4333), 1% MEM non-essential amino acid solution (Sigma-Aldrich F7524), and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich S8636) in T25-culture flasks at 37 °C and 5% CO₂. Two days before experiments 10.000 cells/well were seeded into 8-well Lab-Tek II chamber slides (Nunc 154534, Thermo Fischer Scientific).

Treatment with bleomycin and H2AX kinase inhibitors

DNA damage was induced by a 45 min BLEO pulse (Sigma-Aldrich 15361) in the absence of FBS. Initially, a dose–response curve (5 to 160 μ g/mL BLEO) and a kinetic analysis (allowing 0–2 h recovery in fresh culture medium + FBS after treatment) were carried out. The dose range to test was chosen based on our previous experience with BLEO in CHO cells [19] and other studies which used BLEO to cause genetic damage in HeLa [26, 27]. Then, the 20 μ g/mL BLEO dose (BLEO20) without recovery time (0 h) was chosen for later experiments. Controls were carried out by incubation in fresh culture medium (without FBS) during the BLEO pulse.

In order to inhibit ATM, ATR and DNA-PK, HeLa cells were pretreated for 1 h and then co-exposed to BLEO20 plus the inhibitors (one by one and in combinations), namely 20 μ M KU-55933 (ATMi, Sigma-Aldrich SML1109) in 0.4% DMSO, 20 μ M VE-821 (ATRi, Sigma-Aldrich SML1415) in 0.4% DMSO and/or 20 μ M NU7026 (DNA-PKi,

Sigma-Aldrich N1537) in 0.4% DMSO. Vehicle controls were always run in parallel.

γ H2AX immunolabeling

Cells were fixed with a 3.7% formaldehyde solution by diluting 1:10 in PBS a 37% formaldehyde stock (Sigma-Aldrich 252549) for 10 min. Then, they were washed in PBS (3 $\times$ 5 min), permeabilized (15 min in 0.5% Triton X-100 in PBS), blocked 30 min in 2% BSA in PBS, and then incubated with 1:500 diluted mouse monoclonal anti- γ H2AX antibody (Abcam, ab26350) in blocking buffer for 1 h at RT. In addition, controls without primary antibodies (that is, exposed only to blocking buffer) were performed. After washing with 0.1% Tween-20 in PBS (PBS-T, 3 $\times$ 5 min), cells were stained for 45 min at RT with secondary antibodies, namely 1:500 Alexa Fluor 532-conjugated goat anti-mouse IgG (Life Technologies A-11002) or 1:500 Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse F(ab')₂ (Life Technologies A-21237). Finally, cells were washed in PBS-T (3 $\times$ 5 min) and kept in PBS for 1 to 5 days, until being imaged by confocal laser scanning microscopy (CLSM) or dSTORM.

Confocal laser scanning microscopy

To evaluate the effect of individual or combined H2AX kinase inhibitors on γ H2AX foci formation we used CLSM. Z-stacks of 1024 $\times$ 1024 pixels with pixel size 0.198 $\times$ 0.198 μ m and 1.0 μ m step size between optical sections were obtained in a Zeiss LSM 700 microscope (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) equipped with 555 nm (Alexa Fluor 532) and 639 nm (Alexa Fluor 647) excitation lasers, and a 63 $\times$ oil immersion objective (NA = 1.4). Image acquisition settings were kept identical for each experiment to allow comparisons of different treatments. Afterwards, images were analyzed in Fiji software (<https://fiji.sc/>) to determine the number of γ H2AX foci per nucleus in each condition. To do this, we first segmented γ H2AX foci by intensity thresholding (constant value per experiment among conditions). Next, the plugin “3D Object Counter” was used to count the total number of foci per stack with a size filter of 5–100 voxels. A maximum volume of 100 voxels was considered to eliminate segmented objects coming from γ H2AX pan-nuclear cells. Finally, the number of cells (excluding γ H2AX pan-nuclear cells) was determined using the plugin “Cell Counter”, which enabled to calculate foci number per nucleus for each condition.

dSTORM imaging

dSTORM relies on the temporal separation of fluorescence emission of individual molecules using dyes which can

undergo reversible photoswitching. To this end, a random read-out of these emissions is attained by transferring the majority of fluorophores to a reversible OFF state and the subsequent stochastic activation and detection of a subset of individual fluorophores. If the probability of activation is low enough, the majority of activated fluorophores residing in their fluorescent ON states are spaced further apart than the diffraction limit and their positions can be precisely determined by a Gaussian fitting of the individual spots. This cycle of photoactivation and read-out is repeated thousands of times allowing the reconstruction of a super-resolution image from all of the single-molecule localizations [28]. Individual cells from controls and cultures exposed to BLEO20, either alone or co-treated with H2AX kinase inhibitors, were imaged by dSTORM. Since suppression of γ H2AX foci formation in BLEO20 nuclei was maximized under co-treatment with the pooled 3 kinase inhibitors (ATMi, ATRi, DNA-PKi) (BLEO20 + 3i nuclei) we chose this condition for dSTORM imaging. In addition, to exclude a dose-dependent and/or time-dependent qualitative change in γ H2AX foci nanostructure, we imaged cells exposed to BLEO in the 5–160 μ g/mL range or allowed to recover post-damage (0.5–2 h) in fresh culture medium.

Immediately before imaging, PBS was replaced by a photoswitching buffer containing 100 mM β -mercaptoethylamine hydrochloride (MEA, Sigma-Aldrich M6500) in PBS for Alexa Fluor 532, or the same buffer plus an oxygen scavenger system [2% (w/v) glucose, 4 U/mL glucose oxidase and 80 U/mL catalase] for Alexa Fluor 647. In both cases, the buffer pH was set to 7.4 with KOH to achieve an optimal photoswitching effect.

Super-resolution imaging was executed as described previously [28]. In brief, dSTORM images were acquired with an inverted microscope (IX-71; Olympus) equipped with a nosepiece stage (IX2-NPs; Olympus). For excitation of Alexa Fluor 532 and Alexa Fluor 647 a 532-nm diode laser and a 641-nm diode laser (Cube 640-100C, Coherent) spectrally cleaned by a clean-up filter (Laser Clean-up filter 640/10, Chroma) were respectively used.

For each dSTORM measurement we first selected the cell of interest and the focal plane of choice by transmitted light. Then, the fluorescence was turned on and the cell was properly centered at low laser intensities. Next, the irradiation intensity was increased (~ 5 kW/cm²) to transfer most fluorophores to their off-state. When proper photoblinking was observed (30–60 s later), an image stack of 20,000 frames with an exposure time of 15 ms per frame was recorded in highly inclined and laminated optical sheet (HILO) illumination mode. Super-resolution images were reconstructed in rapidSTORM 3.3 software [29] with a minimum intensity threshold of 600 photons and pixel size of 10 nm.

Cell culture and treatments, immunolabeling as well as CLSM and dSTORM imaging were carried out at the

Department of Biotechnology and Biophysics (University of Würzburg, Germany).

Quantitative data analysis

We performed a cluster analysis on localization files generated by rapidSTORM 3.3 with the aim of detecting potential aggregates of γ H2AX signal inside nuclei, associated either to γ H2AX foci regions or to the remaining nuclear areas. In addition, the nuclear distribution of molecule coordinates among conditions was compared.

For cluster analysis the list of localization coordinates were loaded in the SR-Tesseler software (<https://www.iins.u-bordeaux.fr/team-sibarita-SR-Tesseler?lang=en>) [30]. SR-Tesseler performs the calculation of 2D Voronoi diagrams (Voronoi tessellation) [31] and allows the subsequent segmentation of groups of localizations as *objects of interest* based on one or more parameters calculated for each localization in the diagram. It has been successfully used with SMLM data from different biological contexts, for instance to decipher the nano-organization of synaptic adhesion proteins in neuron membranes [32], changes in nanocluster density of calcium-handling regulators in mouse myocytes subjected to cardiac hypertrophy [33], the impact of reactive oxygen species on plasma membrane proteins under osmotic stress in *Arabidopsis* [34] or modifications in membrane nanoarrangement of CD4 receptor depending on actin cytoskeleton morphology [35].

The SR-Tesseler software procedure comprises the following steps:

- (1) *Voronoi tessellation.* A Voronoi diagram is a set of polygons calculated from the x , y molecule coordinates in the localization files. Each localization is a point that defines a Voronoi region enclosed by a polygon that has no other nearest localization. The Voronoi polygons are defined from straight segments and segment junction points separating each region from its neighbors: each straight segment is equidistant from two localizations, and the junction points between segments are equidistant from three or more different localizations (exemplified in: https://en.wikipedia.org/wiki/Voronoi_diagram#/media/File:Voronoi_growth_euclidean.gif).
- (2) *Parameter-based object-segmentation.* Once the Voronoi polygons are calculated, objects (in our case, clusters of γ H2AX signal) are defined as sets of localizations from adjacent Voronoi polygons that have a similar local (first-rank) density and/or lie within a given range of proximity (cut distance). The first-rank density of each localization is calculated considering its neighbor localizations (closer than any other localization), and comparing it against the density of a reference distribution that is spatially uniform, calculated as

the total number of localizations divided by the image area. Next, a *density factor threshold* (α) which is a multiple of the reference localization density is applied to the list of localizations from file: segmented objects of interest are required to have a localization density equal or higher than α . The *cut distance* parameter defines a maximum separation between localizations to consider them as belonging to the same object. A *minimum area* parameter defines a lower threshold value for the area of a given object to be considered.

Segmentation of γ H2AX foci regions

We first segmented γ H2AX foci regions in control and BLEO20 nuclei in order to separately analyze γ H2AX signal inside γ H2AX foci from the signal of γ H2AX spread elsewhere in the nucleus (Fig. 2). In BLEO20 + 3i cells which exhibited no γ H2AX foci this step was not performed. Manual drawings of nuclear contours (regions of interest, ROI) were made for each cell to confine the measurements to nuclear γ H2AX signals.

Following the Voronoï tessellation, γ H2AX foci were segmented as SR-Tesseler objects on nuclear ROI by adjusting the density factor threshold α and the minimum focus area to be considered. Since an extent of γ H2AX focus areas roughly from 0.1 to 0.8 μm^2 has been reported [36], we considered areas greater or equal to 0.025 μm^2 in order to include plausible yet very small foci. The value of α to perform foci segmentation was chosen by trying different values while visually checking the segmentation results (Supplemental Fig. 1). $\alpha = 1.0$ (BLEO20 nuclei) and $\alpha = 2.0$ (controls) produced the best match for the observed γ H2AX foci in the original images.

The output of the segmentation step was a text file (named *Export locs ID*), in which each localization was stored and associated to an *object index*. The object index indicated to which focus (object) each localization belonged, with localizations not associated to any focus grouped with index 0. From the *Export locs ID* data of each image, convex hull polygons were calculated for each object by applying a custom Python script (provided as Supplemental Material), in order to generate separate files of (a) localizations within γ H2AX foci and (b) remnant, non-foci localizations.

The implemented script defined the following steps:

- (1) A convex hull polygon [37] was calculated for each set of localizations with the same object index. In a convex hull polygon, some localizations become polygon vertices, while the rest become interior points. Both were considered as foci localizations. Points located in the exterior of the convex hulls were considered non-foci localizations. It was observed that many localizations from the exterior lied very close to the convex hull

polygons but remained outside, which resulted in the appearance of halos surrounding most polygons. The localizations forming the halos belonged to Voronoï polygons significantly larger (low density) than the ones included in the segmentation (high density) and could not be included in γ H2AX foci regions without decreasing the optimized α value.

- (2) An additional distance parameter d was established to include the localizations composing the halos into segmented γ H2AX foci regions within the range specified by this parameter. $d = 50$ nm was found sufficient to remove the halos (Supplemental Fig. 2).
- (3) Using the localizations of each convex hull and those within the distance threshold d , a new set of convex hull polygons was calculated. In order to approximate the area of each focus the shoelace algorithm for polygon area [38] was implemented, and applied to the convex hull polygons.
- (4) Two localization files were produced as output: one with only γ H2AX foci localizations, and the other with the remnant non-foci nuclear localizations.

Quantification of nanofoci confined to γ H2AX foci

Localization files containing solely γ H2AX foci localizations from control and BLEO20 nuclei were used to identify clusters of γ H2AX signal inside them. Nanofoci were segmented by setting $\alpha = 20$, cut distance = 20, and minimum area = 50 nm². For each cell, a list comprising the segmented objects along with their individual areas was obtained. Since dSTORM lateral resolution can reach 20–30 nm, and assuming a circular-like shape of nanofoci, objects with areas up to 2000 nm² were considered as single nanofoci, between 2000 and 4000 nm² as two (partially) fused nanofoci, and so on. Following this rule, the average number and density (number/ μm^2) of nanofoci per γ H2AX focus in control and BLEO20 nuclei were calculated. Nanofoci areas were estimated as γ H2AX foci areas, that is, by setting the additional distance d ($d = 5$ nm) and applying the shoelace algorithm. Then, the area-equivalent diameters assuming a circular-like shape of nanofoci were calculated, according to the formula: diameter = $\sqrt{4 \cdot \text{area} / \pi}$.

Quantification of scattered γ H2AX nanofoci in nuclear regions without γ H2AX foci

Localization files from BLEO20 + 3i nuclei and from control or BLEO20 cells comprising the remnant non-foci nuclear localizations were employed to evaluate the presence of scattered γ H2AX mark. This signal was segmented by setting $\alpha = 5$, cut distance = 20 and minimum area = 50 nm². Calculations were performed as in section above, but considering the nuclear area of remnant non-foci regions in control and

BLEO20 cells to determine nanofoci densities. Their presence was also computed in Ab control images, that is, in cultures incubated only with the secondary antibody.

Statistical analysis

Two-sample unpaired *t*-test and one-way ANOVA with Bonferroni correction were performed when necessary, with a 95% confidence level.

Results

BLEO-induced γ H2AX foci: dose–response curve, foci kinetics and sensitivity to ATM, ATR and DNA-PK kinase inhibitors

To select an appropriate working condition to perform a complete dSTORM image analysis in HeLa cells, preliminary experiments were carried out varying BLEO exposure dose (range 5–160 μ g/mL) and post-damage recovery time (0–2 h). The dose–response curve showed a steady level of γ H2AX foci number between 5 and 80 μ g/mL BLEO, with an increase after 160 μ g/mL BLEO exposure (Supplemental Fig. 3a). To our purpose, we considered that BLEO20 was enough to induce a robust foci number increase, tripling those found in control cells. Early kinetics (0–2 h post-treatment) showed no increase in foci number as recovery time extended (Supplemental Fig. 3b). For this reason, the easiest experimental scheme was chosen, namely fixing the cells immediately after the 45 min treatment.

The γ H2AX signal specificity was tested by employing inhibitors of H2AX kinases (ATM, ATR and DNA-PK), with the aim of suppressing the phosphorylation of H2AX to γ H2AX after BLEO insult. As shown in Supplemental Fig. 4a, γ H2AX foci formation was mainly dependent on ATM. In contrast, ATR and/or DNA-PK inhibition displayed no effect by their own. Instead, their effect was evident only if ATM was also inhibited. The fact that foci were primarily ATM-dependent suggests that they had originated from DNA DSB rather than from collapsed/stalled replication forks (which would have implied an ATR-dependent H2AX phosphorylation). The preferential involvement of ATM over DNA-PK in response to DSB is in agreement with Burma et al. [39]. Since the simultaneous use of the three inhibitors dropped foci number to control levels we chose this combination to perform dSTORM imaging.

Pan-nuclear γ H2AX signal was not abrogated by the pooled ATM/ATR/DNA-PK kinase inhibitors

It is worth to mention that, now and then, γ H2AX pan-nuclear cells were observed in all BLEO-treated cultures,

even under the simultaneous treatment with the three kinase inhibitors (Supplemental Fig. 4b–i). Conversely, they were completely absent in control and DMSO-treated cells (Supplemental Fig. 4j). A nuclear-wide γ H2AX formation, involving the entire chromatin, has been proved to be involved in apoptosis, for example by exposure to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [40], BLEO [19] and UV irradiation of DNA-replicating cells [41]. In addition, a fainter γ H2AX pan-nuclear staining unrelated to apoptosis but dependent on DNA damage level has been described specifically in G1/G2 cells after exposure to heavy ions [42]. As we suggested in CHO cells [19], an apoptotic process due to BLEO treatment could have been triggered above a certain critical amount of DNA damage. Alternatively, it has been reported that BLEO can trigger apoptosis in a DNA damage-independent extrinsic pathway, dependent on caspase-8 [43].

The pan-nuclear H2AX phosphorylation has been described to be regulated by another set of kinases (and not ATM, ATR and DNA-PK). They include Mst-1 in the JNK1/caspase-3 dependent cell death [44] and a distinct p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pro-apoptotic pathway [45] which, as expected, were not affected by the specific inhibitors we used to abate ATM, ATR and DNA-PK. A further analysis of this phenomenon was out of the scope of the present work.

Both endogenous and BLEO-induced γ H2AX foci were organized in nanometric substructures

Next, the structure of γ H2AX foci at nanometer scale by dSTORM was investigated. In cultures exposed to BLEO20 we observed clumps of γ H2AX signal (i.e. nanofoci) as substructures of the γ H2AX foci observed by standard fluorescence microscopy (Fig. 1b, f, j). The fewer endogenous γ H2AX foci in control cells exhibited a similar nanometric organization (Fig. 1a, e, i). In addition, no substantial modifications in γ H2AX foci sub-organization were appreciated either with different doses (Supplemental Fig. 3c–f) or post-damage recovery times (Supplemental Fig. 3g–j). To check the reliability of dSTORM results, we used a different secondary antibody to detect γ H2AX, which yielded a similar outcome (Supplemental Fig. 3l). As shown on Fig. 1c, BLEO-induced foci completely disappeared from dSTORM-reconstructed images when cells were simultaneously exposed to the three inhibitors (BLEO20 + 3i nuclei).

Nuclear segmentation according to γ H2AX status: on average BLEO-induced foci area was larger (~2 times) than endogenous foci area of control cells

Besides the nanometric signal within γ H2AX foci, we detected in all cases a γ H2AX mark scattered throughout the

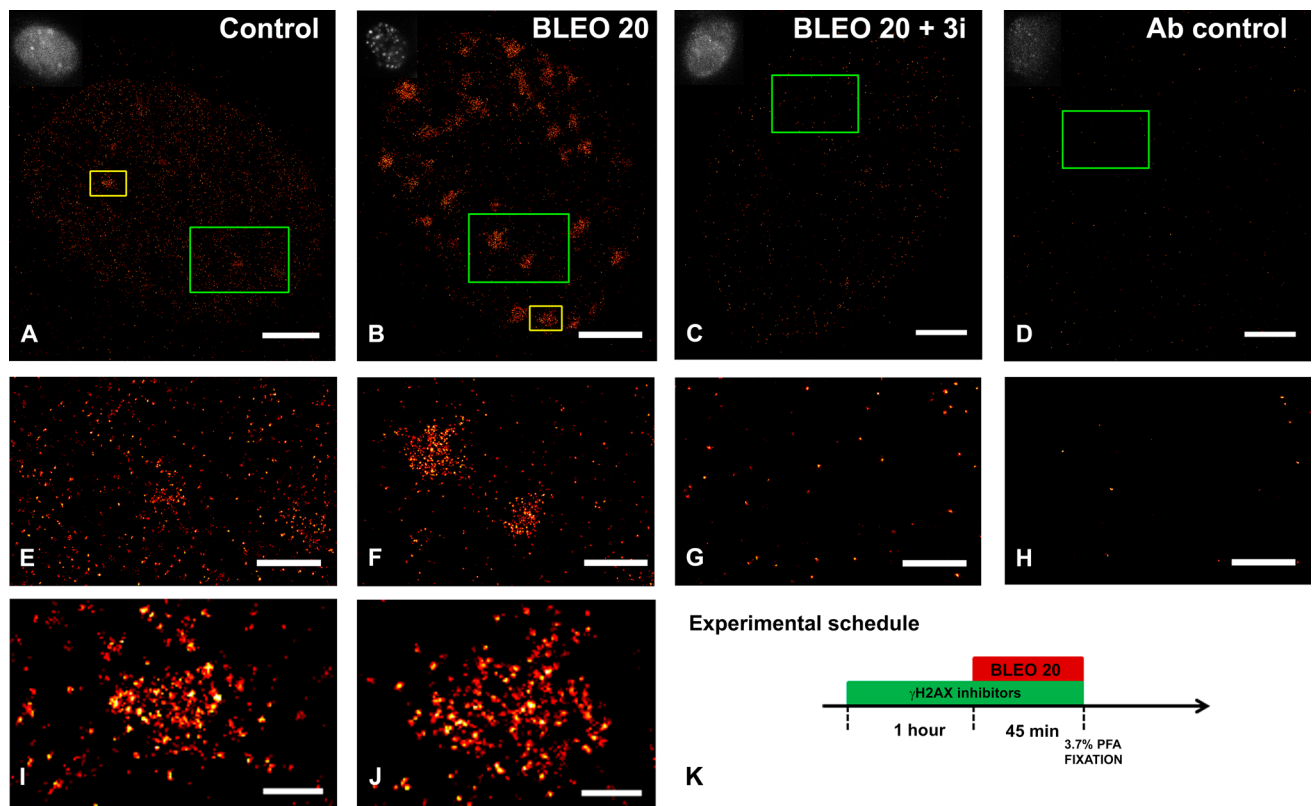


Fig. 1 Control and BLEO-induced γ H2AX foci are composed of smaller nanometric substructures (nanofoci) as revealed by dSTORM super-resolution imaging. HeLa cells were untreated (**a**) or exposed to 20 μ M BLEO (BLEO20) for 45 min alone (**b**, **d**) or with (**c**) a pre- (1 h) and co-treatment with pooled kinase inhibitors (i), namely KU-55933 (ATMi), VE-821 (ATRi) and NU7026 (DNA-PKi) (20 μ M each). Then, cells were fixed in 3.7% PFA and indirectly immunolabeled with a primary mouse anti- γ H2AX (Abcam, ab26350) antibody and a secondary Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse antibody (**a–c**) or exposed only to the secondary antibody (**d**). **a–d** Whole nuclear images reconstructed in rapidSTORM 3.3. Bar: 3 μ m. Upper left insets: corresponding γ H2AX images for each nucleus by standard wide-field fluorescence microscopy. **e–h** Enlarged views (large

green boxes) from **a–d**. Bar: 1 μ m. **i** and **j** Enlarged views (small yellow boxes) from **a**, **b**. Bar: 300 nm. γ H2AX foci either from control or BLEO-treated nuclei were organized in nanoscopic substructures (**a**, **b**, **i**, **j**). BLEO-induced foci vanished when cells were exposed to H2AX kinase inhibitors (compare **b** to **c**). Besides, cells incubated with the γ H2AX primary antibody exhibited a dotted γ H2AX signal scattered throughout the nucleus (compare signals in **e–g** with signal in **h**). As expected, no signal was observed when immunolabeling was performed in absence of primary antibodies (**d**, **h**). **k** Experimental schedule. HeLa cells were pretreated for 1 h with 20 μ M of ATM, ATR and DNA-PK inhibitors and then co-exposed for 45 min to BLEO20 and the inhibitors before being fixed in 3.7% PFA. (Color figure online)

nucleus as long as cells were incubated with the anti- γ H2AX primary antibody (compare signals in Fig. 1e–g versus h).

To separately analyze the clustered γ H2AX signal inside γ H2AX foci (clustered nanofoci) and the scattered signal from the remnant nuclear areas, we first generated two images from each original localization file of control and BLEO20 nuclei by combining SR-Tesseler segmentation and a custom Python script based on the convex hull of the foci regions (see workflow on Fig. 2, and “Materials and methods” section). Even though we could successfully segment the areas of γ H2AX foci from the rest of the nucleus in SR-Tesseler (Fig. 2c), a halo of localizations surrounding each extracted focus persisted in the images devoid of foci (Fig. 2d). To address this issue, we extended the set of localizations to be extracted from these images (50 nm

of additional distance from the boundary of each convex hull) to incorporate them to their respective foci. The result was sets of pictures of control and BLEO20 nuclei having exclusively regions of γ H2AX foci (Fig. 2e) or the complementary non-foci areas (Fig. 2f).

As a result of the described processing, mean foci areas of 0.41 μ m² (BLEO20) and 0.19 μ m² (controls) were obtained. BLEO-induced foci presented a higher heterogeneity in size than endogenous foci, which mostly exhibited areas ≤ 0.3 μ m² (~88% from total number) (Supplemental Fig. 5). In BLEO20 nuclei a foci subpopulation (7.5%) presented areas > 1 μ m². A proportion of them could correspond to two foci partially overlapped, which could not be separated one from each other through the segmentation. Mean values are in line with previous reports [36,

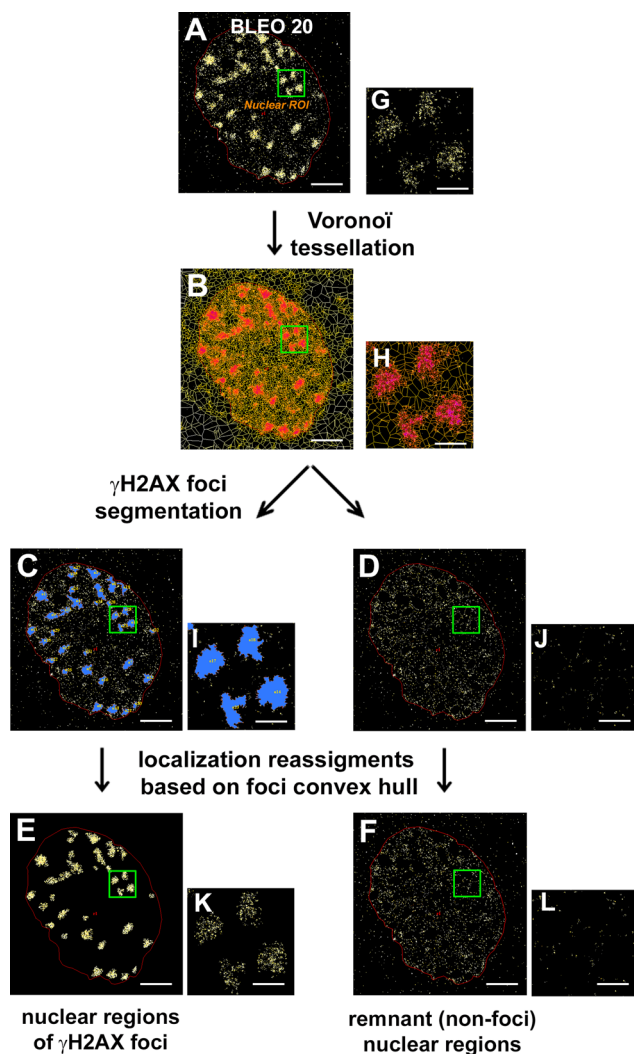


Fig. 2 Image segmentation of BLEO20 and control nuclei into (i) regions harboring γ H2AX foci and (ii) remnant (non-foci) regions. SR-Tesseler software was used to define the foci regions, and a custom Python script was implemented to filter out localizations based on the convex hull of the foci regions (see “Materials and methods” section). **a–f** Steps carried out to obtain two separate images from each original picture are exemplified in a BLEO20 nucleus. **a** Image from localizations file, **b** Voronoi tessellation, and **c** subsequent segmentation of γ H2AX foci regions (blue) from the entire nucleus in SR-Tesseler by setting $\alpha=1$ and minimum area= $0.025 \mu\text{m}^2$. **d** Resulting image with localizations belonging to γ H2AX foci (**c**) subtracted from image (**a**). A halo of points (localizations) surrounding each subtracted γ H2AX focus remained in the picture. To correct this, a convex hull was computed for each focus, with an additional border distance of 50 nm to filter out an extended set of localizations. With this procedure, the localizations belonging to halos were removed from (**d**) and reassigned to (**e**). The final result was a set of images only with γ H2AX foci regions (**e**) or the remnant non-foci nuclear regions (**f**). The nuclear ROI (r_1) is outlined by the red line. Bar: 3 μm . **g–l** Enlarged ($\times 4$) views (green boxes) from images **a–f**, respectively. Bar: 750 nm. (Color figure online)

46], which supports the approach of a refined foci segmentation by combining SR-Tesseler with a neighborhood distance parameter to include localizations from object surroundings.

BLEO-induced γ H2AX foci contained as average almost double nanofoci than endogenous control foci

Images of control and BLEO20 nuclei harboring only the segmented regions of γ H2AX foci (Fig. 3a, e) were used to quantify γ H2AX nanofoci inside each γ H2AX focus. A segmentation by SR-Tesseler in this set of images was implemented (Fig. 3b, f) to identify such smaller nuclear clusters in the context of a much bigger microscopic γ H2AX focus. Since in this case the localizations exhibited a spotted nuclear pattern of small and dense clusters, a high density factor threshold ($\alpha=20$) was needed to achieve a satisfactory nanofoci segmentation. Zoomed images (Fig. 3c, d, g, h) revealed that each focus was formed by individual nanofoci in a variable number.

Among individual control (Fig. 3j) or BLEO20 nuclei (Fig. 3k) the number of nanofoci per focus was independent from foci number per cell. The bigger γ H2AX foci in BLEO20 nuclei exhibited a similar density of nanofoci per focus than the endogenous foci in controls, and thus more nanofoci per focus (mean 22.7 in treated cells versus 13.2 in controls; Fig. 3l, m).

Nucleoplasm of control and BLEO-treated cells harbored scattered nanofoci outside γ H2AX foci, which were partially sensitive to kinase inhibitors

As previously mentioned, apart from nanofoci confined to γ H2AX foci in all conditions unclustered γ H2AX nanofoci spread throughout the nucleus were noticed. We selected the set of pictures comprising non-foci regions from control (Fig. 4a) and BLEO20 nuclei (Fig. 4b), the images corresponding to BLEO20 + 3i (inherently without γ H2AX foci) (Fig. 4c) and Ab control cells (Fig. 4d), and computed their average nanofoci number and density after SR-Tesseler segmentation.

A significant contribution of the secondary antibody to the γ H2AX signal was discarded since the amount of mark in Ab control cells was negligible (Fig. 4i). Control and BLEO20 nuclei exhibited similar densities of scattered γ H2AX nanofoci per nuclear section (~ 3 nanofoci/ μm^2), suggesting that they originated endogenously (unrelated to BLEO-induced DNA damage). In favor of the specificity of the signal, BLEO20 + 3i cells exhibited a 50% diminution of signal density when contrasted to cells exposed only to BLEO20. The estimated mean nanofoci diameter (~ 50 nm) was conserved among clustered and unclustered nanofoci in all conditions (Fig. 4m).

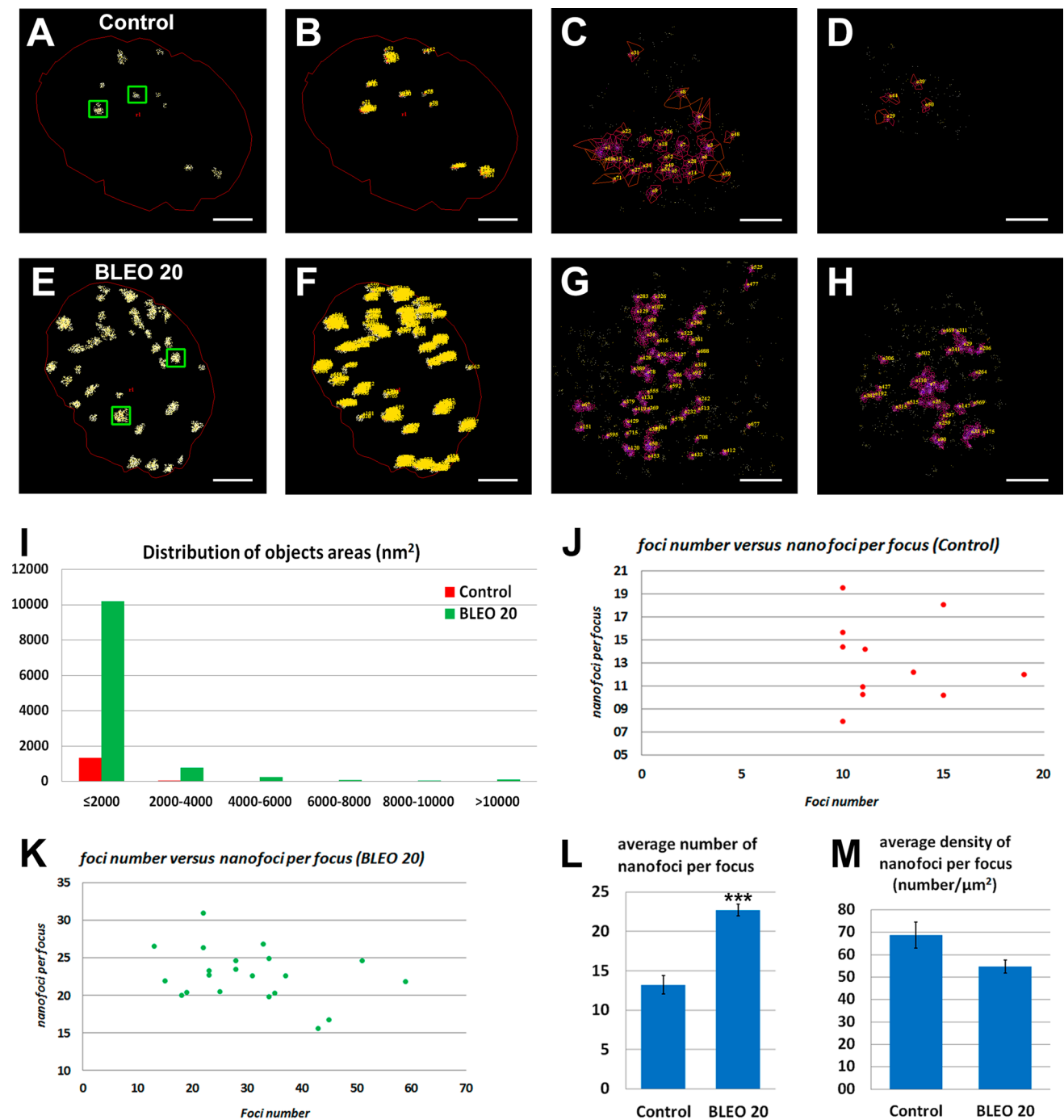


Fig. 3 Quantification of nanofoci confined to γ H2AX foci regions by SR-Tesseler. **a–d** Control and **e–h** BLEO20 nuclei images are shown. **a**, **e** Images of nuclei harboring only the segmented γ H2AX foci regions (Fig. 2). Nuclear ROI (r_1) are outlined by red lines. **b**, **f** Segmentation in SR-Tesseler of γ H2AX nanofoci from **a**, **e** by setting $\alpha=20$, cut distance=20 and minimum area=50 nm². **a**, **b**, **e**, **f** Bar: 3 μ m. **c**, **d**, **g**, **h** Enlarged views ($\times 16$) from green boxes indicated in **a** and **e**, respectively. Bar: 200 nm. Zoomed images show that each γ H2AX focus is formed by individual nanofoci in a variable number. **i–m** Altogether, $n=1392$ (control) and $n=11,471$ (BLEO20) segmented objects coming from $n=11$ (control) and $n=21$ (BLEO20) cells were analyzed (data from three independent experiments). **i** Histogram displaying the distribution of object areas (nm²) for control and BLEO20 nuclei. As discussed before (see “Materials and methods” section) segmented objects with areas between

50 and 2000 nm² were considered as single nanofoci, between 2000 and 4000 nm² as two (partially) fused nanofoci, and so on. As depicted in the histogram, most objects were single nanofoci in both cases (95% and 89% for BLEO20 and control nuclei, respectively). **j** and **k** Plots of foci number versus number of nanofoci per focus for each analyzed control (**j**) and BLEO20 (**k**) nucleus. As seen in the plots, no apparent correlation between these variables was observed either for control or BLEO20 nuclei (linear correlation coefficient values $r=0.0052$ and 0.0042 , respectively). **l** Number and **m** density (number/ μ m²) of nanofoci per γ H2AX focus (mean $\pm$ standard error) for control and BLEO20 nuclei. Although a higher mean number of nanofoci per focus was detected in BLEO20 compared to controls (22.7 versus 13.2; *** $p<0.001$; two-sample unpaired t -test), comparable average densities were found due to smaller mean areas of foci in controls. (Color figure online)

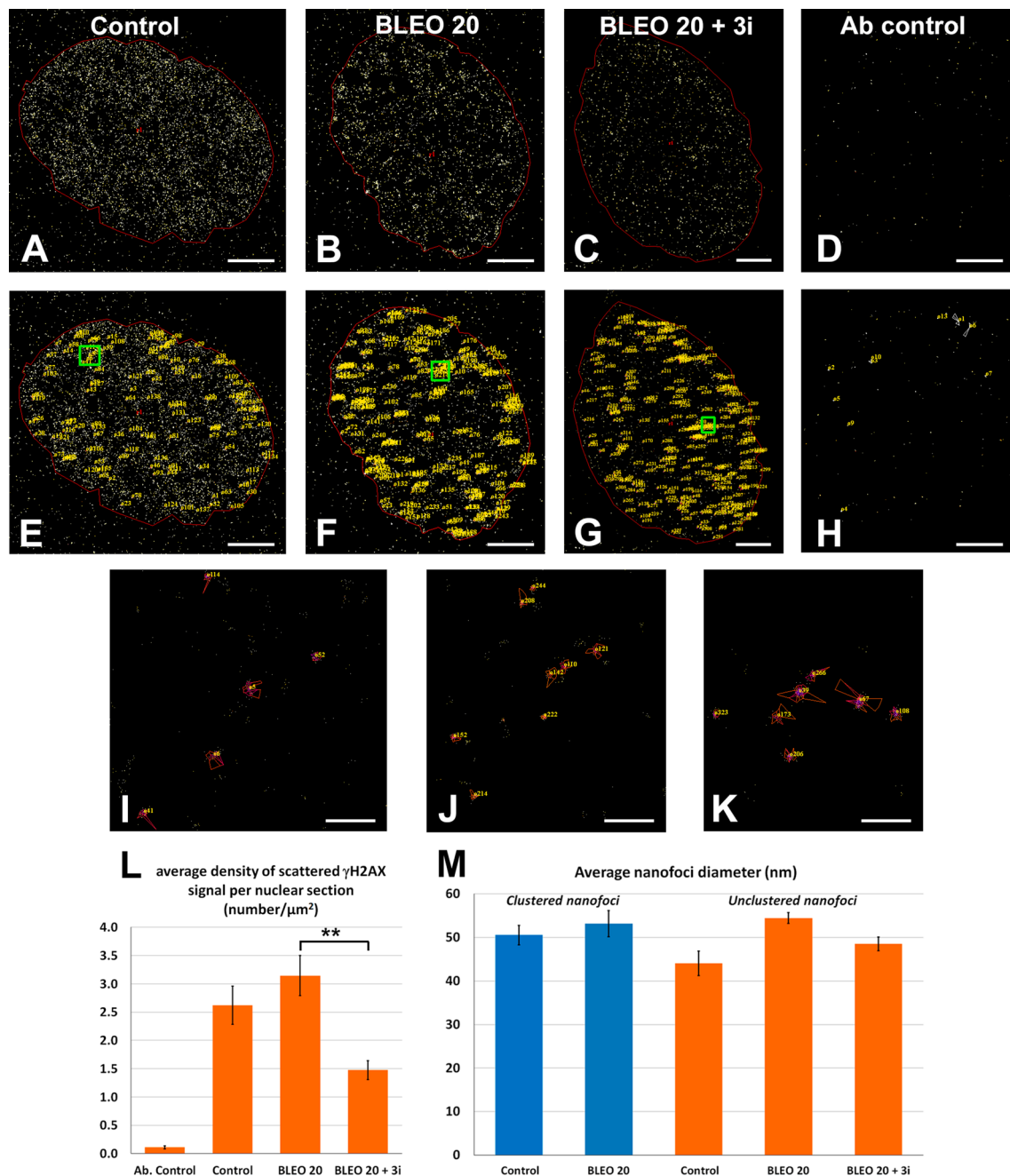


Fig. 4 Quantification of unclustered nanofoci in nuclear regions devoid of γ H2AX foci by SR-Tesseler. **a, e, i** Control, **b, f, j** BLEO20, **c, g, k** BLEO20+3i and **d, h** Ab control images are shown. **a** and **b** Images of nuclei with remnant (non-foci) regions from control and BLEO20 (Fig. 2). **c** and **d** images from the localization file of a BLEO20+3i and Ab control nuclei in SR-Tesseler. **e–h** Segmentation of scattered γ H2AX signal from **a–d** in SR-Tesseler by setting $\alpha=5$, cut distance=20 and minimum area=50 nm². **a–h** Bar: 3 μm . Nuclear ROI (r_1) are outlined by the red lines. **i–k** Enlarged views ($\times 16$) from green boxes indicated in **e–g**, respectively. Bar: 200 nm. **l** Density (number/ μm^2) of scattered γ H2AX signal per nuclear section (mean $\pm$ standard error) for control, BLEO20 and BLEO20+3i ($n=11$) cells. In total, $n=3405$ (control), $n=8060$ (BLEO20) and $n=2998$ segmented objects were analyzed. Since nuclear ROI cannot be precisely defined in Ab control ($n=8$) the average density for the whole image was considered (data from three independent experiments). A similar density of scat-

tered γ H2AX signal per nuclear section was found between control and BLEO20 nuclei. Conversely, BLEO20+3i cells exhibited a lower average density in comparison to cells exposed to BLEO20 (** $p<0.01$; one-way ANOVA with Bonferroni correction). Signal density in Ab control was negligible when contrasted to the samples incubated with the primary anti- γ H2AX antibody. **m** Estimated diameters (nm) of clustered (blue columns) and unclustered (orange columns) nanofoci (mean $\pm$ standard error) for control, BLEO20 and BLEO20+3i nuclei. First, nanofoci areas were calculated as γ H2AX foci areas, i.e. setting the parameter d and then applying the shoelace algorithm. Then, diameters were computed considering a circular-like shape of nanofoci. Estimated mean values ranged among ~ 44 nm (control, unclustered) and ~ 54 nm (BLEO20, unclustered). Nevertheless, differences in nanofoci diameters were not significant, neither among conditions ($p\geq 0.16$) nor when clustered nanofoci were compared against unclustered nanofoci within a given treatment ($p\geq 0.14$). (Color figure online)

Discussion

In the present work, we have demonstrated in HeLa cells that BLEO20-induced γ H2AX foci are organized as clusters of nanofoci. Compared to endogenous foci, the more abundant BLEO-induced foci are qualitatively similar (even using high BLEO doses, up to 160 μ g/mL) but quantitatively different, since they approximately duplicate endogenous foci in size and internal nanofoci number.

Endogenous γ H2AX foci are ascribed to DSB produced at stalled and collapsed replication forks [7], linked to alterations in the progression of the transcriptional machinery or the collision between the replication and the transcriptional complexes [8], and originated in nuclear regions implicated in 3D genome organization [9]. As already reported in various cell lines (including HeLa) and primary cultures endogenous γ H2AX foci present, on average, tinier mean sizes compared to DNA damage-associated foci [36, 46, 47]. By our novel segmentation approach, comparable results were obtained since DSB-related foci were twice bigger than endogenous foci in controls. In the case of BLEO-induced foci, a similar level of foci number was obtained in the 5–80 μ g/mL range, with an increase only after exposure to BLEO 160 μ g/mL. Previous results with the radiomimetic in CHO cells already had shown a non-linear relationship among foci number and BLEO doses [19]. Several factors could contribute to this overall result, namely the need for membrane transporters to enable the access of BLEO to the cells [48], a putative participation of the enzyme BLEO hydrolase, which could provide resistance to BLEO [49], and a differential cell sensitivity to the agent according to cell cycle phase (G1/G2 are more damage-prone than S cells) [50]. In addition, BLEO requires the presence of cofactors, oxygen and the reduced transition metals Fe(II) or Cu(I) [12, 51], to become the activated form capable of inducing DSB. In fact, it has been shown by Comet assay that BLEO produces a heterogeneous level of DNA damage in HeLa cells, highly variable from cell to cell, when compared to IR-induced damage [52]. In short, a larger number of nuclei per experimental condition should have been evaluated, had it been our objective to study BLEO dose–response in HeLa cells.

By dSTORM we confirmed in BLEO-treated cells other recent works which, thanks to the cutting-edge increase in resolution provided by nanoscopy, demonstrated that γ H2AX foci observed by conventional fluorescence microscopy own an internal organization consisting of smaller sub-structures (i.e. nanofoci). Individual bunches of clustered nanofoci have been argued to be the basic unit for DSB repair [23, 24]. As suggested by Lopez Perez et al. [24], individual nanofoci may indicate single

nucleosomes harboring γ H2AX, while their arrangement as clusters would represent the local chromatin structure required for DSB DNA repairing. In fact, each individual nanofocus corresponds to a chromatin loop, which is disposed into a higher-order structure of discontinuously phosphorylated chromatin, with a size comparable to that of clustered nanofoci [23]. The nanodomains are flanked by CTCF (CCCTC-binding factor), a transcriptional repressor implicated in the regulation of chromatin architecture [53].

We determined, on average, 13.2 and 22.7 nanofoci per focus in control and BLEO20 nuclei respectively, which entailed a comparable mean density per focus (~ 60 nanofoci/ μ m² per nuclear section) in both conditions. Sisario et al. [25] reported ~ 16 and ~ 20 nanofoci per focus in control and X-ray-irradiated glioblastoma cells, respectively. In addition, comparable diameters of clustered nanofoci were determined when estimated by our analysis approach (~ 52 nm versus ~ 45 nm in [25]). Moreover, Lopez Perez et al. [24] compared clustered versus scattered nanofoci diameters, reporting a larger diameter ($\sim 25\%$ increment) of clustered nanofoci both in controls and radiation-treated nuclei. We could not detect such a difference in our study. All things considered, even though image analysis methods varied among studies the quantitative results are strikingly close, pointing out to consistent results by SMLM.

Apart from clustered nanofoci confined to γ H2AX foci we also detected scattered nanofoci in the remnant nucleoplasm, both in control and BLEO20 cells. To our knowledge, the presence of such an all-over scattered nuclear signal has been solely studied by Lopez Perez et al. [24]. By carbon-ion irradiation they found an increment in the number of nanofoci not associated to foci regions (i.e. out of ion tracks). In our case, the scattered signal was analyzed separately by a novel custom methodology (summarized in Fig. 2). We concluded that unclustered γ H2AX nanofoci were equally present at low density, both in control and BLEO20 nuclei (~ 3 nanofoci/ μ m²). This finding would suggest an endogenous level of H2AX phosphorylation independent of DNA damage induction. Lopez Perez et al. [24] hypothesized that, albeit arguable, the increase from the endogenous level they determined could be attributed to isolated DSB induced by an indirect-derived radiation expanding from the ion tracks. In addition, they proposed the previously reported faint γ H2AX pan-nuclear staining due to ion irradiation [42], as a possible cause of nanofoci increment. In any case, such an effects are not expected on BLEO-treated cells, and hence to impact in the levels of scattered nanofoci.

A basal level of γ H2AX signal could respond to transient DSB, formed during endogenous DNA metabolism, which do not trigger an active DNA damage response (that is, microscopic γ H2AX foci induction). Unclustered nanofoci could, hence, represent a starting point of scarce local H2AX

phosphorylation on DNA for putative DSB repair units. Some hints in this line have been given employing methods of genome-wide DSB profiling. Thus, an enrichment of endogenous γ H2AX at loci susceptible to replication fork stalling and breakage has been found in yeast using ChIP-chip data [54]. Similarly, genome-wide localization sites of H2AX and γ H2AX, either endogenous or IR-induced, have been mapped in proliferating and resting human cells [55]. In replicating cells, endogenous γ H2AX-enriched regions covered sub-telomeres and active transcription start sites (TSS). In fact, H2AX itself, prior to phosphorylation, was specifically located in these spots. On the contrary, in resting cells an endogenous γ H2AX signal was not detectable. Cellular demand for DNA repair correlates with the potential to replicate, and hence, as proven [56], it is globally attenuated in terminally differentiated cells. Tumor cells undergo much more cell division cycles, and thus present a higher demand of response to DNA damage. So, endogenous γ H2AX-enriched regions in dividing cells could be indicating replication- and transcription-mediated stress due to their rapid cell division cycles. The pattern of well-distributed scattered γ H2AX nanofoci detected in HeLa, a tumor-derived cell line, could reflect a required level of endogenous γ H2AX in order to provide protection against a potential high level of transient DSB. Interestingly, Seo et al. [55] verified a spread from the active TSS into the gene body after irradiation, a process compatible with the later emergence of microscopic γ H2AX foci. Finally, it cannot be discarded that unclustered nanofoci indicate either another type of DNA lesion (and not DSB) or even a distinct γ H2AX role, unlinked to DDR, as those already reviewed [57].

Here, as a novel contribution, we evaluated by SMLM (dSTORM) the occurrence of γ H2AX nanofoci in cells challenged with specific inhibitors of canonical H2AX kinases (i.e. ATM, ATR and DNA-PK). Although recent works have studied γ H2AX nanofoci in a very comprehensive way [21–25, 58], to our knowledge this is the first time in which nanofoci were investigated after a deliberate attempt to inhibit H2AX phosphorylation. In this regard, we could confirm the specificity of the γ H2AX mark reconstructed from SMLM data since BLEO-induced foci completely disappeared from dSTORM images when cells were simultaneously exposed to ATM, ATR and DNA-PK inhibitors. This finding was as expected, since it fits the positive activation loop of H2AX kinases [59]. In turn, under these conditions, the γ H2AX scattered mark did not completely fade out but diminished in nuclear density ($\sim 50\%$). This might respond to several, non-exclusive factors. First, although the concentrations (20 μ M) of KU-55933, VE-821 and NU7026 that we used to inhibit ATM, ATR and DNA-PK were well above their IC_{50} values (12.9 nM, 13 nM and 230 nM in cell-free assays, respectively), and no foci were detected in their

presence, it cannot be discarded that the 1 h pretreatment was not enough to achieve a complete inhibition of the target kinases, or that the half-life of pre-existent scattered nanofoci was longer than 1 h. We assayed a longer pretreatment with the pooled inhibitors (24 h) before BLEO-exposure but it resulted in a significant cytotoxicity, revealed by a very low cellular density and a considerable proportion ($\sim 75\%$) of (apoptotic) pan-nuclear γ H2AX cells (data not shown). Second, the action of other kinases able to phosphorylate H2AX at Ser139 could explain the remnant γ H2AX signal. While the activation of MAPK family members p38 and Mst-1 has been reported only in apoptotic contexts [44, 45], a newly described chromatin kinase termed VRK1 has been proved to phosphorylate H2AX to γ H2AX in response to DNA damage induced by γ -rays [60]. Importantly, even in basal conditions VRK1 directly interacts with H2AX, which raises the possibility of a specific VRK1 role in endogenous H2AX phosphorylation. In addition, VRK1 impact on H2AX was unaffected by KU-55933 and caffeine (a general PI3K inhibitor). In the same line, if scattered nanofoci allude to DNA lesions aside from DSB, unknown H2AX kinases might play a role in their phosphorylation. Third, a nonspecific labeling of γ H2AX primary antibody to other nuclear structures apart from γ H2AX cannot be formally discarded, although it seems very unlikely since unclustered nanofoci have been observed by others [23, 24]. Last but not least, while γ H2AX can be dephosphorylated in situ by PP2A [61] and PP4 [62], a significant fraction of γ H2AX could be released from chromatin by exchange with unphosphorylated H2AX, as revealed by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments using GFP-H2AX [63]. Thereby, γ H2AX dephosphorylation can also occur in the nucleoplasm, far away from the corresponding DSB lesion site. In this context, the residual γ H2AX signal could point out to persistent γ H2AX already dissociated from damaged chromatin.

It is worth mentioning that in all conditions we observed the presence of γ H2AX signals outside the nuclear region, presumably in cytoplasmic areas (Supplemental Fig. 6). To date, the appearance of γ H2AX in the cytoplasm has been only described in association to tropomyosin-related kinase A (TrkA)/JNK1-induced cell death in U2OS cells independently from DNA damage induction [64]. Since external cytoplasm boundaries could not be precisely defined in the images, we were not able to calculate and compare signal densities between experimental conditions. Further research would be needed to find out whether the cytoplasmic signal we detected does correspond or not to cytoplasmic γ H2AX.

In conclusion, untreated HeLa cells harbored scattered γ H2AX nanofoci as well as clustered nanofoci confined to a few microscopic γ H2AX foci. After exposure to BLEO, γ H2AX foci increased in number and size but

their nano-organization was comparable to those found in untreated cells. The level of scattered γ H2AX nanofoci remained unchanged, pointing to an endogenous generation. A pool of specific H2AX kinase inhibitors erased BLEO-induced clustered nanofoci but only partially the endogenous scattered nanofoci, which opens the door to consider the putative role of a recently described H2AX kinase (VRK1) in the formation of γ H2AX nanofoci.

In recent years, super-resolution microscopy has revealed previously undisclosed protein distribution patterns and nanostructural features, not detectable by conventional microscopy. Of note, these new findings ask for consistent analytical tools to process and analyze signals at the nanoscale level. Here, we provide a novel approach to address cluster analysis from SMLM data. It could be particularly useful when dealing with clusters of very dissimilar densities, such as scattered nanofoci coexisting with clustered nanofoci organized in microscopic foci.

Acknowledgements We wish to express our gratitude to Markus Sauer for the invitation to perform dSTORM experiments at the Department of Biotechnology and Biophysics (University of Würzburg) as well as to Pablo Mateos-Gil, Sebastian Letschert and Fabian Zwettler for training and advice in dSTORM methodology (PL). We are also indebted to ANII (National Agency for Research and Innovation, Uruguay) for PhD Scholarship (POS_NAC_2014_1_102214) to PL as well as research support to LL-H and GF, and to PEDECIBA (Program for the Development of Basic Sciences, Uruguay). Research in SCIAN-Lab is funded by the Chilean Millennium Scientific Initiative P09-015-F to IC, JJ-W, SH; FONDECYT 11170475 to IC; FONDECYT 1181823 to IC, SH; FONDECYT 1161274, FONDECYT Ring Initiative ACT-1402, DAAD 57220037 and 57168868, CORFO 16CTTS-66390 to SH; CONICYT PhD Scholarship to JJ-W.

Author contributions PL: conceived and designed studies, performed research, analyzed data and wrote the draft manuscript. JJ-W co-wrote data analysis section in Materials and Methods and revised the manuscript. JJ-W, IC and SH developed the scripts for processing the SR-Tesseler files and contributed to data analysis. LL-H: contributed to design experiments, data interpretation and revised the manuscript. GF: revised the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Rogakou E, Pilch D, Orr A, Ivanova V, Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858–5868
- Ward I, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276:47759–47762
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Lliakis G (2008) γ H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36:5678–5694
- Rogakou E, Boon C, Redon C, Bonner W (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* 146:905–915
- Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio M, Fernandez-Capetillo O, Pilch D, Sedelnikova O, Eckhaus M, Ried T, Bonner W, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675–679
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071–1078
- Gelot C, Magdalou I, Lopez BS (2015) Replication stress in mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes* 6:267–298
- Vitelli V, Galbiati A, Iannelli F, Pessina F, Sharma S, d'Adda di Fagagna F (2017) Recent advancements in DNA damage-transcription crosstalk and high-resolution mapping of DNA Breaks. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 18:87–113
- Bouwman B, Crosetto N (2018) Endogenous DNA double-strand breaks during DNA transactions: emerging insights and methods for genome-wide profiling. *Genes (Basel)* 9:E632
- Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A (2000) Response to RAG-mediated V(D)J cleavage by NBS1 and γ -H2AX. *Science* 290:1962–1965
- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y (1966) New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 19:200–209
- Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: toward better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102–112
- Henner WD, Grunberg SM, Haseltine WA (1982) Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *J Biol Chem* 257:11750–11754
- Oike T, Niimi A, Okonogi N, Murata K, Matsumura A, Noda SE, Kobayashi D, Iwanaga M, Tsuchida K, Kanai T, Ohno T, Shibata A, Nakano T (2016) Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy. *Sci Rep* 6:22275
- Regulus P, Duroux B, Bayle PA, Favier A, Cadet J, Ravanat JL (2007) Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14032–14037
- Mavragani IV, Nikitaki Z, Souli MP, Aziz A, Newsheer S, Aziz K, Rogakou E, Georgakilas AG (2017) Complex DNA damage: a route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. *Cancers (Basel)* 9:91. <https://doi.org/10.3390/cancers9070091>
- Schlipler A, Iliakis G (2013) DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res* 41:7589–7605
- Nickoloff JA, Sharma N, Taylor L (2020) Clustered DNA double-strand breaks: biological effects and relevance to cancer radiotherapy. *Genes (Basel)* 11(1):99
- Liddle P, Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Reyes-Ábalos AL, Jara J, Cerda M, Härtel S, Folle GA (2014) Bleomycin-induced γ H2AX foci map preferentially to replicating domains in CHO9 interphase nuclei. *Chromosome Res* 22:463–481
- Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190:165–175
- Reindl J, Drexler GA, Girst S, Greubel C, Siebenwirth C, Drexler SE, Dollinger G, Friedl AA (2015) Nanoscopic exclusion between Rad51 and 53BP1 after ion irradiation in human HeLa cells. *Phys Biol* 12:066005
- Reindl J, Girst S, Walsh DW, Greubel C, Schwarz B, Siebenwirth C, Drexler GA, Friedl AA, Dollinger G (2017) Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced γ H2AX, 53BP1 and Rad51 foci. *Sci Rep* 7:40616

23. Natale F, Rapp A, Yu W, Maiser A, Harz H, Scholl A, Grulich S, Anton T, Hörl D, Chen W, Durante M, Taucher-Scholz G, Leonhardt H, Cardoso MC (2017) Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. *Nat Commun* 8:15760
24. Lopez Perez R, Best G, Nicolay NH, Greubel C, Rossberger S, Reindl J, Dollinger G, Weber KJ, Cremer C, Huber PE (2016) Superresolution light microscopy shows nanostructure of carbon ion radiation-induced DNA double-strand break repair foci. *FASEB J* 30:2767–2776
25. Sisario D, Memmel S, Doose S, Neubauer J, Zimmermann H, Flentje M, Djuzenova CS, Sauer M, Sukhorukov V (2018) Nanostructure of DNA repair foci revealed by superresolution microscopy. *FASEB J* 32:6469–6477
26. Mladenov E, Kalev P, Anachkova B (2009) The complexity of double-strand break ends is a factor in the repair pathway choice. *Radiat Res* 171:397–404
27. Sheen MR, Kim SW, Jung JY, Ahn JY, Rhee JG, Kwon HM, Woo SK (2006) Mre11-Rad50-Nbs1 complex is activated by hypertonicity. *Am J Physiol Ren Physiol* 291:F1014–F1020
28. van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidebreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* 6:991–1009
29. Wolter S, Löschberger A, Holm T, Aufmkolk S, Devauballe MC, van de Linde S, Sauer M (2012) rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat Methods* 9:1040–1041
30. Levet F, Hosy E, Kechkar A, Butler C, Beghin A, Choquet D, Sibarita JB (2015) SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat Methods* 12:1065–1071
31. Aurenhammer F (1991) Voronoi diagrams—a survey of a fundamental geometric data structure. *ACM Comput Surv* 23:345–405
32. Chamma I, Levet F, Sibarita JB, Sainlos M, Thoumine O (2016) Nanoscale organization of synaptic adhesion proteins revealed by single-molecule localization microscopy. *Neurophotonics* 3:041810. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.4.041810>
33. Hadipour-Lakmehsari S, Driouchi A, Lee SH, Kuzmanov U, Callaghan NI, Heximer SP, Simmons CA, Yip CM, Gramolini AO (2019) Nanoscale reorganization of sarcoplasmic reticulum in pressure-overload cardiac hypertrophy visualized by dSTORM. *Sci Rep* 9:7867. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44331-y>
34. Martinière A, Fiche JB, Smokvarská M, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C (2019) Osmotic stress activates two reactive oxygen species pathways with distinct effects on protein nanodomains and diffusion. *Plant Physiol* 179:1581–1593
35. Pereira PM, Albrecht D, Culley S, Jacobs C, Marsh M, Mercer J, Henriques R (2019) Fix your membrane receptor imaging: actin cytoskeleton and CD4 membrane organization disruption by chemical fixation. *Front Immunol* 10:675. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00675>
36. Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B (2010) Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat Res* 704:78–87
37. de Berg M, van Kreveld M, van Overmars M, Schwarzkopf O (2000) Computational geometry: algorithms and applications. Springer, Berlin, pp 2–8
38. Braden B (1986) The surveyor's area formula. *Coll Math J* 17:326–337
39. Burma S, Chen B, Murphy M, Kurimasa A, Chen D (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462–42467
40. Solier S, Sordet O, Kohn KW, Pommier Y (2009) Death receptor-induced activation of the chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathway. *Mol Cell Biol* 29:68–82
41. de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver JE (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gamma-H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6870–6875. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002175107>
42. Meyer B, Voss KO, Tobias F, Jakob B, Durante M, Taucher-Scholz G (2013) Clustered DNA damage induces pannuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic Acids Res* 41:6109–6118
43. Mungunsukh O, Griffin AJ, Lee YH, Day RM (2010) Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298:L696–L703
44. Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG (2009) Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 458:591–596
45. Dong Y, Xiong M, Duan L, Liu Z, Niu T, Luo Y, Wu X, Xu C, Lu C (2014) H2AX phosphorylation regulated by p38 is involved in Bim expression and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells induced by imatinib. *Apoptosis* 19:1281–1292
46. Costes SV, Boisière A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH (2006) Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat Res* 165:505–515
47. McManus KJ, Hendzel MJ (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013–5025
48. Pron G, Mahrour N, Orłowski S, Tounekti O, Poddevin B, Belehadek J Jr, Mir LM (1999) Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochem Pharmacol* 57:45–56
49. Chen J, Chen Y, He Q (2012) Action of bleomycin is affected by bleomycin hydrolase but not by caveolin-1. *Int J Oncol* 41:2245–2252
50. Olive PL, Banath JP (1993) Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵Ird. *Int J Radiat Biol* 64:349–358
51. Burger RM, Peisach J, Horwitz SB (1981) Activated bleomycin: a transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem* 256:11636–11644
52. Grigaravicius P, Rapp A, Greulich KO (2009) A direct view by immunofluorescent comet assay (IFCA) of DNA damage induced by nicking and cutting enzymes, ionizing ¹³⁷Cs radiation, UV-A laser microbeam irradiation and the radiomimetic drug bleomycin. *Mutagenesis* 24:191–197
53. Phillips JE, Corces VG (2009) CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137:1194–1211
54. Szilard RK, Jacques PE, Laramée L, Cheng B, Galicia S, Bataille AR, Yeung M, Mendez M, Bergeron M, Robert F et al (2010) Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of gamma-H2AX. *Nat Struct Mol Biol* 17:299–305
55. Seo J, Kim SC, Lee HS, Kim JK, Shon HJ, Salleh NL, Desai KV, Lee JH, Kang ES, Kim JS, Choi JK (2012) Genome-wide profiles of H2AX and γ-H2AX differentiate endogenous and exogenous DNA damage hotspots in human cells. *Nucleic Acid Res* 40:5965–5974
56. Nospikel T, Hanawalt PC (2002) DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair* 1:59–75
57. Turinetti V, Giachino C (2015) Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 43:2489–2498
58. Hausmann M, Wagner E, Lee JH, Schrock G, Schaufler W, Krufczik M, Papenfuß F, Port M, Bestvater F, Scherthan H (2018) Super-resolution localization microscopy of radiation-induced

- histone H2AX-phosphorylation in relation to H3K9-trimethylation in HeLa cells. *Nanoscale* 10:4320–4331
59. Blackford AN, Jackson SP (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol Cell* 66:801–817
60. Salzano M, Sanz-García M, Monsalve DM, Moura DS, Lazo PA (2015) VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics* 10:373–383
61. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20:801–809
62. Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9:1019–1026
63. Svetlova M, Solovjeva L, Nishi K, Nazarov I, Siino J, Tomilin N (2007) Elimination of radiation-induced gamma-H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. *Biochem Biophys Res Commun* 358:650–654
64. Jung EJ, Kim CW, Kim DR (2008) Cytosolic accumulation of gammaH2AX is associated with tropomyosin-related kinase A-induced cell death in U2OS cells. *Exp Mol Med* 40:276–285

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.