

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**TESIS DOCTORAL**

**LA FOSFORILACIÓN Y LA SUMOILACIÓN  
EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA  
Y SU PAPEL EN LA PROTECCIÓN FRENTE AL  
ENVEJECIMIENTO Y EL CÁNCER**

**PAULA GUTIÉRREZ MARTÍNEZ**

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, septiembre 2010

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Óscar Fernández-Capetillo, en el laboratorio de Inestabilidad Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas y fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (beca FPI).

A mi abuelo, Manuel Gutiérrez Rodríguez,  
porque no llegó a ver esta tesis  
pero se la imaginó un millón de veces.

Siempre estarás conmigo.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. El daño en el DNA.....</b>	<b>7</b>
1. 1. Fuentes y tipos de daños en el DNA .....	7
1. 2. La respuesta al daño en el DNA.....	10
1. 3. Iniciación de la señal: las PIKKs.....	11
1. 3. 1. DNA PKcs .....	13
1. 3. 2. ATM .....	13
1. 3. 3. ATR .....	14
1. 3. 4. Cooperación entre ATM, ATR y DNA-PK.....	16
1.4. Amplificación de la señal.....	17
<b>2. Efectos de la DDR .....</b>	<b>19</b>
2. 1. Reparación.....	19
2. 2. Parada del ciclo celular .....	23
2. 2. 1. <i>Checkpoint</i> G1/S.....	24
2. 2. 2. Parada intra-S .....	25
2. 2. 3. <i>Checkpoint</i> G2/M.....	25
2. 3. Senescencia, apoptosis y diferenciación.....	26
<b>3. El estrés replicativo y sus consecuencias .....</b>	<b>28</b>
3. 1. ATR y el envejecimiento .....	28
3. 2. La relación entre Chk1 y la microcefalia.....	30
3. 3. El cáncer .....	31
<b>4. La señalización más allá de la fosforilación .....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Biología Molecular y Celular.....</b>	<b>43</b>
1. 1. Anticuerpos utilizados .....	43
1. 2. Clonaje con la tecnología Gateway.....	43
1. 3. Ensayo de supervivencia .....	43
1. 4. Expresión y purificación de proteínas .....	44
1. 5. Fijación e inmunotinción de células .....	44
1. 5. 1. Fijación convencional .....	44

1. 5. 2. Fijación con preextracción .....	45
1. 5. 3. Fijación y tinción de mórulas .....	45
1. 6. FISH (Hibridación in situ Fluorescente) .....	46
1. 7. Genotipado de los embriones Mms21 KO mediante <i>nested PCR</i> .....	46
1. 8. Identificación del punto de integración del vector Súper Chk1 .....	47
1. 9. Medida de la proliferación por incorporación de BrdU .....	48
1. 10. Medida del <i>checkpoint</i> G2/M .....	48
1. 11. Microscopía de alto rendimiento .....	49
1. 12. Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales .....	50
1. 13. Purificación de anticuerpos de suero .....	50
1. 14. SCE (intercambio de cromátidas hermanas).....	50
1. 15. <i>Southern Blot</i> (Mms21 KI) .....	51
1. 16. Tinción de espermatozoides.....	52
1. 17. <i>Western blot</i> .....	53
<b>2. Células .....</b>	<b>53</b>
2. 1. Transfecciones con siRNA y tratamientos.....	54
2. 2. Generación de MEF (fibroblastos embrionarios murinos) .....	54
2. 3. Extracción de linfocitos B del bazo .....	54
2. 4. Curva de proliferación .....	55
2. 5. Purificación de espermatozoides .....	55
2. 6. Extracción de mórulas.....	56
<b>3. Ratones.....</b>	<b>56</b>
3. 1. Generación del modelo Súper Chk1 .....	56
3. 2. Generación del modelo Mms21 KO.....	57
3. 3. Generación del modelo Mms21 KI.....	57
3. 4. Mantenimiento y genotipado de los ratones .....	58
3. 4. 1. Súper Chk1 .....	59
3. 4. 2. ATR Seckel.....	59
3. 4. 3. ATM KO .....	59
3. 4. 4. Mms21 KO.....	60
3. 4. 5. Mms21 KI.....	60
3. 5. Análisis de imágenes corporales.....	60
3. 6. Análisis de supervivencia .....	61
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Generación de un modelo de ganancia de función de la DDR: Súper Chk1.....</b>	<b>65</b>
1. 1. Generación del modelo murino Súper Chk1 .....	66

1. 1. 1. Diseño de la estrategia .....	67
<b>1. 2. Caracterización del modelo murino Súper Chk1 .....</b>	<b>68</b>
1. 2. 1. Descripción del lugar de integración .....	69
1. 2. 2. Caracterización a nivel celular.....	71
1. 2. 3. Caracterización a nivel de organismo .....	74
<b>1. 3. Efecto de un incremento en los niveles de Chk1 en modelos de daño en el DNA:</b>	
<b>estrés replicativo (ATR Seckel) y DSB (ATM KO).....</b>	<b>75</b>
1. 3. 1. Súper Chk1 en un fondo genético asociado a envejecimiento: ATR Seckel.....	76
1. 3. 2. Súper Chk1 en un fondo genético no asociado a estrés replicativo: ATM KO .....	80
<b>2. Estudio del papel fisiológico de la ruta mediada por la SUMO ligasa Mms21. 83</b>	
<b>2. 1. Estudios preliminares en células humanas .....</b>	<b>84</b>
2. 1. 1. Generación de un anticuerpo contra Mms21.....	84
2. 1. 2. Estudio de la expresión de Mms21 en líneas humanas establecidas.....	86
<b>2. 2. Estudios preliminares en ratones.....</b>	<b>89</b>
2. 2. 1. Estudio de la expresión de Mms21 en tejidos.....	89
2. 2. 2. Estudio de la expresión de Mms21 en células.....	92
<b>2. 3. Generación de modelos murinos.....</b>	<b>98</b>
2. 3. 1. Mms21 KO.....	98
2. 3. 1. 1. Caracterización del lugar de integración del gen trap en el locus Mms21 .....	99
2. 3. 1. 2. Mms21 es esencial para el desarrollo embrionario murino.....	101
2. 3. 1. 3. Caracterización de células Mms21 heterocigotas .....	104
2. 3. 1. 4. Mms21 y cáncer.....	110
2. 3. 2. Mms21 KI.....	113
2. 3. 2. 2. Caracterización preliminar de células Mms21 SD.....	116
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>121</b>
<b>1. La DDR y el envejecimiento .....</b>	<b>121</b>
1. 1. Súper Chk1.....	121
1. 2. El efecto de una dosis extra de Chk1 a nivel celular.....	123
1. 3. El efecto de una dosis extra en la respuesta al estrés replicativo .....	124
1. 3. 1. El envejecimiento .....	124
1. 3. 2. La microcefalia .....	125
1. 4. Chk1 y la transformación.....	127
1. 5. El efecto de una dosis extra en la reparación.....	129
<b>2. La DDR y el cáncer.....</b>	<b>130</b>
2. 1. Las respuestas alternativas .....	130
2. 1. 1. El complejo Smc 5/6 y la estabilidad genómica .....	131
2. 2. La expresión de Mms21 se asocia a Brca1 .....	132
2. 3. Mms21 protege de la inestabilidad genómica a nivel celular.....	133
2. 3. 1. Estudios realizados en células humanas.....	133
2. 3. 2. Estudios realizados en células murinas .....	134
2. 4. Mms21 protege de la inestabilidad genómica a nivel de organismo.....	135

2. 4. 1. Mms21 es un gen esencial .....	136
2. 4. 2. Mms21 es un gen haploinsuficiente (para la supresión tumoral) .....	136
2. 4. 3. Mms21 en tumores humanos .....	137
2. 4. 4. Mms21 y la recombinación .....	141
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>151</b>

## ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

aa:	aminoácido
ALT:	mecanismo de elongación de telómeros basado en la recombinación, <i>Alternative Lengthing of Telomeres</i>
AT:	células procedente de pacientes aquejados de Ataxia Telangetasia
BAC:	cromosoma artificial de bacteria, <i>bacterial artificial chromosome</i>
bp:	par de bases, <i>base pair</i>
BrcaX:	subgrupo de pacientes predispuestos a desarrollar cáncer de mama y ovario familiar sin mutaciones en los genes Brca1 y Brca2
BS:	células procedente de pacientes aquejados del Síndrome de Bloom
<i>Checkpoint:</i>	punto de control de ciclo celular, G1/S, S y G2/M
cr.:	cromosoma
CSR:	cambio de isotipo de inmunoglobulina
DAPI:	4', 6-Diamidino-2-fenilindol, agente intercalante del DNA utilizado para inmunofluorescencias
DNA y ssDNA:	ácido desoxirribonucleico y DNA de cadena sencilla
DDR:	respuesta a daño en el DNA, <i>DNA damage response</i>
DSB:	rotura de doble cadena, <i>Double Strand Break</i>
ES:	célula troncal embrionaria, <i>embryonic stem cell</i>
G0, G1 y G2:	fases del ciclo celular, <i>Gap1y Gap2</i> , y de ahí G0
<i>Genetrap:</i>	vector con un aceptor de <i>splicing</i> y un gen de selección poliadenilado que provoca la interrupción de la transcripción del gen en el que está insertado.
Gy:	Grey
H3P:	Histona 3 fosforilada
HR:	recombinación homóloga
HU:	Hidroxiurea
IRIF:	focos inducidos por irradiación, <i>Irradiation induced focio</i>
iPARP e iP:	inhibidor de la enzima PARP
IR:	irradiación (en Gy)
Kb:	kilobase
KO o -/-:	alelo de pérdida de función, <i>knock-out</i>
KI:	alelo mutado, <i>knock-in</i>
M:	fase del ciclo celular, fase de mitosis
MEF:	fibroblasto embrionario murino, <i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MMR:	sistema de reparación, <i>mismatch repair</i>
MMS:	metil metano sulfonato, agente alquilante



## Abreviaturas

NHEJ:	<i>Non Homologous End Joining</i>
P:	referente a proteínas, forma fosforilada. Por ejemplo, Chk1 P
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa, <i>polymerase chain reaction</i>
RNA, siRNA y mRNA:	Ácido ribonucleico, <i>short interferenceRNA</i> y RNA mensajero
S:	fase del ciclo celular, fase de síntesis
SCE:	<i>Sister Chromatid Exchange</i>
SD:	SUMO DEAD, referido a Mms21, alelo y proteína con las mutaciones que lo hacen catalíticamente inactivo
<i>Splicing</i> :	proceso de maduración del mRNA durante el cual se eliminan de los intrones
SV40:	forma completa del antígeno T del virus SV40, utilizado para inmortalizar células ya que inactiva las rutas de Rb y p53
V(D)J:	recombinación entre los fragmentos V, D y J durante la maduración de linfocitos
WT o +/+:	silvestre, <i>wild type</i>
+/-:	Heterocigoto

## **ABSTRACT**

During lifetime, DNA encounters many types of damage, both from endogenous and exogenous sources. Most lesions are detected and repaired without compromising the life of the cells. However, there are special types of damage that constitute a threat to the integrity of the genome. Double strand breaks (DSB) are the most deleterious lesions that DNA can suffer. On one hand, broken DNA is a potential source of mutations and chromosomal rearrangements, which can lead to the development of cancer. On the other hand, and if the amount of damage is over a certain threshold, cells can activate apoptotic and/or senescence programs, which can compromise the regenerative ability of tissues and lead to ageing related pathologies. So, the integrity of the genome is a crucial event in the life of every cell. However, unlike proteins and other “life molecules”, DNA is not replaced. Thus, proper detection of DNA damage, precise signaling and potent repair machineries are needed. The response that cells establish upon DNA damage is what we call the DNA Damage Response (DDR). Protein kinases such as ATM and ATR are key activators of this transduction pathway. Despite their differences, both share the same objective: start a phosphorylation cascade in order to establish the G1/S, intraS and G2/M checkpoints, which allow the cell time for repair. However, there is evidence that transduction cascades besides phosphorylation are also triggered by the lesion. Accordingly, it is becoming increasingly clear that other posttranslational modifications are crucial for proper maintenance of genomic integrity. Using different mouse models and approaches, we have investigated the role of two signaling pathways –phosphorylation and SUMOylation- in the maintenance of genomic integrity. Regarding phosphorylation, we have studied the role of Chk1, ATR’s main effector kinase, in the response to replicative stress (RS), a poorly understood type of damage that arises from every replication. Regarding SUMOylation, we have studied the role of a novel E3 SUMO ligase known as Mms21 which was thought to be involved in homologous recombination (HR) repair, but which was completely unexplored in mammalian systems. Briefly, we have demonstrated that a third copy of the Chk1 gene can protect from the ageing caused by RS in a mouse model of the Seckel Syndrome. In addition, we present the first evidence to show that the genome protection provided by the Mms21/Smc5/Smc6 complex protects from tumor development in mammals. Altogether, this work offer novel insights about how the signaling of DNA damage –by phosphorylation or SUMOylation- impacts of the onset of ageing and/or cancer.

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## 1. El daño en el DNA

El material genético está expuesto a continuas agresiones que provocan numerosas lesiones, a las que cada célula debe enfrentarse. Las lesiones en el ADN (en adelante DNA) se han relacionado con numerosos aspectos de la fisiología humana. Por un lado, estas lesiones pueden alterar diversos aspectos de la homeostasis celular, lo cual puede desembocar en la transformación celular y el desarrollo de cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000). Por otro lado, el daño en el DNA también se ha relacionado con la pérdida de la capacidad regenerativa de los tejidos por reducción de la tasa proliferativa de las células que los componen, cuya consecuencia es el envejecimiento de los organismos (Garinis et al., 2008; Lombard et al., 2005). Es decir, podemos entender el cáncer y el envejecimiento como dos caras de una misma moneda, que es la desregulación del mantenimiento de la integridad genómica. Por último, el daño en el DNA también se ha relacionado con enfermedades tan dispares como las inmunodeficiencias, la neurodegeneración o la esterilidad. Curiosamente, tampoco podemos entender la evolución sin el daño en el DNA ya que estas lesiones son fuente de variaciones (Stamatoyannopoulos et al., 2009b). A pesar de todo esto, una de las principales características del DNA es su inmutabilidad a lo largo de las generaciones de cada especie. Y ello teniendo en cuenta que los cromosomas no se reemplazan, como es el caso de otros componente celulares como las proteínas. Esto es así gracias a un complejo sistema de detección, señalización y reparación del daño en el DNA.

### 1. 1. Fuentes y tipos de daños en el DNA

Existen varios tipos de lesiones, desde las mutaciones puntuales sin consecuencias (neutras) hasta las translocaciones de cromosomas. Las lesiones puede tener diferentes causas, las cuales solemos clasificar en fuentes exógenas y endógenas (**figura 1**). Entre las primeras se encuentran las radiaciones, como son los rayos X, los rayos gamma ( $\gamma$ ) y la radiación electromagnética. Todas ellas pueden generar directamente rupturas en una o en ambas cadenas del DNA, así como también especies reactivas de oxígeno que a su vez generan rupturas en las cadenas del DNA. Otro tipo de radiación es la ultravioleta (UV), mucho menos poderosa pero muy presente en nuestro entorno. A pesar de que la capa de ozono de la atmósfera bloquea la mayoría de los rayos UV, muchos de ellos la traspasan e

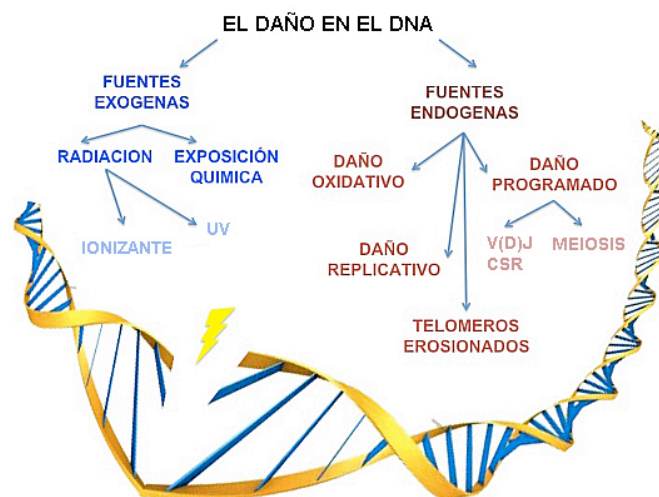
inciden en nuestra piel, generando dímeros de pirimidinas (Jiang et al., 2009) altamente estables y mutagénicos. Otra fuente exógena de daño en el DNA la componen los carcinógenos ambientales, entre los que se encuentran las drogas que utilizamos en quimioterapia. Se utilizan agentes que dañan el DNA (tanto drogas como irradiación) en la lucha contra el cáncer para que las células dañadas activen las rutas de apoptosis o senescencia. Tanto las células sanas como las tumorales sufren el daño provocado por estos agentes, pero nos valemos del hecho de que las células tumorales proliferan muy rápido mientras que las sanas lo hacen más despacio (en los tejidos proliferativos como el intestino) o no lo hacen (la mayoría de las células de un organismo se encuentran en G0 o G1), lo cual las hace menos sensibles a la irradiación.

Sin embargo, la fuente mayoritaria de daño en el DNA proviene del propio metabolismo celular siendo las más peligrosas la especies reactivas de oxígeno: ión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (De Bont, 2004). La consecuencia de estas especies reactivas de oxígeno es la creación de roturas de cadena sencilla (que provocan la aparición de DNA de cadena sencilla, ssDNA o *single strand DNA*) y de doble cadena (*double strand breaks*, DSB). Por otro lado, las bases del DNA se modifican espontáneamente, a pesar de encontrarse bien protegidas en la estructura de desoxirribosas que conforma la cadena del DNA. Así, se pueden producir depurinaciones (ocurre  $10^{17}$  veces en el cuerpo humano cada día), depirimidinaciones y desaminaciones de las bases (Lindahl and Barnes, 2000).

Otra fuente fundamental de lesiones en el DNA es la propia replicación, lo que implica que la aparición de lesiones es intrínseca a la duplicación del material genético. Este proceso es muy complejo, y pueden aparecer lesiones tanto asociadas al proceso de copiado como por defectos en el mantenimiento de la estructura de la horquilla de replicación. En el primer caso, las DNA polimerasas pueden introducir bases erróneas o modificadas químicamente. Estos errores no suelen tener consecuencia alguna ya que las polimerasas cuentan con actividad *proofreading* (prueba de lectura) que permite la no incorporación de estas bases erróneas. Además, el sistema MMR (*mismatch repair*) elimina las bases modificadas que hayan escapado al control de la polimerasa. Sin embargo, la fuente más peligrosa de lesiones es la propia horquilla de replicación ya que la doble cadena de DNA se tiene que abrir para permitir su copiado. Cualquier obstáculo, como una unión covalente entre ambas cadenas (Dronkert and Kanaar, 2001), puede producir la apertura excesiva de

la horquilla con lo que se exponen grandes regiones de DNA de cadena sencilla. Estas regiones son altamente recombinogénicas, y las células lo entienden como una alteración de la estructura del DNA y disparan la señal de daño. Además, cualquier pérdida de procesividad en la replicación genera torsiones y tensiones en el DNA que pueden desembocar en la rotura del mismo. Pero las tensiones son intrínsecas a la replicación porque el DNA está enrollado y la horquilla de replicación (gracias a las helicasas) lo desenrolla. Para aliviar esta situación, las topoisomerasas (de tipo I y II) cortan y religan el DNA (bien una cadena o bien ambas). Así, la inhibición de las topoisomerasas genera rupturas debido a las tensiones o debido a la incapacidad de religar las cadenas de DNA (D'Arpa et al., 1990).

Por último, el DNA no se rompe sólo accidentalmente. La misma reparación del DNA, así como algunos procesos biológicos generan selectivamente DSB. Respecto a los procesos biológicos, tanto en la meiosis como durante la maduración de los linfocitos aparecen este tipo de roturas. Durante la recombinación meiótica los cromosomas se rompen controladamente para intercambiar secuencias con sus homólogos, incrementando así la variabilidad en la secuencia de los gametos (Zickler and Kleckner, 1998). La recombinación somática ocurre en linfocitos durante el proceso de cambio de clase (*class switch recombination*) y la recombinación V(D)J, necesaria para la producción de inmunoglobulinas (Dudley et al., 2005).



**Figura 1. Las fuente de daño en el DNA.** Se representan las principales causas y su origen (endógeno o exógeno).

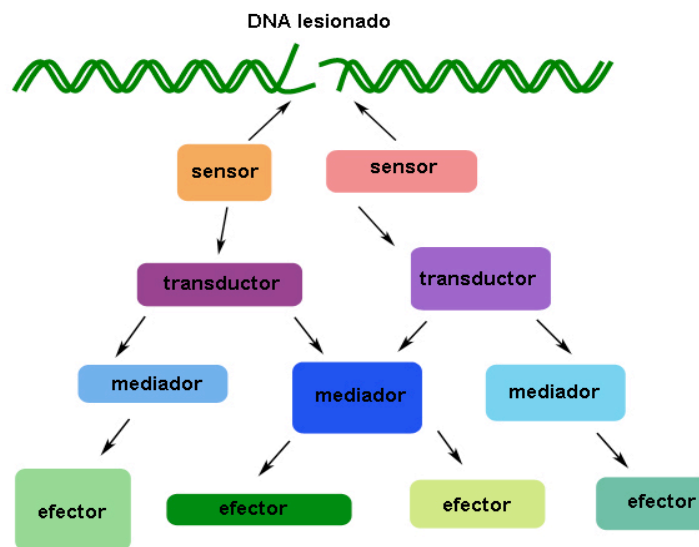
Tanto las causas como las respuestas y las consecuencias del daño en el DNA son objeto de numerosos estudios. Para ello, son utilizadas diversas drogas o procedimientos que generan lesiones de diversos tipos. Son ampliamente utilizados los rayos  $\gamma$  (IR) y la neocarcinostatina para generar DSB en cultivos celulares y en animales de laboratorio. También se usan la hidroximetilurea (HU) o la afidicolina para inducir estrés replicativo, al deplecionar los niveles de dNTPs e inhibir las polimerasas respectivamente. Otras drogas ampliamente usadas son la doxorubicina (agente intercalante), el etopósido y la camptotecina (inhibidores de las topoisomerasas II y I) y el MMS (agente alquilante).

## 1. 2. La respuesta al daño en el DNA

Cuando una célula detecta que su genoma está dañado activa una respuesta que conduce a su reparación para mantener la integridad del genoma (Harper and Elledge, 2007). La Respuesta al Daño en el DNA o *DNA Damage Response* (en adelante DDR) es el conjunto de procesos que permiten la reparación, el control del ciclo celular y la activación de la apoptosis. El tipo de respuesta depende del tipo de lesión, siendo la mayoría reparadas sin afectar al ciclo celular. Sin embargo, en algunas ocasiones la cuantía o el tipo de lesión son graves y entonces se activa una señal de parada de ciclo celular (*checkpoint*) que retrasa la entrada en la siguiente fase del ciclo celular y da un tiempo a la célula para reparar el DNA. A veces, la lesión es tan grave que no se puede reparar, en estos casos las células no transformadas activan un programa de muerte celular (apoptosis) o de parada irreversible (senescencia). Las lesiones más graves que una célula puede sufrir son los DBS y la acumulación de ssDNA por su potencial recombinogénico. En el caso de los DSB, si no se reparan correctamente estas roturas pueden producir translocaciones cromosómicas y/o fusiones de cromosomas que conducen a una incorrecta segregación durante la mitosis y la pérdida de material genético. Esta situación es letal en la mayoría de las ocasiones aunque en algunas estos eventos propician la transformación celular al provocar la sobreexpresión de oncogenes o la pérdida de supresores de tumores.

La respuesta al daño en el DNA es un proceso jerárquico y diversificado que activa específica y ordenadamente diferentes grupos de proteínas, los cuales llevan a cabo las diferentes tareas necesarias para reparar el daño (Shiloh, 2003). Primero, las lesiones son detectadas por las proteínas “sensoras”, que se encuentran cerca de la cromatina. Seguidamente, los extremos de la ruptura que han quedado libres muchas veces son

procesados ya que al tener una estructura aleatoria no sirven de sustrato para los mecanismos de reparación. A continuación, la señal se transmite a través de los “transductores”, en este punto la señal se diversifica a través de los adaptadores y moduladores varios, que llevan la señal de daño a todo el núcleo y señalizan a los “efectores” el daño ocurrido (**figura 2**). Los “efectores” son los que finalmente llevarán a cabo las tareas necesarias tanto a nivel local como a nivel celular. Finalmente, toda la cascada de señalización debe apagarse y volver a su estado basal, gracias principalmente a la actividad de fosfatasas (Bakkenist and Kastan, 2004).



**Figura 2. Estructura de la respuesta a daño en el DNA.** Los diferentes sensores detectan el daño en el DNA y activan a los transductores, los cuales, gracias a los mediadores, llevan la señal a los efectores, que son las proteínas que llevan a cabo las tareas necesarias para la reparación del DNA.

### 1. 3. Iniciación de la señal: las PIKKs

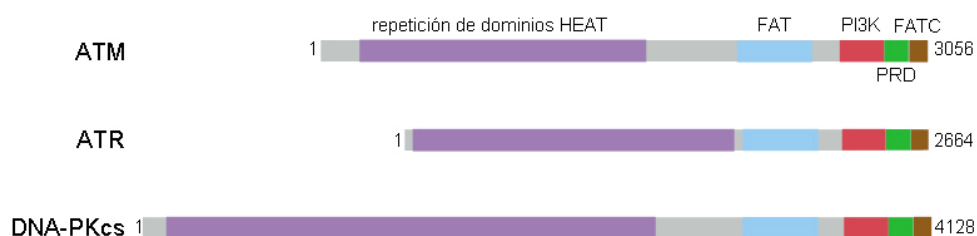
Los transductores más significativos y estudiados son ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad3 Related*) y DNA-PKcs (*DNA Protein Kinase catalytic subunit*). Estas tres quinasas transmiten la señal de daño mediante la modificación postraduccional por excelencia: la fosforilación. ATM, ATR y DNA-PKcs pertenecen, junto a mTOR, SMG1 y TRRAP, a la familia de las PIKKs o *PI-3-kinase-related-kinases*, por su homología con la fosfatidilinositol-3-quinasa (*phosphatidylinositol-3-kinase* o PI3K) (Shiloh, 2003). A diferencia de PI3K, responsable de la fosforilación de lípidos implicados en señalización de membrana, ATM, ATR y DNA-PKcs fosforilan exclusivamente proteínas en residuos serina y treonina preferencialmente seguidos por un glutámico (sitios [S/T]Q). Son



proteínas de pesos moleculares muy altos en las que el dominio quinasa está altamente conservado. Este dominio supone únicamente el 5-10% del total de la proteína, lo que indica que gran la mayor parte de la proteína tiene funciones reguladoras. Estas proteínas comparten una distribución estructural similar, caracterizada por una larga región amino-terminal con numerosas repeticiones HEAT (*Huntingtin, Elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1*), y una región carboxi-terminal compuesta por los dominios FATC (*FAT C-terminal*), quinasa (dominio catalítico PI3K), PRD (*PIKK Regulatory Domain*) y FAT (*FRAP, ATM and TRRAP*) (Lovejoy and Cortez, 2009) (Figura 3).

A pesar de estas similitudes estructurales, ATM, ATR y DNA-PKcs tienen distintas funciones. Por un lado, ATM y DNA-PKcs se activan en respuesta a rupturas de doble cadena en todas las fases del ciclo celular (Gottlieb and Jackson, 1993; Pandita et al., 2000). En cambio, ATR es la responsable de señalar la aparición de DNA de cadena sencilla (*ssDNA*), y su actividad está restringida a las fases S y G2 (Zou and Elledge, 2003). Por otro lado, la actividad de DNA-PKcs está restringida a la zona de la lesión y promueve fundamentalmente la reparación de los DSB (Collis et al., 2004), mientras que ATM y ATR tienen un papel esencial en la señalización global del daño.

A pesar de que la fosforilación constituye la modificación postraduccional más abundante (al menos, la más estudiada), existen otras cascadas de modificación postraduccionales en la DDR fundamentales para expandir y modular la señal, como la ubiquitinación, la acetilación y la SUMOilación (van Attikum and Gasser, 2009). La complejidad de esta señal permite mayor precisión en la señalización, que conduce a la activación de las proteínas efectoras, pero también a su estabilidad, localización, interacción con otras proteínas o DNA, etc.



**Figura 3. Estructura de las proteínas ATM, ATR y DNA-PK.** Se muestran las repeticiones de los dominios HEAT (5 en ATM, 6 en ATR y 8 en DNA-PKcs), y los dominios FAT, PI3K, PRD y FATC.

### 1. 3. 1. DNA PKcs

DNA-PKcs es atraída a la lesión por el sensor de daño Ku70/Ku80, un sensor de DSB que se une a los extremos del DNA y los estabiliza (Smith and Jackson, 1999). El complejo formado por Ku70/Ku80/DNA-PKcs conforma la quinasa catalíticamente activa DNA-PK (Gottlieb and Jackson, 1993), que promueve la reparación del DSB mediante NHEJ (*Non Homologous End Joining*) (Mahaney et al., 2009). Aunque DNA-PKcs funciona como quinasa sólo localmente en la ruptura, puede fosforilar sustratos comunes a ATM y ATR aumentando la capacidad de señalización y atrayendo a otros mediadores a la lesión (Stiff et al., 2004). La ausencia de actividad DNA-PKcs en ratón resulta en un defecto profundo en el sistema inmune (denominado *Severe Combined Immunodeficiency*, SCID) que se acompaña de una hipersensibilidad a radiación ionizante (Biedermann et al., 1991; Smith and Jackson, 1999). Además, DNA PKcs es indispensable para suplir algunas funciones de ATM en su ausencia (Gurley and Kemp, 2001), aunque no puede suplir todas las funciones de ATM, debido a la importancia de ATM para el establecimiento de los *checkpoints*.

### 1. 3. 2. ATM

ATM es el producto del gen que se encuentra mutado en la enfermedad genética humana Ataxia Telangiectasia (A-T) (Savitsky et al., 1995). Los pacientes presentan los síntomas característicos de una reparación deficiente de las rupturas de doble cadena: inmunodeficiencia, inestabilidad genómica, atrofia de timo y gónadas, predisposición a tumores de origen linfóide e hipersensibilidad a la radiación ionizante, además de presentar neurodegeneración; otro síntoma de causa desconocida pero común en los síndromes de inestabilidad genómica (Shiloh and Kastan, 2001).

La respuesta mediada por ATM es iniciada por el complejo mediador Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) (Lee and Paull, 2004; Petrini and Stracker, 2003; Uziel et al., 2003). El mecanismo por el cual los componentes del complejo MRN activan a ATM no se ha establecido, sin embargo se sabe que mutaciones en Nbs1 y en Mre11 provocan síndromes similares a A-T (Stewart et al., 1999). El modelo actual propone que cuando se produce un DSB, Nbs1 es capaz de interactuar con ATM a través de su extremo C-terminal (You et al., 2005) y atraerla a los DSB inmediatamente después del daño, gracias a que ATM está en contacto con la cromatina (Kim et al., 2009). Una vez en la ruptura, ATM se activa

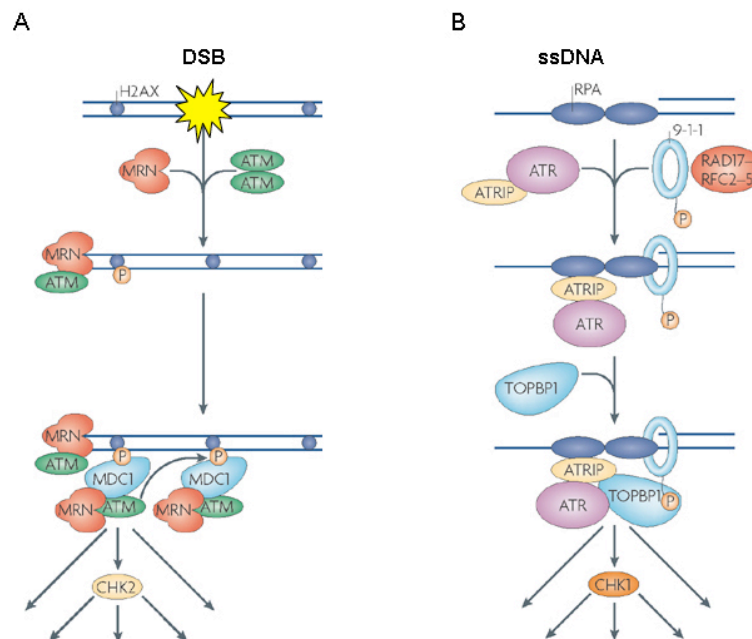
catalíticamente al pasar de un estado dimérico a uno monomérico, lo que expone su dominio quinasa (**figura 4**). Algunos autores proponen que este cambio conformacional es producto de una serie de autofosforilaciones (Bakkenist and Kastan, 2003) mientras que otros proponen que estos sitios conocidos de autofosforilación son irrelevantes para la actividad catalítica de ATM *in vivo* siendo una consecuencia y no una causa de su activación (Pellegrini et al., 2006). La posterior fosforilación de Nbs1 aumenta la afinidad del complejo por la zona de la ruptura (Lukas et al., 2003), lo que contribuye a la expansión de la señal.

Hay evidencias de que ATM tiene un papel directo en la estimulación de la reparación, debido a la persistencia de rupturas en células A-T incluso en ausencia de proliferación (Klhne et al., 2004). Se cree que ATM es necesaria para resolver cierto tipo de lesiones más complejas que no son reparadas rápidamente por la vía clásica de NHEJ (Riballo et al., 2004). Aunque DNA-PK es la principal quinasa encargada de reparar DSB, se ha propuesto que ATM tiene un papel en la reparación de estas lesiones. Se ha postulado que la contribución de ATM en la reparación de los DSB deriva fundamentalmente de la reparación de aquellos DSB localizados en la heterocromatina. Este proceso de reparación es más lento y costoso, y necesita de un aumento de la accesibilidad a la cromatina que es producido por la fosforilación de ciertos sustratos de ATM (Goodarzi et al., 2008). Sin embargo se da la paradoja de que una de las células que más sufren la ausencia de ATM son, a su vez, unas de las que menos heterocromatina poseen: las células de Purkinje. Esto sugiere que ATM juega un importante papel en el mantenimiento de la eucromatina (Fernandez-Capetillo and Nussenzweig, 2008).

### 1. 3. 3. ATR

ATR se activa en respuesta a regiones de ssDNA anormalmente largas. Éstas pueden aparecer como consecuencia de la descoordinación entre la maquinaria de replicación y el desenrollamiento en el avance de las horquillas durante la fase S o como producto de la resección de DSB durante las fases S y G2. Cuando las horquillas de replicación se bloquean en respuesta a alteraciones en el DNA, la actividad de ATR mantiene la estabilidad de los complejos replicativos necesaria para reanudar correctamente la síntesis del DNA (Paulsen and Cimprich, 2007). ATR sólo existe como parte de un complejo heterodimérico con ATRIP (*ATR Interacting Protein*) que es necesaria para su actividad señalizadora y responsable de la correcta relocalización de ATR a los sitios de ssDNA

(Cortez et al., 2001). Para ser activo, el complejo ATR-ATRIP necesita, además, interactuar con la proteína TopBP1 que funciona como un inductor alostérico directo del dominio quinasa de ATR (Kumagai et al., 2006). Mientras que ATR y ATRIP coexisten indivisiblemente como complejo, solo interactúan con TopBP1 cuando los tres componentes son reclutados a las zonas de ssDNA, disparando entonces la actividad quinasa de ATR. Este mecanismo de control por colocación es posible gracias a que diferentes sensores son responsables de reclutar a ATR-ATRIP y TopBP1 al ssDNA. La proteína de replicación A (*Replication Protein A* o RPA) recubre el DNA de cadena sencilla estabilizándolo y atrae por un lado a ATR-ATRIP (Walter and Newport, 2000) y por otro lado a Rad17. Rad17 interactúa con el factor de replicación C (RFC) y carga al complejo 9-1-1 (Rad9, Hus1 y Rad1) (Bermudez et al., 2003) en el DNA de doble cadena adyacente a ssDNA recubierto por RPA (Zou et al., 2003). Es Rad9 quién pone en contacto a ATR-ATRIP y a TopBP1 al interactuar con RPA y reclutar a TopBP1 (figura 3). Además de requerir todos estos factores para activarse genéricamente, ATR necesita un adaptador específico llamado Claspin para fosforilar a uno de sus sustratos fundamentales: Chk1 (Liu et al., 2006). Además de la actividad de ATR, los niveles de Claspin están estrictamente regulados en función de la fase del ciclo, de esta forma la activación de Chk1 está restringida a S y G2 por ambos mecanismos (Mailand et al., 2006).



**Figura 4. Mecanismo de activación de ATM y de ATR.** A: ATM acude a los DSB atraída por el complejo MRN. La fosforilación de H2AX recluta a MDC1 y amplifica la señal de ATM. B: ATR es reclutada por RPA

a los segmentos de ssDNA, activándose al interactuar con TopBP1. Adaptado de (Cimprich and Cortez, 2008).

Aunque ATM y ATR son capaces de fosforilar sustratos comunes, presentan diferencias esenciales como la señal que los activa o su actividad a lo largo del ciclo. Además, poseen ciertos sustratos específicos como Chk2 y Chk1 respectivamente. Por esto las consecuencias de la falta de ATM o ATR a nivel celular y a nivel del organismo son dramáticamente diferentes: la pérdida de ATR causa letalidad en las primeras divisiones del desarrollo (Brown and Baltimore, 2000) mientras que los individuos que carecen de ATM funcional pueden vivir décadas. Este hecho ha significado una enorme limitación técnica en el estudio de su función a nivel molecular y de su relevancia en la respuesta al daño. Sin embargo, la investigación llevada a cabo en los últimos años ha aportado un amplio conocimiento del mecanismo de acción de ATR, dilucidando su papel global y esencial en la supervisión de la replicación. En el año 2003 se describió una mutación en ATR como la responsable de la enfermedad de Seckel (Griffith et al., 2008; O'Driscoll et al., 2003), de la que existen muy pocos casos registrados. Los pacientes presentan una mutación puntual en el exón 9 del gen de ATR, que altera el *splicing* normal del RNA mensajero generando mayoritariamente una proteína truncada y no funcional, de forma que los pacientes solo tienen un 5% de los niveles normales de ATR. Esta deficiencia en ATR provoca un retraso grave en el desarrollo, envejecimiento prematuro, inestabilidad genómica y neurodegeneración. El modelo murino humanizado del síndrome de Seckel desarrollado en nuestro laboratorio ha permitido revelar cómo el estrés replicativo que se produce durante el desarrollo intrauterino, debido a bajos niveles de ATR, es la causa de un fenotipo tan severo (Murga et al., 2009b).

#### 1. 3. 4. Cooperación entre ATM, ATR y DNA-PK

Las funciones de ATM y ATR se complementan para cubrir las necesidades de la DDR. Hasta hace poco ambas rutas se trataban como independientes, pero existe una clara interconexión entre ellas. Mientras que en condiciones normales ATM enmascara a DNA-PKcs en funciones de señalización, la comunicación entre ATM y ATR para una eficiente señalización es esencial. En respuesta a irradiación, ATM regula la activación del *checkpoint* en G2 estimulando a ATR (Adams et al., 2006; Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006), mecanismo que implica el procesamiento de los DSB para

reclutar a ATR. En un mecanismo dependiente de actividad CDK y exclusivamente en S y G2 (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008) en el que inicialmente ATM estimula el comienzo de la resección de los extremos 5' libres. A medida que el DSB se va transformando en ssDNA aumenta el reclutamiento de ATR acompañado de la progresiva expulsión de MRN y desactivación de ATM (Shiotani and Zou, 2009). El ssDNA provoca el reclutamiento de RPA, el complejo 9-1-1, y TopBP1, lo que dispara la actividad catalítica de ATR para inducir el checkpoint en G2. Este proceso es necesario para la reparación de los DSB por recombinación homóloga (posible en S y G2).

Como resumen, la respuesta a un DSB se puede esquematizar en la siguiente secuencia. En primer lugar se activa DNA-PKcs, que promueve la reparación mediante NHEJ. La mayoría de los DSB son reparados así, y no suponen ninguna consecuencia a nivel celular. Sin embargo, si esta lesión es más compleja se activa ATM, de tal manera que se activa el *checkpoint* correspondiente. Esta parada transitoria del ciclo celular tiene como objetivo permitir la reparación de DSB antes de la progresión a la siguiente fase del ciclo. Si la células se encuentra en fases S o G2, tras la activación de ATM se producirá la activación de ATR debido a la resección de los extremos del DSB, que genera ssDNA. Esta activación de ATR conduce a una parada más robusta, así como a la reparación definitiva de la lesión.

#### 1.4. Amplificación de la señal

Para propagar la señal de alerta y orquestar la respuesta celular global al daño en el DNA, ATR y ATM cooperan estrechamente con otras proteínas. A este nivel es fundamental el papel de los mediadores: proteínas con funciones muy diversas que modulan la actividad de ATM y ATR, facilitan las interacciones entre ATM/ATR y sus sustratos, y en un sentido más amplio median el ensamblaje espacio-temporal de complejos proteicos en la cromatina próxima a la lesión (Kastan and Bartek, 2004). Muchas de las proteínas mediadoras comparten la capacidad de ser cargadas en el DNA y concentrarse en los DSB o en el ssDNA en agregados denominados focos. Estos focos pueden ser inducidos mediante irradiación, por lo que en muchas ocasiones son referidos como IRIF (*Irradiation Induced Foci*). Los primeros eventos implicados son la fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 (forma a la que se denomina  $\gamma$ H2AX) y su posterior reclutamiento de Mdc1. Muchos de los componentes de la DDR colocalizan con los IRIF de  $\gamma$ H2AX, que es fosforilada en la región de la lesión por ATM, ATR y DNA-PKcs y puede

extenderse hasta varias megabases, amplificando la señal (Rogakou et al., 1998). Según el modelo actual, aunque los mediadores acuden a la lesión por un mecanismo independiente de ATM, su acumulación en focos depende de la fosforilación de H2AX mediada por ATM (Bartek et al., 2007; Celeste et al., 2003; Lukas et al., 2004a). Mdc1 recluta al complejo MRN a través de Nbs1 que vuelve a reclutar a ATM de forma que ahora puede fosforilar a H2AX en posiciones adyacentes, generándose una reacción en cadena que amplifica la señal (Lou et al., 2006).

Sin embargo, la fosforilación no es la única manera de formar focos. Por un lado, para el reclutamiento de BRCA1 y 53BP1 es fundamental la ubiquitinación de histonas en las inmediaciones de las rupturas (Attikum and Gasser, 2009). RNF8 y RNF168 son dos E3-ubiquitin-ligasas que, junto a la E2-conjugasa UBC13, son necesarias para la formación de focos de 53BP1 y BRCA1 (Doil et al., 2009; Huen, 2007). Por otro lado, en respuesta a estímulos que inducen la activación de ATR a través de la generación de ssDNA otros factores forman focos con una arquitectura diferente. Cuando se genera ssDNA, se produce una acumulación de RPA que es independiente de  $\gamma$ H2AX debido a que RPA es el puente de anclaje directo al ssDNA.

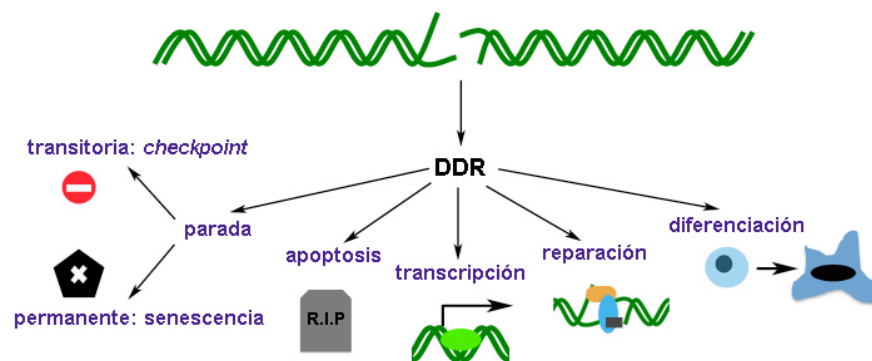
Hay que destacar que la acumulación de estas proteínas en focos es un fenómeno posterior y funcionalmente distinto a su capacidad de acudir a las rupturas. En ausencia de  $\gamma$ H2AX o Mdc1, factores fundamentales de la DDR como 53BP1, BRCA1 y Nbs1 pierden su capacidad de concentrarse en los focos pero esto no tiene graves consecuencias en la señalización de las rupturas porque conservan su capacidad de acudir a los DSB (Celeste et al., 2002; Stewart et al., 2003). Por un lado, los datos apuntan a que la función de los focos es asegurar una eficiente señalización del daño (Fernandez-Capetillo et al., 2002). La concentración de mediadores en la zona impide que éstos se despeguen de la cromatina antes de que el daño sea reparado (Kruhlak et al., 2006a; Kruhlak et al., 2006b). Otra explicación es que son necesarios suficientes transductores para detener el ciclo celular (Yamauchi et al., 2008). El tamaño de los focos va creciendo conforme su número disminuye, sugiriendo que el fenómeno de concentración es necesario para mantener la parada del ciclo celular.

Por otro lado, si alguna de estas proteínas formadoras de focos son esenciales para la supervivencia del organismo (Hakem, 2008) es debido a que tienen otras funciones

independientes de la capacidad de concentrarse en las lesiones en forma de focos que sí son fundamentales para la célula, como es el caso de Brca1 (Gowen et al., 1996; Hakem et al., 1996; Liu et al., 1996). En este sentido, Brca1 forma focos asociados a daño (que colocalizan con  $\gamma$ H2AX) pero también otros mucho menos conocidos, que están presentes en la mayoría de las células en S y G2 y que no se asocian a  $\gamma$ H2AX (Scully et al., 1997).

## 2. Efectos de la DDR

La función principal de las rutas de ATM y ATR es la de coordinar la respuesta al daño en el DNA con la progresión del ciclo celular, y así evitar que la células continúen proliferando con el daño y el consecuente peligro de transmitir mutaciones a las células hijas. Así, se establece una respuesta multifacética que produce una parada transitoria para permitir la reparación. Según el tejido, y sólo si el daño es excesivo, la DDR puede activar una parada permanente (senescencia) o la muerte celular (apoptosis). Incluso se ha descrito que en ES la DDR activa la diferenciación de las células, limitando su capacidad de renovación cuya consecuencia es el envejecimiento del tejido (Inomata et al., 2009) (figura 5).



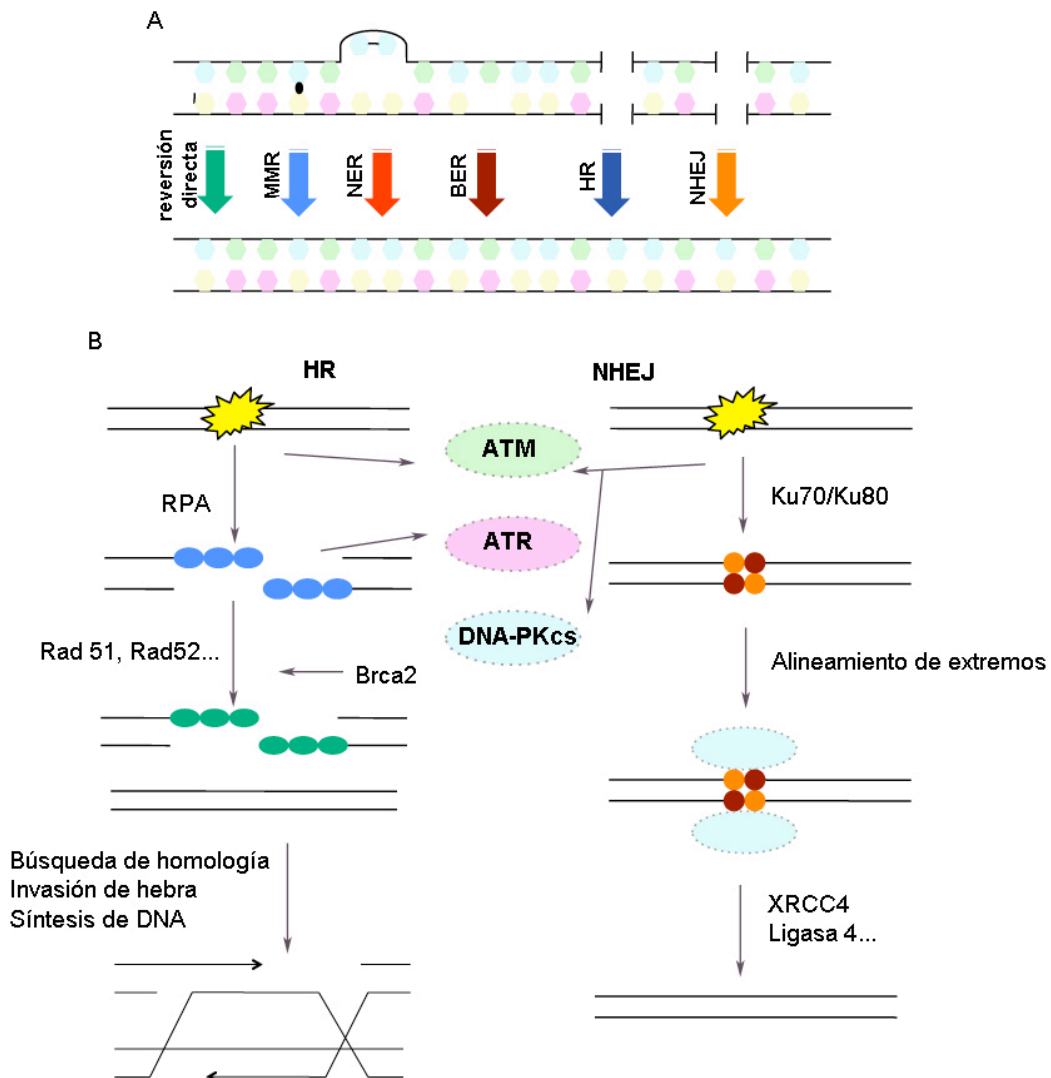
**Figura 5. Consecuencias de la DDR.** Cada respuesta depende del contexto celular, del tipo y de la cantidad de daño. Adaptado de (Zhou and Elledge, 2000).

### 2. 1. Reparación

Además de los mecanismos que vigilan continuamente la aparición de lesiones en el DNA (figura 6 A), la célula dispone de dos vías fundamentales para reparar alteraciones estructurales como los DSB: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la



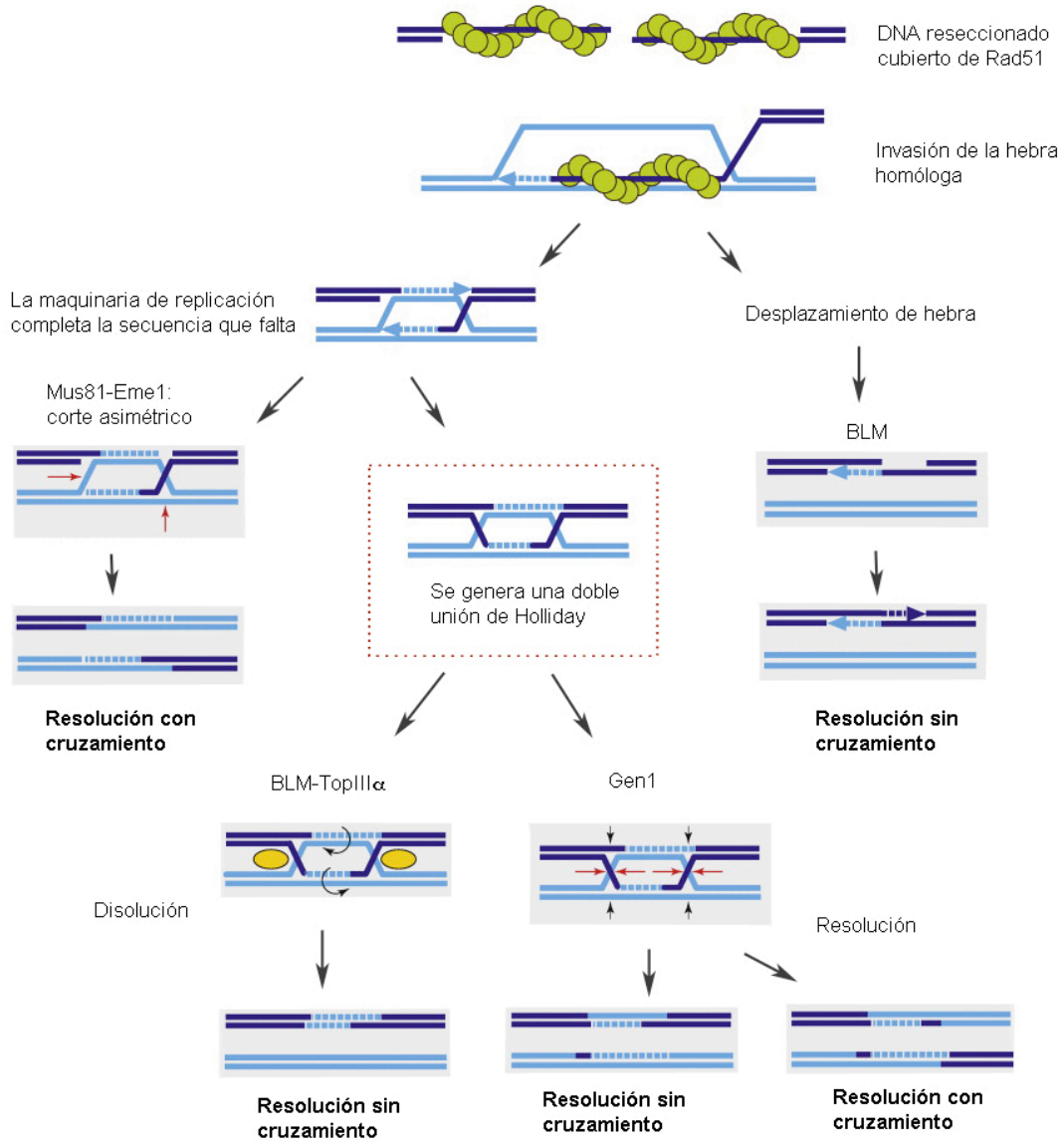
recombinación homóloga (HR) (Hoeijmakers, 2001). El primer mecanismo, NHEJ, es vital para la reparación de DSB durante G1 aunque es propenso a introducir errores en la secuencia del DNA porque liga los extremos de la ruptura de una forma rápida a expensas de generar posibles microdeleciones locales. El segundo mecanismo de reparación, HR, no es propenso a introducir errores pero sólo es posible en las fases S y G2, cuando existe la cromátida homóloga necesaria para la recombinación. Por tanto, dado que la mayoría de las células en un organismo adulto se encuentran en G0 o G1 y que los genomas de mamíferos tienen tantas secuencias repetitivas (lo cual dificulta la reparación mediante HR), dependemos grandemente de la ruta NHEJ (Mao et al., 2008).



**Figura 6. Rutas de reparación.** A: Esquema de las diferentes lesiones que se pueden dar en el DNA y las rutas de reparación que activan. Tomado de (Hakem, 2008). B: Reparación de un DSB mediante HR y NHEJ, se representan los pasos fundamentales de cada ruta.

Durante la reparación mediante NHEJ, los extremos rotos del DNA son detectados por el heterodímero Ku70/80 que atrae a DNA-PKcs. La ruptura es ligada por un complejo formado por DNA Ligasa IV y XRCC4 (Hefferin and Tomkinson, 2005). A pesar de su baja fidelidad, esta vía puede actuar de forma urgente y además puede ser utilizada en cualquier fase del ciclo celular (**figura 6 B**). Sin embargo, cuando la célula está en fases S y G2 utiliza otro mecanismo de reparación: el de HR, de alta fidelidad, basado en la recombinación homóloga entre las cromátidas hermanas (**figura 6 B**). La expresión de varios componentes de este mecanismo está regulada en el ciclo celular ya que la actividad de esta ruta en G1 podría conllevar serias consecuencias, como la pérdida de heterocigosidad (LOH) o translocaciones cromosómicas (Richardson and Jasin, 2000a, b). En primer lugar, para la búsqueda de homología en la cromátida hermana es necesaria la generación de ssDNA, por lo que los DSB son reseccionados para generar largos segmentos de cadena simple con extremos 3' (Hiom, 2000). Diferentes helicasas y exonucleasas como Sgs1 y Exo1 son responsables de este proceso (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). Tras la resección, el ssDNA es recubierto por RPA. Luego el segmento de ssDNA debe invadir el DNA de cadena doble (desplazando las hebras complementarias unidas) mientras que RPA es sustituida por otra proteína con capacidades invasivas, Rad51 (Benson et al., 1994), fenómeno que está facilitado por Rad52 (New et al., 1998). A continuación la maquinaria de replicación rellena la secuencia que falta utilizando los extremos de ssDNA como cebadores. De esta forma se llega a una estructura llamada unión de Holliday (Bzymek et al., 2010) que posteriormente es resuelta para separar ambas cromátidas (**figura 7**). Brevemente, la reparación mediante recombinación homóloga implica la generación de unos productos llamados intermediarios de recombinación. Gracias a la actividad de varias rutas estos intermediarios generan cromátidas separadas en las que ha habido, o no, cruzamiento de las cromátidas. Este proceso, dependiente de actividad endonucleasa que cree una ruptura transitoria y ligasa que la una después, necesita de una actividad enzimática que se ha llamado 'resolvasa'. Esta resolvasa ha sido objeto de intensa búsqueda (Mimitou and Symington, 2009; West, 2003). Se han implicado varias enzimas en este proceso. Por un lado, Mus81-Eme1 y Gen1 son endonucleasas que generan cortes y resuelven el intermediario de recombinación. Por otro lado, la helicasa BLM y la topoisomerasa TopIII son capaces de disolver estos intermediarios (**figura 7**). En la actualidad no se conocen todos los componentes de estas rutas ni todos los mecanismo de acción, pero se sabe que estas estructuras son altamente

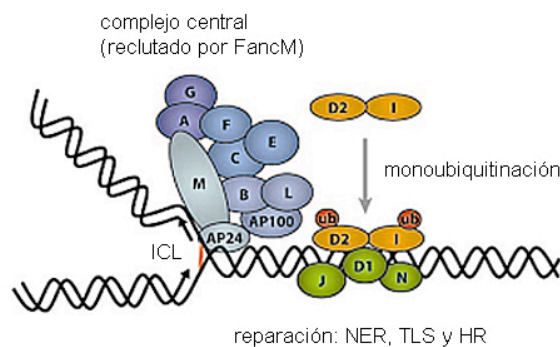
recombinogénicas y suponen una amenaza para la células: si progresan a mitosis estas uniones entre cromátidas provocan rupturas en los cromosomas así como una segregación incorrecta de los mismos.



**Figura 7. Esquema de la recombinación homóloga.** Tras la resección de los extremos de DNA y la invasión de la hebra homóloga se generan una serie de intermediarios de la recombinación que necesitan de varias rutas y enzimas para su resolución. Tomado de (Mimitou and Symington, 2009).

Defectos en estas rutas de reparación producen graves enfermedades. La ausencia de los factores involucrados en NHEJ produce una severa inmunodeficiencia ya que, como se ha comentado anteriormente, las rupturas programadas que tienen lugar en la

recombinación V(D)J y en la del cambio de clase (CSR) en linfocitos son reparadas por NHEJ. Entre los factores implicados en HR, algunos son de extrema importancia en la supresión tumoral en humanos. BRCA1 y BRCA2 son necesarios para reclutar de forma eficiente a Rad51 y su ausencia compromete seriamente la HR (Welch et al., 2000). Otra evidencia de síndromes relacionados con la HR es la anemia de Fanconi. Los componentes de la ruta de Anemia de Fanconi (FA) resuelven entrecruzamientos inter-cadena (ICL). Los diferentes factores actúan en pasos sucesivos que convergen en la monoubiquitinación de FANCD2, necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta, y que es dependiente de la actividad de ATR (Moldovan and D'Andrea, 2009). Brevemente, la presencia de ICLs detiene la horquilla de replicación. Esta estructura activa el complejo central FA (*core complex*) a través de FancM y de forma dependiente de ATR, cuya consecuencia es la monoubiquitinación de FancD2-FancI. Una vez ocurrido esto, se reclutan otras proteínas FA que promueven la reparación del DNA mediante la ruta de escisión de nucleótidos (NER), la ruta de síntesis translesión (TLS) y HR (figura 8).



**Figura 8. Reparación mediante la ruta Fanconi Anemia.** Se representan los diferentes miembros del complejo central, que son reclutados a la lesión por FancM, y cuya consecuencia es la monoubiquitinación de FancD2-FancI y su reclutamiento junto con otros factores para promover la reparación mediante NER, TLS y HR. Tomado de (Moldovan and D'Andrea, 2009).

## 2. 2. Parada del ciclo celular

El ciclo celular es una secuencia ordenada de eventos que se divide en fases separadas por transiciones sometidas a un estricto control. Las fases fundamentales son dos: la fase de síntesis o S, donde el DNA es replicado, y la fase de mitosis o M, en la que se produce la segregación de los cromosomas replicados y la división en dos células hijas. Intercaladas entre estas dos fases se encuentran la fase G1 (después de M) y la fase G2 (después de S)

durante las cuales la célula se prepara para las otras dos. En situaciones en las que no se requiere una proliferación continua, la célula entra en fase de reposo o quiescencia llamada G0. Existen complejos mecanismos de control que aseguran la generación de una sola copia de material genético totalmente fiel al molde original y garantizan el reparto equitativo entre las dos células hijas. Tienen un papel esencial tanto las transiciones entre las fases del ciclo que regulan que una nueva fase no comience hasta que se dan todos los requisitos que definen la terminación de la fase anterior, como la progresión precisa y ordenada del ciclo, que es asegurada por las Cdks (quinasas dependientes de ciclinas) (Morgan, 1997) (figura 9).

En presencia de daño en el DNA, la DDR retrasa la progresión del ciclo celular para dar tiempo a la reparación del DNA modulando transitoriamente los mecanismos que regulan la actividad de las Cdks. Así, el ciclo celular se puede detener en la frontera entre G1 y S, entre G2 y M, y ralentizar la replicación durante la fase S (Abraham, 2001). Estas barreras se denominan puntos de control o *checkpoints* G1/S, G2/M e intraS respectivamente. La ejecución de la señal generada por ATM y ATR en respuesta a daño se realiza a través de dos quinasas efectoras: Chk1 y Chk2. La fosforilación de Chk2 en la treonina 68 es llevada a cabo de forma específica por ATM (Matsuoka et al., 1998) y ATR fosforila a Chk1 en las serinas 317 y 345 (Liu et al., 2000a; Zhao and Piwnicka-worms, 2001). En conjunto, las cuatro quinasas constituyen los ejes de señalización que detienen el ciclo celular en respuesta a las alteraciones en el DNA. Aunque están jerárquicamente por debajo de las quinasas transductoras, Chk1 y Chk2 son esenciales para la correcta activación de los *checkpoints* ya que son activadas en la lesión para después extender su función a todo el nucleoplasma (Lukas et al., 2004b).

### 2. 2. 1. Checkpoint G1/S

Para evitar la entrada en fase S de una célula dañada, la DDR tiene dos efectores principales que funcionan en paralelo: por un lado la parada rápida del ciclo a través de Cdc25A, y por otro el mantenimiento de la parada a través de p53 (Lukas et al., 2004b). Aunque la fosforilación de ambas ocurre rápidamente y de forma simultánea, la cascada que surge de la activación de Cdc25A es más rápida porque no requiere síntesis de nuevas proteínas (Mailand et al., 2000). Sin embargo el control del *checkpoint* es llevado a cabo por la acumulación de p53, ya que la ausencia de p53 conlleva a la supresión total de esta parada. La fosforilación de Cdc25A en respuesta a daño constituye una marca para su

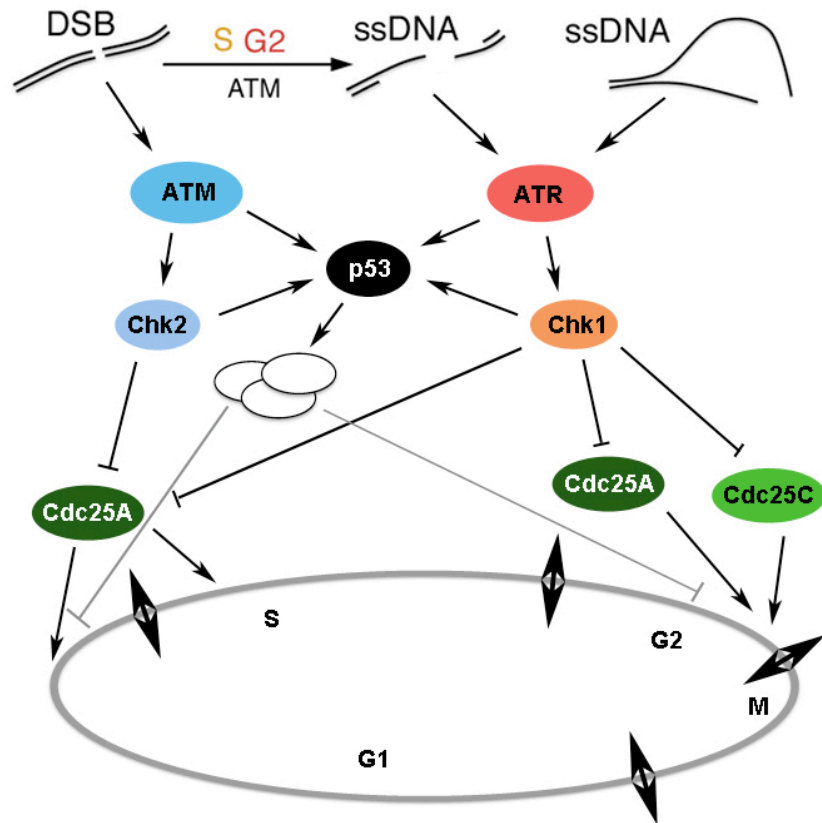
degradación por el proteosoma, evitando así que pueda defosforilar a Cdk2 y activarla. La respuesta más lenta implica la activación y estabilización de p53 a través de la fosforilación en su serina 15 por ATM (Canman et al., 1998; Tibbetts et al., 1999). Chk2, activada por ATM, también fosforila a p53 en la serina 20 y en la treonina 18 (Hirao et al., 2000; Shieh et al., 2000). Además, ATM interacciona con el regulador negativo de p53, la ubiquitin ligasa MDM2 (Shieh et al., 1997), que también se acetila (Dornan et al., 2003) y como consecuencia, la capacidad de p53 de transactivar sus genes diana aumenta considerablemente (Dumaz and Meek, 1999). Se induce la expresión de p21 (WAF1/Cip1), que se acumula horas después de detectarse el daño e inhibe la transición de G1 a S promovida por ciclina E/Cdk2 (Sherr and Roberts, 1999), complementando la respuesta al mantener el arresto por más tiempo.

### 2. 2. 2. Parada intra-S

Este *checkpoint* es en realidad un retraso reversible y transitorio de la progresión del ciclo, principalmente debido a que se impide la activación de nuevos orígenes de replicación. Esto se produce a través de la degradación de Cdc25A y la inhibición de Cdk2 (Bartek et al., 2004). Se ha sugerido que otro efector en este *checkpoint* es la fosforilación por ATM de la cohesina SMC1 (Kitagawa et al., 2004). Además de la parada, el *checkpoint* intra-S protege, por un mecanismo no muy claro todavía, del colapso de las horquillas de replicación (por ello se le llama también *checkpoint* de replicación) estabilizándolas y previniendo que se produzcan rupturas de doble cadena (Bartek et al., 2004; Osborn et al., 2002).

### 2. 2. 3. Checkpoint G2/M

La parada en la transición G2/M evita que entren en mitosis células que han sufrido lesiones durante G2 o que han progresado a través de G2 con lesiones no reparadas desde G1 o S. La diana fundamental del *checkpoint* G2/M es la actividad de ciclina B/Cdk1. La fosforilación en respuesta a daño de Cdc25A por Chk1 y Chk2, aunque fundamentalmente por Chk1, impide la activación del complejo ciclina B/Cdk1 (Donzelli and Draetta, 2003). De nuevo, el eje p53/p21 se encarga del mantenimiento del *checkpoint* aunque tiene un papel menos importante que en el *checkpoint* G1/S (Taylor and Stark, 2001).



**Figura 9: Checkpoints en respuesta al daño en el DNA.** Esquema del control transitorio del ciclo celular por las quinasas ATM y ATR. En G1 la parada es inducida por ATM/Chk2, mientras que en G2 ATM promueve la activación de ATR/Chk1.

### 2. 3. Senescencia, apoptosis y diferenciación

El fenómeno conocido como senescencia replicativa fue descrito *in vitro* hace casi 50 años en células humanas (Hayflick, 1965) al observar que fibroblastos humanos en cultivo seriado entraban en una parada celular irreversible después de 50-70 divisiones. Posteriormente se demostró que p53 media este tipo de parada junto con el eje supresor de tumores p16/Rb, aunque la importancia de p53 es considerablemente mayor en células murinas que en células humanas. Actualmente se considera la senescencia como una respuesta a estrés implicada en la protección frente al cáncer e involucrada en el envejecimiento del organismo. Uno de los desencadenantes de la parada permanente es el acortamiento telomérico. Estos telómeros disfuncionales son reconocidos como DSB y son capaces de disparar una DDR (D'Adda di Fagagna et al., 2003; Martens et al., 2000; Takai et al., 2003). Otras formas de daño permanentes, como el estrés oxidativo en cultivo

(Parrinello, 2003) y agentes genotóxicos (Poele et al., 2002), pueden inducir senescencia prematura. En la década pasada se descubrió que se podía inducir una parada irreversible y prematura, con características similares a la senescencia replicativa, mediante la activación de oncogenes en fibroblastos en cultivo (Serrano et al., 1997). Esta parada es activada por p53 y mediada por p19<sup>Arf</sup>. Hoy se sabe que la senescencia ocurre en tumores humanos y murinos (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005). Además, durante años se ha intentado identificar la naturaleza del estrés oncogénico. Recientemente se ha revelado que algunos oncogenes como Ras, CDC6, STAT5 o ciclina E desencadenan una DDR asociada a la hiperreplicación del DNA que activa el proceso de senescencia (Bartkova et al., 2005; Di Micco et al., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de la DDR, incluso en ausencia de daño, es suficiente para promover senescencia tanto en células humanas como murinas (Toledo et al., 2008).

La apoptosis es un mecanismo de muerte ejecutada activamente por la célula y viene determinada fundamentalmente por la intensidad de la señal, que es proporcional al número y gravedad de las lesiones, y por la sensibilidad de cada tipo celular al daño. Sin embargo, se desconoce cómo esta aparente dualidad está regulada. El efector principal de la apoptosis en respuesta a DSB es p53. Al ser activado por la DDR, induce la expresión de genes implicados en desencadenar los procesos mitocondriales necesarios para la muerte celular como Puma, Noxa y Bax (Miyashita et al., 1995; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000). Estos genes cooperan en la despolarización de la membrana mitocondrial y la salida del citocromo c al citosol (Willis et al., 2007). Este fenómeno provoca la formación de diversos complejos proteicos proapoptóticos latentes y culmina con la activación de enzimas denominadas caspasas y la ejecución de la muerte celular mediante degradación controlada del DNA y otros componentes celulares.

La disminución de la población de células madre por acumulación de daño en el DNA se ha evidenciado en animales con inestabilidad genómica (Murga et al., 2009b; Ruzankina et al., 2007). Hasta hoy, se consideraba que esta reducción se debía a dos efectos principales de la DDR: la senescencia y la apoptosis en las células madre (Ruzankina et al., 2008; Sharpless and DePinho, 2007). Sin embargo, un estudio del impacto del daño en el DNA *in vivo* en células madre melanocíticas reveló que la DDR induce la diferenciación de las células madre cuando el daño no puede ser reparado (Inomata et al., 2009). Esta diferenciación disminuye el *pool* de células madre y conlleva a la aparición de pelo gris en los



animales. La DDR ayudaría así a mantener la calidad de la población de células madre al eliminar aquellas que están dañadas induciendo la diferenciación en el nicho.

### 3. El estrés replicativo y sus consecuencias

#### 3.1. ATR y el envejecimiento

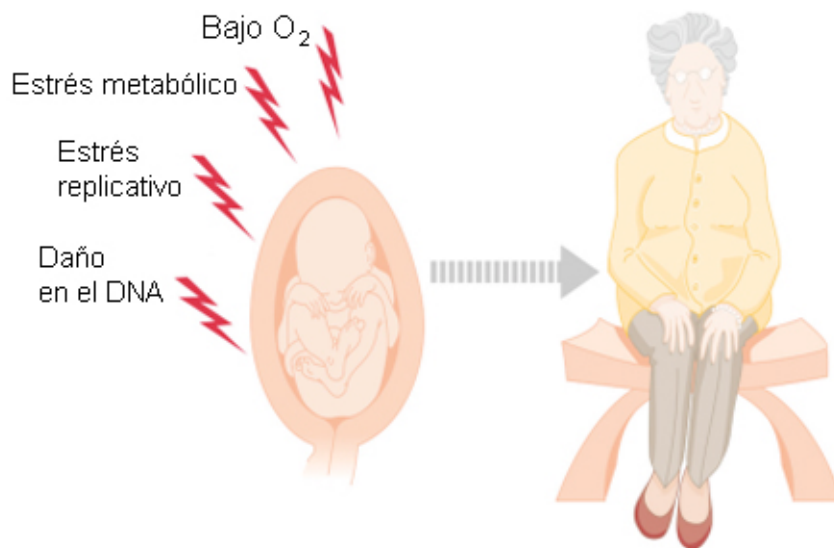
El envejecimiento es un proceso inherente a la vida cuyas causas no comprendemos en su totalidad. Como se ha comentado anteriormente, existen varios desencadenantes, como el acortamiento telomérico, el estrés oxidativo, agentes genotóxicos o el estrés replicativo. De todas estas causas, éste último es el menos entendido. Con este término nos referimos a todos aquellos problemas que pueden surgir de la horquilla de replicación, y que implican la aparición de largas regiones de ssDNA altamente recombinogénicas o incluso DSB (Lopez-Contreras, enviado). Una hipótesis sobre la naturaleza del estrés replicativo propone un desacoplamiento de las helicasas y las polimerasas en las horquillas de replicación (Byun et al., 2005), generando un daño en el DNA que activa la DDR. De hecho, se ha descrito que los tejidos y las ES envejecidos tienen activa la DDR (Rossi et al., 2007; Sedelnikova et al., 2004). Así, la acumulación de daño en el DNA se ha relacionado tanto con la senescencia como con el envejecimiento (Garinis et al., 2008; Lombard et al., 2005) y la activación de ATR produce senescencia dependiente de p53 (Toledo et al., 2008). Dadas estas observaciones, es lógico plantearse el papel de la DDR, y en concreto de ATR, en el envejecimiento.

La principal función de la ruta ATR/Chk1 es el establecimiento de los *checkpoints*. De hecho, ATR fue descrito como el ortólogo del principal regulador de los mismos en levaduras: Mec1p (Cimprich et al., 1996). Se han descritos numerosos sustratos de ATR, pero el principal efector es Chk1 (Matsuoka et al., 2007). Consistente con esta idea es el hecho de que la mayoría de sustratos de ATR permanecen en el sitio de la lesión, mientras que Chk1 se separa de la cromatina para extender la señal por todo el núcleo regulando a las CDKs vía Cdc25A (Bartek and Lukas, 2003; Smits et al., 2006). Además, la ausencia de Chk1 y de ATR producen un fenotipo similar: letalidad embrionaria preimplantacional causada por una acumulación masiva de daño en el DNA (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000b). Como se ha demostrado con los modelos murinos anteriores, el eje STR/Chk1 es esencial y en el caso de ATR no es posible ni una única fase de replicación. Como se ha comentado anteriormente, la actividad de esta ruta está restringida a las fases S

y G2 gracias a una estricta regulación. Para que Chk1 sea fosforilado por ATR, Claspin debe atraer a Chk1 a la cromatina (Chini and Chen, 2003; Liu et al., 2006). La expresión de ambos genes, Chk1 y Claspin, está regulada en el ciclo celular (son dianas de E2F1) (Carrassa et al., 2003; Iwanaga et al., 2006). Por otro lado, las estructuras a las que responden ATR y Chk1 aparecen principalmente cuando la célula replica. Se ha descrito que ATR regula la los orígenes de replicación, impidiendo su activación si no es necesaria y activándola cuando se detiene una horquilla de replicación vecina (Ge et al., 2007; Shechter et al., 2004). En los casos en los que la horquilla se detiene, ATR/Chk1 estimulan directamente la reparación mediante recombinación homóloga ya que Chk1 fosforila a la proteína Rad51 (Sorensen et al., 2005), lo cual es necesario para que comience la invasión de la hebra homóloga. Esta no es la única forma en la que ATR/Chk1 estimulan reparación ya que se ha demostrado que esta ruta también tiene una relación estrecha con las proteínas de la ruta de Anemia de Fanconi. La ausencia de ATR produce un defecto en la monoubiquitinación de FancD2, y FancM es necesaria para la activación de ATR (Andreassen et al., 2004; Collis et al., 2008).

La relación entre la DDR y la reparación con el envejecimiento sigue sin comprenderse del todo. De forma muy interesante, se conoce que la pérdida parcial de ATR produce un fenotipo de envejecimiento prematuro (Murga et al., 2009a) asociado a un alto nivel de estrés replicativo presente durante la fase embrionaria. Una hipótesis muy interesante que se ha propuesto es que las condiciones del desarrollo embrionario afectan a duración posterior de la vida del organismo (**figura 10**) (Fernandez-Capetillo, 2010) de tal manera que un estresante desarrollo embrionario implica una corta vida. Por otro lado, otro trabajo (Ruzankina et al., 2007) demuestra que la consecuencia de la ausencia de ATR en células en tejidos adultos es la rápida desaparición de las células sin ATR debido a problemas asociados a la replicación defectuosa y el consecuente desarrollo de fenotipos asociados al envejecimiento. En resumen, ambos trabajos apoyan la relación directa entre la acumulación de estrés replicativo y el envejecimiento. Si esto es así, cabe plantearse si lo contrario puede ser cierto: ¿podríamos aumentar la esperanza de vida con un mejor desarrollo intrauterino o con una mejor reparación del DNA? Una manera de explorar esta posibilidad sería combatir el estrés replicativo mejorando la respuesta de ATR/Chk1. Dado que ATR forma un complejo insoluble con ATRIP (Cortez et al., 2001) y que es una quinasa con múltiples sustratos (Matsuoka et al., 2007) parece lógico abordar esta cuestión desde el punto de vista de Chk1.

El estudio de la relación entre el estrés replicativo y el envejecimiento se ha basado en modelos murinos extremos, como es el modelo humanizado del Síndrome de Seckel descrito en (Murga et al., 2009b). Estos modelos han permitido entender su relación con ATR, pero representan situaciones que no se suelen dar en condiciones normales. Por ello, es necesario el estudio de esta ruta en condiciones fisiológicas. Por otro lado, cabe la posibilidad de que una mejor capacidad de respuesta mejor al estrés replicativo no implique una prolongación en la duración de la vida. Existen otros factores que influyen en esta duración, como la longitud telomérica o el estrés metabólico. Por ello, estudiar la respuesta mediada por ATR/Chk1 ante el estrés replicativo sería una manera de entender el peso que tiene éste en el envejecimiento.



**Figura 10. Las condiciones del desarrollo intrauterino afectan a la vida posterior del organismo.** Se representan varias causas que provocan un pobre desarrollo embrionario, entre las que se encuentra el estrés replicativo. Un alto nivel de estrés replicativo durante el desarrollo embrionario produce envejecimiento prematuro. Adaptado de (Fernandez-Capetillo, 2010).

### 3. 2. La relación entre Chk1 y la microcefalia

Por otro lado, y haciendo el estudio de Chk1 más interesante, se ha relacionado Chk1 con la microcefalia presente en los pacientes de varios síndromes (entre ellos el Síndrome de Seckel, el Síndrome de Nijmegen y la Microcefalia Primaria). Esta relación entre Chk1 y microcefalia se debe a BRIT1/MCPH1, una proteína que regula la expresión de Chk1 y de Brca1, la fosforilación de Nbs1 y la inhibición de CDK1 (Alderton et al., 2006; Lin et al., 2005; Stiff et al., 2005; Xu et al., 2004). Por una razón que aún no se comprende, los bajos

niveles de Chk1 afectan de forma especial al linaje neuronal, lo cual es la causa de la microcefalia (Lin et al., 2005). Consistente con esta relación entre Chk1 y la microcefalia, se ha descrito que otra enfermedad (enanismo osteodisplásico microcefálico tipo II, MOPDII) está relacionado con mutaciones en otra proteína (pericentrina PCNT) que produce la desregulación de Chk1 y de CDK1 en los centrómeros (Tibelius et al., 2009) sin afectar a ATR.

### 3. 3. El cáncer

La relación directa entre la DDR y la reparación del DNA con el desarrollo de tumores ha sido muy estudiada. Se ha propuesto que la DDR supone una barrera para el desarrollo tumoral en los primeros estadios de transformación. En estos momentos en los que hay una proliferación descontrolada producida por los oncogenes (algo que se puede entender como estrés replicativo) se activa la DDR (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis, 2005). En estos casos se activa una respuesta de senescencia que ya no se observa en tumores más avanzados (Braig et al., 2005; Collado et al., 2005). Por otro lado, los defectos en la principales rutas de reparación (HR y NHEJ) conducen a la acumulación de aberraciones cromosómicas. De hecho, existe un gran número de síndromes severos humanos asociados a defectos en mecanismos de reparación y señalización, todos caracterizados por la predisposición a diferentes tipos de cáncer entre otras patologías (Tabla 1). Muchos de estos síndromes han sido reproducidos en modelos murinos, mediante la sustitución dirigida de genes específicos por versiones no funcionales, o mutadas en sitios esenciales para su actividad.

Enfermedad	Gen mutado	Cuadro clínico
<i>Ataxia Telangiectasia</i>	ATM	Ataxia cerebelar, telangiectasia, inmunodeficiencia, tumores linfoides.
<i>Síndrome de Nijmegen</i>	Nbs1	Retraso en el crecimiento, microcefalia, inmunodeficiencia, tumores linfoides.
<i>HNPCC</i>	Sistema MMR	Cáncer colorrectal
<i>Xeroderma Pigmentosum</i>	Sistema NER	Alta sensibilidad a la luz UV, alta incidencia de tumores de piel.
<i>Lí-Fraumeni</i>	p53	Desarrollo acelerado de tumores (mama, sarcomas, tumores cerebrales, leucemias, etc.)
<i>Síndrome de Bloom</i>	BLM	Alta predisposición a todo tipo de tumores.

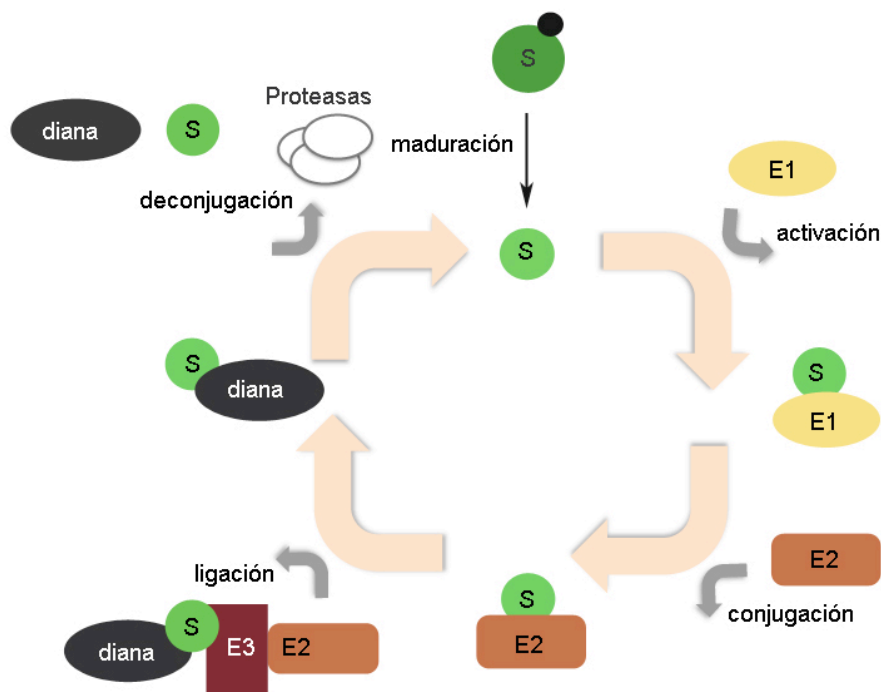
<i>Brca1/Brca2 familiar</i>	Brca1 y Brca2	Predisposición a desarrollar tumores de mama y ovario
<i>Anemia de Fanconi</i>	13 genes FA	Fallo de la médula ósea, predisposición a desarrollar leucemias y otros tumores.

**Tabla 1. Mutaciones en genes de la DDR producen enfermedades que predisponen al desarrollo de cáncer.**

Por otro lado, no es necesaria la completa pérdida de determinadas proteínas para desarrollar tumores, este fenómeno se conoce como haploinsuficiencia. ATR y Chk1 son sendos genes haploinsuficientes puesto que ratones con un solo alelo de ATR o de Chk1 tienden a desarrollar tumores más frecuentemente que los ratones silvestres (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000a). Este fenotipo se agrava enormemente en un fondo genético con otras mutaciones propensas a desarrollar tumores (Fang et al., 2004; Lam et al., 2004). Paradójicamente, aunque la pérdida de un alelo de ATR o Chk1 promueve el desarrollo de tumores, se están utilizando inhibidores de Chk1 en el tratamiento de tumores (Tao and Lin, 2006) ya que inhibir Chk1 es particularmente tóxico para células sin p53 (Koniaras et al., 2001). Esta paradoja se puede explicar por los niveles de Chk1. Mientras que poseer la mitad de la dosis predispone a la acumulación de mutaciones y el desarrollo de tumores, la inhibición completa de Chk1 es excesivamente tóxica para las células que replican muy rápido, como es el caso de las tumorales. En este sentido, se ha demostrado que ratones con muy bajos niveles de ATR no desarrollan tumores y que la eliminación de p53 no sólo no conduce a un mayor desarrollo de tumores sino que es muy tóxica para las células con bajos niveles de ATR (Murga et al., 2009a; Ruzankina et al., 2007). Éstas células sin ATR o sin Chk1 acumulan altísimos niveles de estrés replicativo, lo que sugiere que inhibidores de ATR y Chk1 serán particularmente tóxicos para tumores con altos niveles de estrés replicativo. Si bajos niveles de ATR y Chk1 son tóxicos para las células tumorales, un exceso de esta ruta también lo es. Se ha demostrado que la activación de ATR, aún en ausencia de daño en el DNA, produce senescencia tanto en células humanas como en murinas (Toledo et al., 2008). Por tanto, el estudio de la ruta ATR/Chk1 ofrece interés en el tratamiento antitumoral tanto desde el punto de vista de la pérdida de función como de la ganancia de función.

## 4. La señalización más allá de la fosforilación

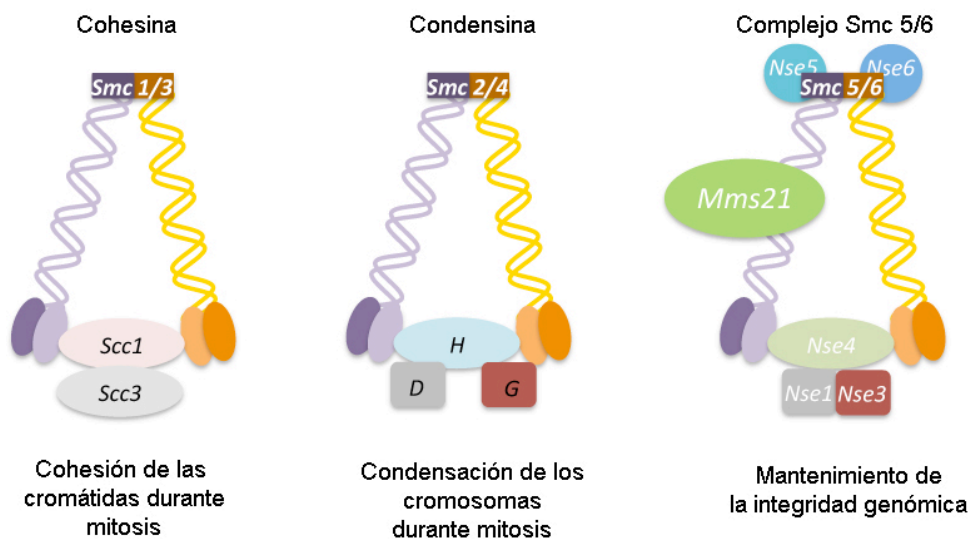
Como se ha comentado anteriormente, la respuesta al daño en el DNA no se puede entender sin otras modificaciones postraduccionales más allá de la fosforilación. Existen numerosas modificaciones, siendo la Ubiquitinación las más famosa. Esta modificación tiene un importante papel en la DDR (Huang and D'Andrea, 2006). Sin embargo, cada vez toman más relevancia otras, como es el caso de la SUMOilación (Hay, 2005; Morris, 2010). SUMO es un pequeño polipéptido de la familia de las Ubls (*Ubiquitin Like Proteins*), de estructura y sistema de conjugación similar a la Ubiquitina. Este sistema de conjugación es complejo y necesita de varias enzimas. Por ello, no podemos entender la SUMOilación sin esta cascada, que se representa en la **figura 11**. En primer lugar, SUMO debe ser madurado mediante un proteólisis mediante proteasas, llamadas SENPs y de las que existen varias. A continuación se une a la única enzima E1 activasa, que es un dímero formado por Sae1/Sae2. Luego se transfiere a la única E2 conjugasa, llamada Ubc9. Se ha descrito que la eliminación de Ubc9 causa letalidad embrionaria preimplantacional (Nacerddine et al., 2005) debido a la disrupción de numerosas rutas (Kuehn, 2005). Por último, las E3 ligasas confieren especificidad a la reacción de unión de SUMO a la proteína diana.



**Figura 11. El ciclo de la SUMOilación.** SUMO debe ser madurado para unirse a la E1 activasa. Ésta lo transfiere a la E2 conjugasa. Ésta puede ligarlo a la proteína diana ayudada por la E3 ligasa, que sólo confiere

especificidad a la reacción. Esta unión es reversible por la mismas proteasas responsables de la maduración de SUMO. Adaptado de (Hay, 2005).

Mms21 es una E3 SUMO ligasa que pertenece al complejo Smc5/6. Este complejo está formado por las proteínas Smc 5 y 6, así como por unas subunidades que reciben el nombre de Nse (*non Smc proteins*). Las primeras pertenecen a la familia Smc (*Structural Maintenance of Chromosomes*), a la que también pertenecen Smc 1 y 3 (que forman el complejo cohesina) y Smc 2 y 4 (complejo condensina) (Losada and Hirano, 2005). Los 3 complejos tienen una estructura similar (figura 12), sin embargo tienen funciones diferentes. Mientras que el papel de las condensinas y de las cohesinas está bien establecido, apenas se conocen detalles sobre el complejo Smc5/6. Cohesinas y condensinas tienen un papel fundamental en mitosis al mantener la cohesión y permitir la condensación de los cromosomas. Respecto al complejo Smc5/6, al comienzo de esta tesis se había relacionado con el mantenimiento de la integridad genómica ya que los mutantes defectivos presentaban anomalías en la segregación de cromosomas, hipersensibilidad al daño en el DNA, hiperrecombinación, etc. Sin embargo, su mecanismo de acción era desconocido, así como las rutas en las que interviene, y nada se sabía de su papel a nivel de organismo multicelular.



**Figura 12. Los complejos cohesina, condensina y Smc5/6.** Se muestra un esquema de los 3 complejos Smc y se resume el papel de cada uno de los complejos en la fisiología celular.

Cabe decir que Mms21 fue descubierta en levaduras (Prakash and Prakash, 1977), siendo los mutantes nulos letales y los mutantes hipomorfos hipersensibles a daño en el

DNA. En un primer momento no se asoció al complejo Smc5/6, aunque sí con el proceso de recombinación homóloga ya que las levaduras mutante para Mms21 mostraban niveles elevados de recombinación mitótica así como defectos en meiosis. Este fenotipo hiperrecombinogénico dependía de Rad52, ya que el doble mutante presentaba una disminución en los niveles de recombinación (Montelone and Koelliker, 1995). No fue hasta principios de esta década que se describió este complejo en células humanas (Taylor et al., 2001), así como los otros componentes asociados a este complejo en levaduras: Nse1, Nse2, Rad62 y Nse3, (McDonald et al., 2003; Morikawa et al., 2004; Pebernard et al., 2004; Sergeant et al., 2005). Más adelante este complejo se implicó en la respuesta al daño en el DNA y en el mantenimiento de la integridad genómica. Levaduras sin Smc6 funcional establecen un *checkpoint* de forma normal pero no son capaces de mantenerlo, y progresan a una mitosis defectuosa sin haber terminado de reparar su DNA (Harvey et al., 2004). Es en el año 2005 cuando se descubre que Nse2 es Mms21 y que posee un dominio SP-RING (*Siz1/PLAS RING*) con actividad SUMO ligasa conservado desde levaduras hasta células humanas (Andrews et al., 2005; Potts and Yu, 2005; Zhao and Blobel, 2005), así como que SUMOila a algunos componentes del complejo en respuesta a daño en el DNA. En levaduras, mutaciones que eliminan la actividad SUMO ligasa de Mms21 son compatibles con la vida, aunque generan hipersensibilidad al daño en el DNA, por lo que se propone una función esencial (no conocida) para el complejo no dependiente de la SUMOilación (Andrews et al., 2005). Se propone que estos mutantes presentan defectos en varios aspectos del metabolismo del DNA (como reparación, mantenimiento de los telómeros e integridad centromérica) debido a la inactividad SUMO ligasa de Mms21 y que el complejo Smc5/6 es el encargado de llevar esta actividad a los puntos donde es necesaria (Zhao and Blobel, 2005). En este sentido, se ha descrito un papel particular de este complejo en el mantenimiento del rDNA (Torres-Rosell et al., 2005a; Torres-Rosell et al., 2005b). Mutantes para Smc5 y para Smc6 acumulan uniones de Holliday (estructuras cruciformes) en este locus así como una desregulación de la integridad del nucleolo, lo cual apunta a un papel en la prevención de las uniones entre cromátidas asegurando una correcta segregación en mitosis. Otros estudios han localizado el complejo Smc5/6 en centrómeros y han sugerido un papel asociado a la longitud de los brazos cromosómicos (Lindroos et al., 2006). Respecto a la estabilidad telomérica, Mms21 también ha sido implicada en el proceso de mantenimiento de los mismos (Potts and Yu, 2007). La elongación de los telómeros depende de dos rutas: la principal es la dependiente de la enzima telomerasa



(Blasco, 2005) y la otra depende de la recombinación (Cesare and Reddel, 2010). Esta segunda, llamada ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) toma relevancia en las células transformadas que no han reactivado la telomerasa. Se ha demostrado Mms21 tiene un papel en este proceso ya que la SUMOilación de algunos miembros del complejo shelterina es importante para la localización de los telómeros a los cuerpos APB (*ALT associated PML bodies*), necesarios para la recombinación.

En resumen, la desregulación de la DDR tiene consecuencias que abarcan procesos tan dispares como el envejecimiento y la transformación celular. De esta primera consecuencia tenemos muy poco conocimiento, pero parece que ATR y Chk1 están altamente implicados. Por otro lado, Chk1 parece tener un papel fundamental en la protección frente a la microcefalia, fenotipo presentado por varios síndromes asociados a la inestabilidad genómica. Este fenotipo parece deberse a una especial sensibilidad de los precursores neuronales al estrés replicativo. Por tanto, decidimos estudiar hasta qué punto Chk1 es responsable de los defectos asociados a la respuesta deficiente al estrés replicativo y estudiar su papel en la protección frente al envejecimiento y la microcefalia.

Por otro lado, existen evidencias cada vez mayores de la implicación de otras modificaciones postraduccionales en la DDR. El complejo Smc5/6 y la E3 SUMO ligasa Mms21 han sido implicados en varios procesos relacionados con el metabolismo del DNA, especialmente con la reparación mediante recombinación homóloga. El estudio de esta proteína ofrecía un interesante campo de estudio acerca de la señalización no basada en la fosforilación y relacionada con la respuesta al daño en el DNA, especialmente en un organismo modelo mamífero dada la ausencia de información sobre este complejo y la relación con la protección frente al cáncer.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1. Desarrollo de un modelo murino de ganancia de función para la quinasa Chk1 (Súper Chk1).
  - a. Evaluar si una mayores niveles de Chk1 son suficientes para establecer una respuesta el estrés replicativo más sensible.
  - b. Evaluar si una mejor respuesta mediada por Chk1 puede paliar los fenotipos asociados a bajos niveles de ATR: envejecimiento por acumulación de estrés replicativo.
  - c. Evaluar el papel de Chk1 en la protección frente a la microcefalia y en el desarrollo tumoral.
  
2. Desarrollo de modelos murinos de pérdida de función y con una mutación inactivante para la E3 SUMO ligasa Mms21.
  - a. Estudio del papel de Mms21 en el mantenimiento de la integridad genómica.
  - b. Estudio de la relación entre Mms21 y la recombinación homóloga.
  - c. Estudio del papel de Mms21 en la supresión tumoral.
  - d. Estudio del papel de la SUMOilación llevada a cabo por Mms21 en la DDR.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. Biología Molecular y Celular**

### **1. 1. Anticuerpos utilizados**

anti-Actina (Sigma), anti-Brcal (anticuerpo generado por el laboratorio del Dr. Nussenzweig), anti-Chk1 (Novocastra), anti-Chk1 P (Cell Signaling), anti  $\gamma$ H2AX (Upstate), anti-Histona 3 Serina 10 P (Upstate), anti-Mms21 (humano y murino: monoclonal y policlonal respectivamente generados en la Unidad de Anticuerpos Monoclonales del CNIO), anti-PICH (anticuerpo generado por el Dr. Nigg), anti-Scp3 (anticuerpo generado por el laboratorio del Dr. Nussenzweig), anti-Smc5 (Santa Cruz)

### **1. 2. Clonaje con la tecnología Gateway**

La estrategia de la tecnología GateWay (Invitrogen) se basa en la recombinación. Para clonar los diversos plásmidos utilizados, primeros se diseñaron oligos específicos de secuencia al que se añadió una secuencia predeterminada (CACC) en el oligo 5' (*forward*) para permitir el clonaje direccional. Tras realizar la PCR, se realizó una reacción de ligación según las indicaciones del fabricante (Invitrogen) y se transformó el producto. Tras la purificación y análisis de los transformantes, se seleccionaron los plásmidos pENTR SD TOPO que habían integrado correctamente el inserto. A continuación se realizó la siguiente reacción para recombinar el inserto en los pDEST de interés (según las condiciones del fabricante).

### **1. 3. Ensayo de supervivencia**

Células U2OS fueron transfectadas, o no, con siRNA específicos para Mms21 (oligos Stealth, Invitrogen) y tratadas con diferentes concentraciones de MMS (0.002 M, 0.005 M, 0.01 M, 0.025 M y 0.05 M) durante 1 hora. Previa recuperación de 24, 48 y 72 horas, las células se fijaron y tiñeron con 0.1 M cristal violeta en 2% metanol. Una vez secas se resuspendieron en 1% SDS y se cuantificó la DO a 595 nm.

## **1. 4. Expresión y purificación de proteínas**

Para la expresión de Mms21 murina recombinante, el plásmido pDEST GST-Mms21 se transformó en bacterias BL21. Se inoculó una colonia toda la noche en medio LB a 37 °C y, a la mañana siguiente, se añadió IPTG 1 mM para inducir la expresión de la proteína durante 3 horas a 30°C para minimizar la degradación de la misma. A continuación, se centrifugaron las bacterias y se lisaron en frío en solución de lisis (50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM de PMSF). Tras tratar con lisozima y sonicar, se centrifugó para eliminar las paredes celulares. Al sobrenadante se añadió 0.5 M NaCl y 1% Triton X100 y se incubó con sefarosa-GSH (Amersham) durante una hora. Tras los lavados en solución de lisis suplementada con 1% Tritón X100 y 0.5 M NaCl, la sefarosa-GSH se incubó 20 minutos en frío con solución de lisis suplementada con 0.05 M NaCl y 10 mM Glutation reducido (Sigma) para eluir la proteína recombinante.

## **1. 5. Fijación e inmunotinción de células**

A no ser que se indique otra cosa, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de cultivo.

### **1. 5. 1. Fijación convencional**

Las células se fijaron con 2% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y se permeabilizaron con una solución de 0.1% de citrato sódico y 0.1% de Tritón X-100 durante 5 minutos. A esto le siguieron 2 lavados con PBS y 2 lavados de 5 minutos con una solución compuesta por 0.25% BSA y 0.1% Tween20 en PBS. Se bloquearon las células con 2.5% BSA, 0.1% Tween20 y 10% de suero de cabra en PBS durante 30 minutos. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y tras 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con solución de lavado se incubaron los cristales con el anticuerpo secundario anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra conjugado a un fluoróforo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo secundario de la misma manera y se tiñeron los núcleos con una solución que contenía DAPI (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos para proceder al lavado de las células posteriormente y montar los cristales con medio de

montaje sobre portaobjetos para la visualización de las muestras en un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager Z1 con tecnología Apotome y cámara Orca 1394 (Hamamatsu).

### **1. 5. 2. Fijación con preextracción**

Este protocolo permite visualizar mejor las proteínas unidas a cromatina. Para ello, las células se lavaron con PBS 1x y se trataron durante 6 minutos con la solución CSK1 (10 mM PIPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM Sacarosa, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.5% Tritón X100) en hielo. Se hicieron 5 lavados con PBS 1x frío y se incubaron durante 30 minutos en la solución mSTF (150 mM BNP, 108 mM diazolidinil urea, 10 mM citrato sódico, 50 mM EDTA pH 5.7) a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las células y se incubaron durante 15 minutos en la solución PB (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM EDTA pH 8, 0.5% Tritón X100). A continuación se lavaron las células y bloquearon en las condiciones descritas en el apartado “Fijación Convencional”.

### **1. 5. 3. Fijación y tinción de mórulas**

Este protocolo mantiene la estructura de las mórulas a la vez que permeabiliza la zona pelúcida del embrión. Dado que las mórulas no se adhieren a cubreobjetos, conviene usar placas MicroTest Plate (Greiner Bio-one) tanto para los lavados como para las incubaciones de los anticuerpos y transferir las mórulas de pocillo en pocillo con una pipeta de boca tratando de transportar las mismas en el mínimo volumen posible. Si es necesario hacer incubaciones largas a temperatura ambiente, es recomendable mantener la placa en una cámara húmeda. Para minimizar la mezcla de soluciones conviene hacer lavados seriados, transfiriendo las mórulas de pocillo en pocillo varias veces. Una vez se tuvieron extraídas las mórulas (ver más abajo) se transfirieron con pipeta de boca a la solución PTEMF (0.2% Tritón X100, 20 mM PIPES pH 6.8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 4% paraformaldehído) y se incubaron durante 10 minutos en un pocillo de la placa. Después se lavaron en PBS transfiriéndolas a varios pocillos y se bloquearon en PBS con 3% BSA durante media hora e incubaron con los anticuerpos primarios adecuados durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se lavaron en PBS con 0.2% de Tween 20 e incubaron otras 2 horas con el anticuerpo secundario conveniente. Tras lavar en PBS, se incubaron 10 minutos en una solución de SSC 2x con DAPI, se lavaron de nuevo y se montaron en portaobjetos para su estudio al microscopio. Para este último paso se transfirieron las mórulas a una gota de PBS en el porta y se dejó evaporar la gota al aire

hasta que se ve el perfil de las mórulas bajo la lupa. A continuación se puso una gota de medio de montaje (mowiol) y se puso el cubreobjeto encima.

## **1. 6. FISH (Hibridación in situ Fluorescente)**

Previamente recogimos y lavamos MEFs procedentes de los genotipos de interés y los incubamos en 75 mM KCl durante 20 minutos. A continuación se fijaron en una solución fría de metanol: acético en proporción 3:1 y se mantuvieron toda la noche a -20°C. Al día siguiente se extendieron las células para observar las metafases sobre portaobjetos, se dejaron secar al aire durante varias horas y se deshidrataron incubándolas de forma seriada en alcohol al 75%, 90% y 100%.

La preparación de la sonda utilizada para la hibridación in situ fue realizada por el Grupo de Citogenética Molecular del CNIO. Brevemente, se marcaron unos 4 µg de las sondas (usando SyBR Green para el vector Super Chk1 y SyBR Orange para los BACs que contenían las secuencias de interés del cromosoma 12) con el *kit* CGH Nick Translation Reagent (Abbott Molecular Inc.). Posteriormente se calentaron 5 minutos a 96 °C y se incubaron a 90 °C durante 10 minutos. Finalmente esta mezcla se añadió sobre las preparaciones de metafases usando la solución LSI (Visis, Abbott Molecular Inc.) y se mantuvieron a 37 °C toda la noche. A la mañana siguiente se lavaron las preparaciones usando las siguientes soluciones: 0.4xSSC 0.3%NP40 durante 5 minutos a 75 °C, 2xSSC 0.1%NP40 durante 5 minutos en agitación y PBD (Solución de lavado, Poseidón) y finalmente se tiñeron con DAPI y se montaron usando Mowiol. El análisis se hizo en un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

## **1. 7. Genotipado de los embriones Mms21 KO mediante *nested PCR***

Los embriones se lisaron en 20 ml de tampón de lisis (10 mM Tris pH8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20, gelatina 0.01%, 1 mg/ml de proteinasa K) durante 2 horas y la muestra se desnaturalizó a 99°C durante 10 minutos. A continuación, se realizó una PCR con los siguientes oligos (PCR 1):

FW N1: AATGACATGACTGCCTCTGCTTC

RV WT N1: ACTTGGAGTACTAGGGGAACCA

RV GT 6: AAGTGACCCTCCCAACAGCTTC



A continuación, el producto de PCR fue diluido 100 veces y se realizó una segunda PCR con los siguientes oligos:

46NESTED2 = FW N2: TCCTTCCCCTACTACAGTCTCAG  
 RV WT N2: TAAAGCAGGGCCTCACTAAATGG  
 RV GT 5: GTAAAGTGGTAGGGGTCTTGGGT

El tamaño de las bandas generadas en este caso fueron de 500 bp para el alelo silvestre y 180 bp para el KO. En ambos casos la PCR se realizó con BioTaq.

## 1. 8. Identificación del punto de integración del vector Súper Chk1

Este protocolo fue realizado por el Dr. Orlando Domínguez, Jefe de la Unidad de Genómica tal y como se especifica en (Dominguez and Lopez-Larrea, 1994). Para ello partió de DNA de una de las líneas de microinyección a 50 ng/ml en TE10:0.1 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8) y se realizaron 2 PCRs consecutivas con los siguientes oligos:

WP\_26C7: TTTT\*TTT\*TTT\*TTGTTTGT\*TTGTGGGGGTGT  
 Short WP\_26C9: TT\*TTT\*TT\*TTGTT\*TTGT\*TTGTGGG  
 SP\_26C5: CTATGGGATCTCTGTGCTTTTGTAGT  
 SPint\_26C6: CCTGACGCTACTGAATC

La primera PCR se hizo en las siguientes condiciones: 20 ng de DNA, 20 pmol de WP\_2C7 y agua hasta 10 µl. Esta mezcla se incubó 30 segundos a 90°C y 10 segundos a 80°C. A continuación se añadió la mezcla con la DNA polimerasa: 4 µl de tampón 5x (42.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 62.5 mM Tris-HCl pH 8, Tween-20 0.25% y TritonX-100 0.25% esterilizado con filtro de 0.2 µm y expuesto 10 minutos a luz UV), 2 µl de dNTPs (2 mM cada uno) y 0.08 µl Taq DNA Polimerasa (Amplitaq, Perkin-Elmer). Inmediatamente, los tubos se incubaron 10 minutos en un baño a 15 – 20°C (condiciones poco astringentes) para permitir la primera extensión, que se finalizó incubando los tubos 30 segundos a 75°C. A continuación se pasaron los tubos a 99°C y se añadieron 20 pmol del oligo SP\_26C5. La PCR 1 se realizó en las siguientes condiciones: 94°C 30 segundos, 63°C 30 segundos y 75°C 30 segundos (30 ciclos) y un ciclo final de 75°C 7 minutos. Para realizar la PCR 2 (*nested*) se diluyó el producto de la PCR 1 mil veces (y se consideró 5x) y se realizó en condiciones similares con las siguientes variaciones: se usó Platinum Taq (Invitrogen), se usaron los oligos Short WP\_26C9 y SPint\_26C6 (0.5 mM) y la temperatura de anillamiento fue 55°C.

El producto de esta PCR fue secuenciado por el método de Sanger y se alineó con la secuencia genómica del ratón.

### **1. 9. Medida de la proliferación por incorporación de BrdU**

Para analizar la proliferación de células Brca1 silvestres y Brca1 D11/D11 se incubaron las mismas durante 2 horas con 10 mM 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) (BD Pharmingen). Las células se fijaron con 70% de etanol en PBS frío durante 20 minutos y el ADN fue desnaturalizado con una solución de pepsina (0.5 mg/ml, 0.1 N HCl). De esta forma, el BrdU incorporado puede ser marcado con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU-FITC (BD Pharmingen), incubado en un tampón con 1% de BSA (Albúmina sérica bovina) (BSA fraction V, Hoffmann-La Roche Inc, Nutley, NJ) y 0.5% de Tween20 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendieron las células en una solución de 1% de BSA, 10 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y 100 µg/ml de RNasa (Qiagen) en PBS, se incubaron durante toda la noche a 4°C. El perfil de ciclo celular y la incorporación de BrdU se analizaron en un citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences) usando un láser de 488 nm y los detectores 530/30-*Blue* para medir Alexa488, y 585/42-*Blue* para yoduro de propidio. Los datos se analizaron con el programa FlowJo.

### **1. 10. Medida del *checkpoint* G2/M**

Las células en cultivo fueron tratadas con diferentes dosis de radiación gamma (0.1 Gy; 0.25 Gy; 0.5 Gy; 1 Gy; 2.5 Gy y 5 Gy) y, tras 45 minutos en cultivo para permitir el establecimiento del *checkpoint*, se recogieron y fijaron en frío con etanol al 70% en PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron durante 15 minutos sobre hielo con 0.25% Tritón X-100 en PBS. Tras su centrifugación, las muestras (entre  $5 \times 10^5$  y  $10^6$  células) se incubaron con 0,75 µg del anticuerpo primario que detecta la fosforilación en la serina 10 de la histona 3 (Upstate 06-570), una marca epigenética de entrada en mitosis, disuelto en 1% de BSA en PBS (solución de bloqueo) durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con esta solución, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 488 diluido 1/200 en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células y resuspendieron en solución de bloqueo con 10 µg/ml de yoduro de propidio y 100 µg/ml de RNasa y se incubaron durante 30 minutos a 37°C o toda la noche a 4°C. Se analizó el perfil de ciclo celular y los eventos fosforilados en un citómetro BD FACSCanto II usando un láser de

488 nm y los detectores 530/30-*Blue* para medir Alexa488 y 585/42-*Blue* para yoduro de propidio. Los datos se analizaron con el programa BD FACSDiva.

## **1. 11. Microscopía de alto rendimiento**

Para inmunofluorescencia de alto rendimiento (*High Throughput Microscopy* o HTM) se cultivaron las células en placas de 96 pocillos con fondo plano de cristal (Greiner Bio-One). Se utilizaron los mismos protocolos de tinción que en inmunofluorescencia convencional, salvo que las preparaciones se dejaron en PBS en lugar de medio de montaje. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de lectura automatizada, BD Pathway 855 BioImager (Beckton Dickinson) a temperatura ambiente y empleando un objetivo seco de 20 aumentos. El análisis de imagen y cuantificación de la señal de fluorescencia se realizó con el software AttoVision (Beckton Dickinson). El método que permite la adquisición de imágenes de forma automatizada y su posterior análisis se describe brevemente a continuación. El microscopio robotizado captura imágenes en diferentes puntos de una placa, de 96 pocillos en este caso, en distintos canales de fluorescencia según una matriz personalizable. Una vez adquiridas las imágenes, el software de análisis permite delimitar regiones de interés en función de parámetros visuales que se identifican como objetos individuales. En nuestro caso, cada núcleo es reconocido por el contraste de intensidad de la tinción del ADN con DAPI respecto al fondo de la imagen. De esta forma se define una máscara de objetos que nos sirve para filtrar las imágenes capturadas en todos los canales, pudiéndose analizar la parámetros dentro de esos objetos, como puede ser la intensidad de fluorescencia dentro del núcleo. Se genera una lista de todos los objetos (núcleos) y los parámetros analizados. Éstos se pueden representar en una gráfica directamente, atribuyendo un punto a cada objeto, o indirectamente a través de la media para cada tratamiento o condición. Se pueden hacer análisis más complejos como la identificación de objetos dentro de otros objetos: esta tecnología permite delimitar objetos en función de la tinción (definimos los núcleos como aquello teñido con DAPI), filtrar con estos objetos otro canal y dentro de ellos buscar otros más pequeños (por ejemplo, focos de la proteína 53BP1 teñidos con Alexa-488). De esta forma se puede determinar cuántos focos de 53BP1 existen por núcleo e, incluso, analizar características como su tamaño.

## **1. 12. Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales**

Tras purificar al menos 500 µg de proteína, se procedió a la inmunización de 2 ratones Balb-c mediante inyección intraperitoneal de 50 µg cada vez 4 veces (días 1, 15, 35 y 55 tras la primera inmunización) junto con adyuvante completo de Freud de (DIFCO). A día 55, se purificaron células B y se fusionaron con la línea de mieloma NS-1 generando clones que se analizan para determinar su capacidad de producción de anticuerpos de interés. La selección de los clones positivos se hace mediante técnicas de inmunohistoquímica, ELISA e inmunotinción de células transfectadas con plásmidos que sobreexpresan el antígeno de interés. Tan pronto como se identifica como positivo un clon se somete a un proceso de clonación. Cuando el cultivo llega a confluencia el sobrenadante se centrifuga y se le añade azida sódica. Este proceso fue realizado por la Unidad de Anticuerpos Monoclonales del CNIO.

Para la producción del anticuerpo policlonal contra Mms21 murina se purificó proteína recombinante de forma similar a la descrita anteriormente (realizado por la Unidad de Proteómica del CNIO), y se inmunizaron 2 conejos (realizado por la Compañía VivoTecnica; Tres Cantos, España). Al final del proceso, obtuvimos los sueros de ambos conejos, a partir de los cuales purificamos los anticuerpos.

## **1. 13. Purificación de anticuerpos de suero**

Brevemente, los anticuerpos del suero fueron purificados usando la resina AphiGel 10 o 15, según el pI de la proteína (BioRad) acoplada a la proteína recombinante usada como antígeno empaquetada en columnas. Tras lavar la resina con TBS y 6 M Guanidina-HCl se añadió el suero filtrado, y la resina fue lavada otra vez con TBS, una solución compuesta de 20 mM Tris HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl y 0.2% Tritón X100. Por último, se eluyó la columna en 2 pasos, usando 0.2 M Glicina-HCl pH 2 y 0.15 M NaCl y, después, con 6M Guanidina-HCl. Ambas fracciones fueron dializadas contra TBS y medida su concentración a  $DO_{280}$ .

## **1. 14. SCE (intercambio de cromátidas hermanas)**

Una vez extraídos los linfocitos y estimulados adecuadamente para que proliferaran, se trataron durante 48 horas (en 2 pulsos de 24 horas) con 10 mM 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) (BD Pharmingen) para permitir 2 rondas de replicación en presencia del análogo. A

continuación se trataron durante 3 horas con 10 mg/ml de colcemida (Gibco) para detener las células en mitosis. Se recogieron y lavaron con PBS 1x e incubaron en 75 mM KCl durante 20 minutos. A continuación se fijaron en una solución fría de metanol: acético en proporción 3:1 y se mantuvieron toda la noche a -20°C. Al día siguiente se prepararon las metafases y se dejaron secar al aire durante varias horas para permitir una correcta fijación al porta. Seguidamente se incubaron durante 30 a 45 minutos en 10 mg/ml de Hoescht 33258 (Invitrogen) en la oscuridad. Luego se enjuagaron suavemente en solución McIlvaine (164 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 16 mM ácido cítrico pH 7) y se irradiaron durante 60 a 90 minutos con luz UV (365 nm) sumergidas ligeramente en solución McIlvaine. A continuación se transfirieron a una solución SSC 2x a 55°C durante 50 minutos y trataron con una solución de 0.05% tripsina en PBS durante 20 segundos. Por último se lavaron con agua y tiñeron con Giemsa 1x (Sigma) durante 15 minutos para revelar las cromátidas hermanas, que se tiñen diferencialmente.

### **1. 15. Southern Blot (Mms21 KI)**

Se digirieron aproximadamente 15 µg de DNA genómico con las enzimas de digestión adecuadas durante 12 horas a 37°C en una solución que contenía tampón de digestión y 0.1 mg/ml de BSA. Para analizar la inserción por recombinación homóloga de nuestra construcción en el extremo 5' se realizó la digestión con la enzima BamH1 (NewEngland BioLabs), mientras que para el extremo 3' se digirió con la enzima de restricción EcoRV (Roche). El material digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% a bajo voltaje durante un tiempo suficiente para que el DNA se fraccionara adecuadamente en el gel. Posteriormente se desnaturalizó el DNA incubando el gel en una solución de 0.25 M de HCl durante 15 minutos, se hizo un lavado con agua destilada, y se trató en segundo lugar durante 45 minutos con una solución desnaturalizante compuesta por 0.4 M de NaOH y 0.6 M de NaCl. Tras un aclarado con agua destilada, se trató el gel con una solución neutralizante de 0.5 M de Tris-HCl pH 7.5 y 1.5 M de NaCl durante 30 minutos. Todos los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en agitación suave. El DNA se transfirió mediante difusión en SSC 10X a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond XL, Amersham, Buckinghamshire, UK) durante un mínimo de 12 horas. Después, se favoreció la unión covalente del DNA a la membrana tratándola con luz ultravioleta en un aparato *Stratalinker* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La membrana se prehibridó con solución de hibridación a 65°C durante

un mínimo de dos horas. La solución de hibridación (0.25 M tampón fosfato sódico pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS). Durante la prehibridación se procedió al marcaje radioactivo de la sonda. Para ello se disolvieron 20 ng de sonda en un volumen final de 45 µl de TE, la sonda se desnaturalizó a 99°C, se amplificó según las instrucciones del sistema Random Prime (Stratagene) con 50 µCi de [32P] dCTP y se purificó mediante filtración en una columna de Sephadex G-50 (ProbeQuant GE Healthcare). Se hibridó el DNA transferido a la membrana con la sonda a 65°C durante toda la noche en solución de hibridación en presencia de 0.05 mg/ml de esperma de salmón (Invitrogen). Una vez concluida la hibridación, la membrana se lavó 10 minutos con una solución SSC 2x, luego durante 30 minutos con una solución de SSC 2x y 1% SDS y finalmente durante 15 minutos con una solución de SSC 0.2x y 0.1% SDS. Tras los lavados se expuso la membrana en un *cassette* de exposición con una pantalla de detección PhosphorImager durante el tiempo conveniente y se reveló la imagen con un escáner Typhoon TRIO (GE Healthcare).

Las sondas para el análisis de la recombinación homóloga por ambos lados se generaron a partir de DNA genómico con los siguientes oligos:

Sonda 5´	Fw LA 2: TTTCGGGCCTAATTGAAAAAGTA
	Rv LA 2: GGCATTCGAGAGTGTC'TTCTT
Sonda 3´	Fw RA 3: ACC'TTTTACTCTGCGTTTCCTG
	Rv RA3: CGAGGTGAGGGAATTAAGAATG

## **1. 16. Tinción de espermatozoides**

Una vez extendidos los espermatozoides en portaobjetos, se trataron durante 3 minutos con solución 1 (2% PFA, 0.03% SDS), luego con solución 2 (2% PFA) y finalmente con solución 3 (0.4% PhotoPlo, Kodak) durante 1 minuto. Para la tinción, los portaobjetos se equilibraron en PBS 1x y bloquearon durante 2 horas en solución de bloqueo (10% suero de cabra, 3% BSA, 0.05% Triton X100). Los anticuerpos primarios de interés se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los portaobjetos con PBS 1x con 0.4% de PhotoPhlo (Kodak), seguido de PBS 1x con 0.01% Tritón X100 y finalmente con PBS1x. Se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios necesarios, se volvieron a lavar en la mismas condiciones y se montaron con Vectashield con DAPI (Vectors Lab).

### **1. 17. *Western blot***

Los extractos de proteínas se obtuvieron mediante lisis de las células sobre hielo durante 15 minutos con solución RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 1% de NP-40, 0.25% de Na-deoxycolate, 150 mM de NaCl y 1 mM de EDTA) suplementada con inhibidores de proteasas (1 mM de PMSF; 1 µg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina y 1 mM de NaF) y de fosfatasa (mezcla de inhibidores de fosfatasa I, Sigma-Aldrich) y su posterior centrifugación a 16000 g para eliminar los restos celulares. Se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford. Los extractos proteicos se separaron en geles de gradiente 4-12% SDS-PAGE (Tris-Acetato Nupage Novex, Invitrogen), desnaturalizando previamente las proteínas por incubación a 99°C durante 5 minutos y las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL Nitrocelulosa, Amersham) por transferencia húmeda. Una vez realizada la transferencia, las membranas se bloquearon con solución de bloqueo compuesta por TBS con 0.1% de Tween20 (TBS-T) y 5% de leche (Central Lechera Asturiana) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo y tras 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se incubaron las membranas por segunda vez con anticuerpos secundarios conjugados a un fluoróforo durante 1 hora a temperatura ambiente. La visualización de las proteínas se realizó con un escáner Li-cor (BD Biosciences) que permite una adquisición digital lineal para análisis cuantitativos.

## **2. Células**

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (4.5 g/L Glucosa ; L-Glutamina) (Lonza, Switzerland) con 10% de suero bovino fetal (FBS) (South American Origin, Lonza) inactivado y una mezcla de penicilina y estreptomina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), a no ser que se indique lo contrario. Las células utilizadas fueron: U2OS, Hela, 3T3 y MEF y linfocitos B procedentes de ratones de varios genotipos. Se mantuvieron en incubadores a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, salvo los MEF, que se mantuvieron en condiciones de hipoxia en incubadores a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>.

## **2. 1. Transfecciones con siRNA y tratamientos**

Las transfecciones fueron realizadas con lipofectamina 2000 (Invitrogen), usando una concentración final de siRNA de 20 nM. Las células transfectadas se analizaron a las 48 a 72 horas posteriores a la transfección.

Los tratamientos con drogas se realizaron de la siguiente manera:

- MMS: a las concentraciones indicadas en cada experimento, durante 1 hora. En el ensayo de supervivencia se esperaron 1, 2 y 3 días postratamiento. En los demás experimentos se analizaron las células a la mañana siguiente del tratamiento (16 a 18 horas).
- Inhibidor de PARP, iPARP o iP: 1  $\mu$ M KU-0059436 (Astra Zeneca) durante 1 u 8 horas y se analizaron las células 16 a 18 horas postratamiento.
- Afidicolina: 0.2  $\mu$ M durante 18 horas.

## **2. 2. Generación de MEF (fibroblastos embrionarios murinos)**

Ratones hembras y machos del genotipo de interés se cruzaron hasta observar tapones vaginales. A los 13.5 días se sacrificó a la hembra y se extrajeron los embriones. En condiciones estériles, a cada embrión se le retiró el hígado fetal y un pequeño fragmento de la cabeza del cual se obtiene ADN para su posterior genotipado. El resto fue troceado con una cuchilla, incubado 5 a 10 minutos en tripsina 0.25%, EDTA (Gibco), pipeteando de vez en cuando para disgregar los acúmulos de células, y neutralizado con medio DMEM (4.5 g/L glucosa, L-Glutamina sin piruvato (Gibco) suplementado con 10 a 15% de suero fetal bovino (FBS) inactivado (20 minutos a 55°C) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). El sobrenadante se transfirió a una p100 que se mantuvo en incubadores a 37°C en condiciones de hipoxia (5%). Al día siguiente se cambió el medio para retirar las células muertas y sanguíneas. El pase 0 se cultivó en medio sin piruvato y los pases subsiguientes en medio con piruvato.

## **2. 3. Extracción de linfocitos B del bazo**

Para la purificación de linfocitos B del bazo se extrajeron los bazos enteros y disgregaron mecánicamente en solución de lavado: PBS 1x, seroalbúmina bovina (1% BSA Fraction V, Roche). El sobrenadante se trató durante 5 minutos con una solución



hipotónica (ACK Lysing Buffer, Lonza), que se inactivó con solución de lavado. A continuación, se eliminaron los agregados celulares con un filtro de 40  $\mu\text{m}$  y se centrifugó el lisado 5 minutos a 1500 rpm. El sedimento se resuspendió en 900  $\mu\text{l}$  de solución de lavado, al que se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de esferas magnéticas conjugadas a anticuerpo anti-CD19 de ratón (Mouse CD19 MicroBeads, Miltenyi Biotech, Germany), y se incubó la mezcla a 4°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se lavaron las células, resuspendieron en 1 ml de solución de lavado y transfirieron a una columna separadora (MS Columns, Miltenyi) colocada en un soporte magnético (OctoMACS separator, Miltenyi). La aplicación de un campo magnético permite separar las células unidas a las esferas. Tras lavar la columna, se eluyeron en solución de lavado fuera del campo magnético. Los linfocitos B primarios se mantuvieron en cultivo ( $1 \times 10^6$  células/ml) en medio RPMI (Euroclone) suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina (Gibco, Invitrogen), 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Lonza), piruvato sódico (Gibco, Invitrogen), 50 mM de b-mercaptoetanol (Gibco, Invitrogen) y 10 mM de HEPES (Lonza) al que se añadió 25 mg/ml de lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para la estimulación de las células.

## **2. 4. Curva de proliferación**

Para la obtención de curvas de crecimiento de MEF, se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células en una placa de 60  $\text{mm}^2$ , 2 días después se contaron y se sembró de nuevo el mismo número de células (protocolo 3T3) (Todaro and Green, 1963). El incremento de PDL (*population doublings*) se calculó aplicando la fórmula  $\text{DPDL} = \log(n_f / n_0) / \log 2$ , donde  $n_0$  es el número inicial de células y  $n_f$  es el número final de células en cada pase.

## **2. 5. Purificación de espermatoцитos**

Para purificar espermatoцитos se extrajeron testículos, disgregaron ligeramente e incubaron en medio RPMI 1640 con L-Glutamina (EuroLone) con aminoácidos no esenciales (Lonza), penicilina/estreptomicina (Gibco) suplementado con 5 mg/ml de colagenasa II (Gibco) y 7.5% de carbonato sódico a 35 °C en agitación (60 rpm) durante 15 minutos hasta la separación de los túbulos. Seguidamente se retiró el medio sobrante y añadió tripsina 0.25%, EDTA (Gibco), medio RPMI y DNasaI hasta la completa disgregación de los mismos. A continuación, se filtró el líquido con un filtro de 40  $\mu\text{m}$ , añadió 0.5 mg/ml de SBTI (Soybean Tripsin Inhibitor, Gibco), centrifugó en frío y lavó

con medio. Para hacer preparaciones, se resuspendieron las células en 0.5% NaCl y dispusieron en gotas en portaobjetos, dejándolas secar brevemente.

## **2. 6. Extracción de mórulas**

Para extraer óvulos fecundados, mórulas o blastos es necesario hormonar hembras prepúberes del genotipo de interés con 5 unidades de gonadotropina sérica (PMSG, Foligón 500, InterVet) 36 horas antes del cruce seguido de 5 unidades de gonadotropina coriónica humana (hCG Lepori) 8 a 12 horas antes del cruce. Tras la monta, se sacrifican las hembras a día de interés mediante dislocación cervical, se extraen los cuernos uterinos junto con los oviductos y se depositan en medio M2 (Sigma). Con una jeringa de 1ml acoplada a una aguja de 30G a la que se ha eliminado el bisel, se perfunden los oviductos bajo la lupa. Para ello, hay que apoyar la aguja en el comienzo del útero, llamado infundíbulo (identificable por estar engrosado). Los embriones se cultivan placas de cultivo en gotas de medio KSOM (Chemicon) cubiertas con aceite mineral (para estudiar el desarrollo hasta el momento en que evaginan de la zona pelúcida) o se fijan directamente para su tinción.

## **3. Ratones**

Todos los BACs se compraron al BACPAC Resources Center del Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI).

### **3. 1. Generación del modelo Súper Chk1**

Esta construcción se encargó a la compañía Gene Bridges (Gene Bridges, Dresden, Germany). Brevemente: se subclonó el locus Chk1 completo y algunas secuencias adyacentes (35 Kb) a partir del BAC RP23-318C6 en un vector mínimo (contiene un origen de replicación ColE1 y una secuencia que confiere resistencia a ampicilina) mediante la tecnología de recombinación Red/ET (o triple recombinación). Por último, se comprobó la integridad de las regiones funcionales de interés por secuenciación.

El vector fue microinyectado en óvulos fecundados por la Unidad de Transgénicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas previa linearización del mismo mediante digestión con la enzima NotI (New England Biolabs). Dado que la construcción se integra al azar en el genoma de los óvulos fecundados se realizaron dos

microinyecciones para poder descartar el efecto posicional durante el estudio del fenotipo. Los blastos generados se implantaron en hembras pseudogestantes. De estos cruces se obtuvieron animales transgénicos que fueron cruzados con animales silvestres para generar la colonia.

### **3. 2. Generación del modelo Mms21 KO**

Las células madre embrionarias utilizadas para la generación de este modelo (clon AA0032) se compraron al Sanger Institute (Wellcome Trust Sanger Institute, UK), que poseía un *gentrap* integrado en el intrón 3 – 4 del gen Mms21. Este *gentrap* consta de un aceptor de *splicing*, una proteína de fusión  $\beta$ -geo (neomicina fusionada a  $\beta$ -gal) y un codón de parada seguido de una señal de poliadenilación que facilita la finalización de la transcripción.

Las ES fueron microinyectadas en blastos B6 por la Unidad de Transgénicos del CNIO; los blastos generados fueron implantados en hembras pseudogestantes (montadas por un macho vasectomizado para inducir un estado de pseudogestación), de las cuales nacieron animales quiméricos. Dichas quimeras fueron cruzadas posteriormente con animales silvestres. De estos cruces se obtuvieron animales heterocigotos para el alelo recombinante, que fueron cruzados entre ellos para generar animales homocigotos.

### **3. 3. Generación del modelo Mms21 KI**

La construcción génica para la generación del ratón Mms21 KI se encargó a la compañía Gene Bridges (Gene Bridges, Dresden, Germany). Brevemente: se subclonó el fragmento de interés del gen Mms21 (exones 5 y 6) a partir del BAC RP23-16P6 en un vector mínimo llamado pMV (contiene un origen de replicación ColE1 y una secuencia de resistencia a ampicilina) y posteriormente se insertó el fragmento loxP-FRT-PGK-neo-FRT por tecnología de recombinación Red/ET (o triple recombinación). Por último, se comprobó la integridad de las regiones funcionales de interés por secuenciación. La construcción generada contiene un *cassette* de resistencia a neomicina entre dos secuencias FRT, que permitirán su eliminación si se expresa una recombinasa flipasa. Todos estos sitios de recombinación están insertados en regiones no codificantes del gen.

El vector fue electroporado en células madre embrionarias de ratón por la Unidad de Transgénicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas previa linearización

del mismo mediante una digestión realizada con la enzima NotI (New England Biolabs). La construcción se integró en las células por recombinación homóloga gracias a que el vector contiene unas regiones de homología de 7 Kb a ambos lados de la construcción. Los clones recombinantes se seleccionaron en presencia de neomicina y se procedió al análisis de éstos mediante *Southern blot* empleando sondas complementarias a los extremos 5' y 3' del vector diana. Un clon recombinante que había integrado correctamente el vector diana se empleó para generar quimeras microinyectado en mórulas de ratón B6. Dichas quimeras fueron posteriormente cruzadas con animales silvestres. De estos cruces se obtuvieron animales heterocigotos para el alelo recombinante que fueron cruzados entre ellos para generar animales homocigotos.

### **3. 4. Mantenimiento y genotipado de los ratones**

Todos los animales usados durante el desarrollo de esta Tesis se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigaciones Oncológicas de acuerdo con la ley de protección animal española (RD1201/2005) y la directiva europea (86/609/CEE) establecidas para regular los estándares de mantenimiento animal.

Para su genotipado, primero se extrajo DNA a partir de fragmentos de colas que se digirieron con una solución de lisis conteniendo 100 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA, 0.5% de SDS y 400 µg/ml de proteinasa K (Roche) durante 12 horas a 55°C. Tras el tratamiento de los lisados celulares con una solución saturada de NaCl, el ADN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua destilada.

Las PCRs de este trabajo se realizaron siguiendo uno de estos 2 protocolos:

- en un volumen final de 20 µl , siendo la composición de la mezcla de reacción la siguiente: 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de tampón de reacción 10X, 0.2 µl de Taq polimerasa (Platinum Taq, Invitrogen), 1 µM de cada oligo y 100 ng de ADN molde.
- en un volumen final de 25 µl , siendo la composición de la mezcla de reacción la siguiente: 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl de tampón de reacción 10X, 0.25 µl de EcoTaq polimerasa (EcoGen), 1 M Betaína, 1 µM de cada oligo y 100 ng de DNA molde.

### 3. 4. 1. Súper Chk1

Inicialmente, los ratones fueron genotipados con oligos que reconocían los extremos del vector Súper Chk1. Estos oligos nos permitieron comprobar la integridad del transgén y genotipar ambas líneas de transgénicos. Una vez comprobado que el transgén se transmitía correctamente, comenzamos a genotipar sólo con el extremo correspondiente a la secuencia con confiere resistencia a la ampicilina. La PCR se realizó con EcoTaq y produjo productos de 600 bp (extremo de la ampicilina) y de 250 bp (extremo NotI) y la secuencia de los oligos utilizados es:

Fw Chk1 amp: GCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG

Rv Chk1 amp: CAGAGCAAGAAGTAGGGCACGGG

BAC Chk1 Not Fw1: ATTCAGTAGCGTCAGGCACC

BAC Chk1 Not Rv2: TAAGCACATATGCATTGAGTACCAC

Una vez identificado el lugar de integración de una de las líneas de transgénicos, diseñamos oligos específicos que amplifican esa región, generando una banda silvestre de 650 bp y una banda transgénica de 300 bp utilizando EcoTaq, y la secuencia de los oligos utilizados es:

ARS N Fw1 CAGAGGCAATTTCCTTAGCC

ARS N Rv 2: CAGAGTGCACCCAGCATCTA

ARS N C5: CTATGGGATCTCTGTGCTTTGTAGT

### 3. 4. 2. ATR Seckel

Los oligos usados amplifican una región próxima al punto de integración del vector, de 500 bp (banda silvestre) y 300 bp (banda KI). La PCR se realizó con Taq Platinum y la secuencia de los oligos utilizados es:

Seckel 3'E8: GGAATAAATCCATGGAAGTGAGAGCAT

Seckel neo: TCCTCGTGCTTTACGGTATCGCC

Seckel 5'In7-8: CACTGGCCTCACAGACTTCAGCATG

### 3. 4. 3. ATM KO

Los oligos usados amplifican una región próxima al punto de integración del vector, de 300 bp (banda silvestre) y 150 bp (banda KO). La PCR se realizó con Taq Platinum y la secuencia de los oligos utilizados es:

ATM Fw: GACTTCTGTCAGATGTTGCTGCC  
ATM Rv: CGAATTTCAGGAGTTGCTGAG  
ATM neo: CCAGCTCATTCCTCCCACTCA

#### **3. 4. 4. Mms21 KO**

Los oligos usados amplifican una región próxima al punto de integración del GeneTrap, de 750 bp (banda silvestre) y 380 bp (banda KO). La PCR se realizó con BioTaq y la secuencia de los oligos utilizados es:

46NESTED2 = FW N2: TCCTTCCCACTACAGTCTCAG  
RV WT N1: ACTTGGAGTACTAGGGGAACCA  
RV GT 6: AAGTGACCCTCCCAACAGCTTC

Este modelo se cruzó con un modelo p53 KO. Para genotipar estos animales se usaron los siguientes oligos, que amplifican una región de 600 bp (banda silvestre) y 300 bp (banda KO). La PCR se realizó con BioTaq y la secuencia de los oligos utilizados es:

p53 Fw TGGTTTGTGCGTCTTAGAGACAGT  
p53 Rv AAGGATAGGTCGGCGGTTTCAT  
p53 neo: CCAGCTCATTCCTCCCACTCA

#### **3. 4. 5. Mms21 KI**

Los oligos usados amplifican una región próxima al punto de integración del vector, de 560 bp (banda silvestre) y 360 bp (banda KI). La PCR se realizó con BioTaq y la secuencia de los oligos utilizados es:

Fw KI GB a: GGTGGGACTGGAGTATTGGA  
Rv KI GB c: GGTGGGACTGGAGTATTGGA  
Rv KI GB b-neo: CAGAAAGCGAAGGAGCAAAG

### **3. 5. Análisis de imágenes corporales**

Los estudios de imágenes corporales (tomografía computarizada y densitometría) fueron llevados a cabo por la unidad de imagen del CNIO, usando el equipo eXplore Vista PET-CT (GE Healthcare) y el sistema de densitometría DEXA de GE, respectivamente. Las imágenes fueron analizadas con PixiMus DeXa system de GE, un software de alta resolución que permite la estimación de la densidad mineral ósea y la composición

corporal, así como la acumulación de grasa. Para realizar estas mediciones los animales fueron anestesiados con técnicas no invasivas.

### **3. 6. Análisis de supervivencia**

Para cada análisis de supervivencia se mantuvieron al menos 15 ratones (machos y hembras) de cada genotipo de interés para estudiar la causa de su muerte. Se anotó tanto la causa como la edad (en semanas), y luego se analizaron las edades de muerte con el programa de análisis estadístico GraphPrism, con el que se realizaron test de Mantel-Cox para averiguar si las diferencias observadas son estadísticamente significativas.

## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

En esta tesis hemos querido profundizar en el conocimiento de las rutas de respuesta a daño en el DNA (DDR). La modificación postraduccional por excelencia es la fosforilación, y la DDR no se puede entender sin esta modificación ya que la cascada de señalización está basada en la actividad de quinasas como ATM, ATR, Chk2 y Chk1, así como en la capacidad de unión a sustratos fosforilados de otras muchas proteínas a través de dominios especializados. Dada la complejidad de estas rutas y a pesar de los numerosos estudios realizados, aún quedan muchos aspectos desconocidos que nosotros hemos querido estudiar en este trabajo desarrollando un modelo murino de ganancia de función de Chk1.

Por otro lado, hay muchas proteínas que intervienen en la respuesta a daño en el DNA que no son quinasas. Cada vez se descubren más proteínas cuya actividad enzimática no es quinasa o cuya modificación postraduccional no es la fosforilación. En este sentido, una de las proteínas más interesante al comienzo de este trabajo era Mms21, una E3 SUMO ligasa implicada en el mantenimiento de la integridad genómica pero cuyo mecanismo de acción y rutas en las que participa sigue sin entenderse. En esta tesis hemos desarrollado dos modelos murinos, uno de pérdida de función y otro con mutaciones que inactivan el dominio catalítico, para estudiar el papel de Mms21 en la supresión tumoral.

### 1. Generación de un modelo de ganancia de función de la DDR: Súper Chk1

La gran mayoría de los estudios de la respuesta a daño en el DNA se han realizado con mutantes de pérdida de función. Sin embargo, los mutantes de ganancia de función pueden aportar información complementaria y novedosa ya que han sido menos utilizados para este tipo de estudios y que, en ciertas condiciones, pueden representar un escenario más parecido al fisiológico. En primer lugar y ya que la DDR es una ruta basada en la fosforilación nos planteamos hacer un modelo de ganancia de función de alguna quinasa relevante para la transducción de la señal de daño en el DNA. En segundo lugar, elegimos el tipo de respuesta que nos interesaba de manera especial. En este sentido, nos decantamos por la ruta activada por ATR/Chk1 porque es la ruta que responde al daño que más frecuentemente sufren las células: el daño endógeno asociado a la replicación. Este

tipo de daño, llamado estrés replicativo, está presente en todas las células que replican, incluyendo también las células tumorales. En este caso se debe a la hiperreplicación inducida por los oncogenes. Se ha propuesto que la DDR supone una barrera anti tumoral en las primeras etapas de la transformación celular (Halazonetis et al., 2008). En este sentido, un modelo de ganancia de función podría ayudar a entender mejor el papel del eje ATR/Chk1 en la respuesta al daño producido por esta hiperreplicación.

Por otro lado, al ser el estrés replicativo inherente a la proliferación, esta ruta nos resultaba particularmente interesante porque un modelo de ganancia de función puede ser útil ya que la ausencia de ATR y Chk1 es incompatible con la vida (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000a), a causa del severo estrés replicativo. Además, se postula que el estrés replicativo juega un papel en el envejecimiento, junto a otras causas como el acortamiento de telómeros o el daño oxidativo. Por este motivo, este modelo nos permitiría entender mejor el peso del estrés replicativo en el envejecimiento, así como estudiar la posibilidad de retrasar el mismo limitando los niveles de estrés. Por último, elegimos trabajar sobre un modelo basado en la proteína Chk1 por los siguientes motivos:

- es una quinasa que no pertenece a un complejo, a diferencia de ATR, que es indisociable de ATRIP (Cortez et al., 2001),
- aunque se conoce una vasta lista de proteínas diana de ATR (Matsuoka et al., 2007), se postula que Chk1 es la principal quinasa efectora de ATR, teniendo un papel primordial en el establecimiento de los *checkpoints* S y G2/M y en la estimulación de la reparación del DNA mediante recombinación homóloga y la ruta de Fanconi Anemia (Andreassen et al., 2004; Collis et al., 2008; Sorensen et al., 2005).

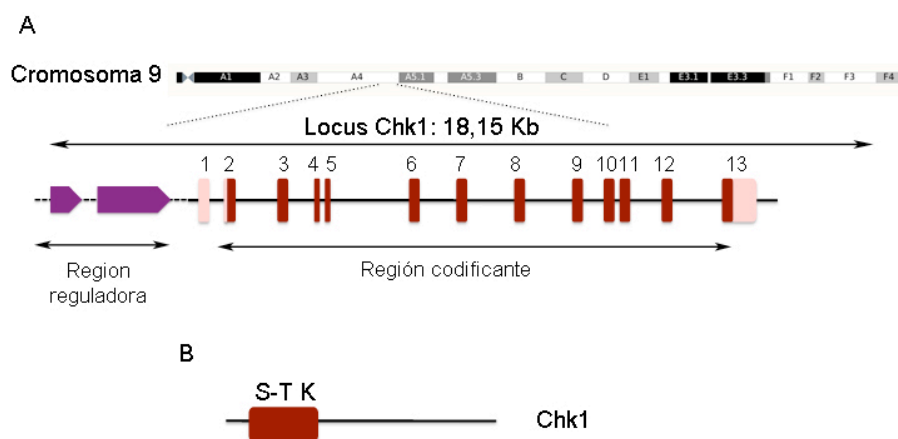
## 1. 1. Generación del modelo murino Súper Chk1

El estudio de la DDR se ha centrado en ATM, en parte, por las dificultades que presenta trabajar con modelos de pérdida de función de ATR y Chk1. Como ya se ha comentado, ambos modelos presentan letalidad en las primeras divisiones del desarrollo causada por la acumulación de estrés replicativo. Por ello, decidimos desarrollar un modelo de ganancia de función de Chk1. Para ello, en lugar de seguir una estrategia de transgénesis convencional en la que se utiliza el cDNA del gen de interés regulado por un promotor

constitutivo, optamos por una estrategia que incluyera las zonas reguladoras para así mantener la regulación de Chk1. Otros grupos han seguido estrategias de este tipo para otros genes, y han desarrollado modelos murinos a partir de los BACs que contienen los genes de interés (García-Cao et al., 2002; Matheu et al., 2004). La principal ventaja de este sistema es que el aumento en los niveles de la proteína de interés se produce de una manera más parecida a la situación fisiológica. En nuestro caso, esta regulación es muy importante, entre otras razones porque la activación permanente del eje ATR/Chk1 conduce a la senescencia celular (Toledo et al., 2008).

### 1. 1. 1. Diseño de la estrategia

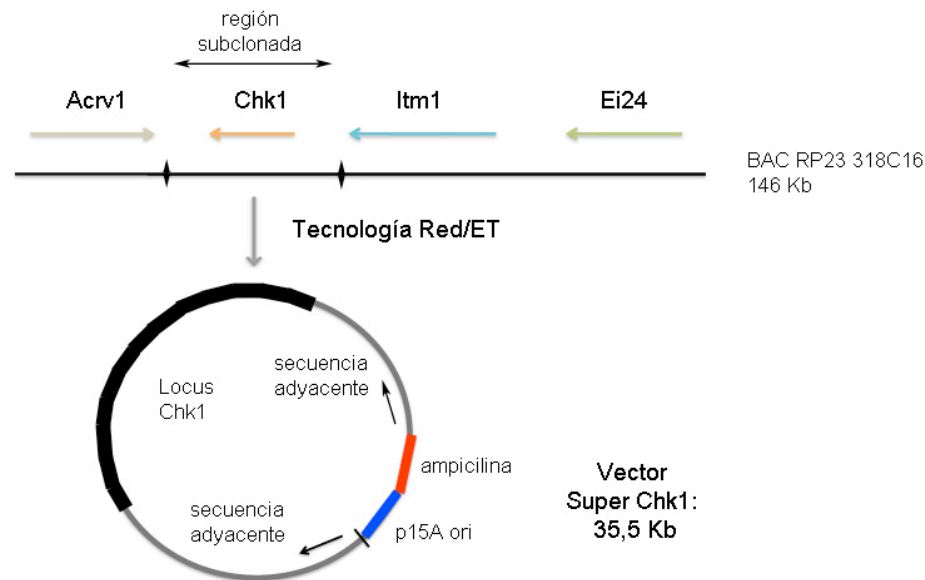
El gen murino que codifica la proteína Chk1 se encuentra en el cromosoma 9 (36.516.067 bp – 36.534.212 bp). El locus consta de 18.145 Kb, 13 exones y 12 intrones, que produce una única variante de *splicing* (figura 13). El transcrito produce una proteína de 476 aminoácidos, con un dominio serín-treonín quinasa en el extremo N-terminal.



**Figura 13. Estructura del locus y de la proteína Chk1.** A: Locus de Chk1, zona reguladora (promotor distal y proximal) y zona codificante (con 13 exones). B: Esquema de la proteína, con el dominio serín-treonín quinasa.

Para desarrollar el modelo murino de ganancia de función de Chk1, decidimos trabajar con un BAC que contiene el locus completo de Chk1, RP23-318C6, de 146 Kb. Puesto que el locus de Chk1 es relativamente pequeño (18 Kb) decidimos no trabajar con el BAC completo, ya que éste incluye otros 3 genes (Acrv1, Itm1 y Ei24). Para ello, contactamos con la Compañía GeneBridges, que mediante la técnica Red/ET basada en una triple recombinación subclonó nuestro gen de interés en un vector mínimo, tal como

se especifica en el apartado Materiales y Métodos. El vector resultante consta de 35,5 Kb. Contiene el locus íntegro de Chk1 (18.2 Kb), así como unas 7 Kb aguas bajo y aguas arriba del locus para minimizar la pérdida de elementos reguladores (**figura 14**).



**Figura 14. El locus de Chk1 y el vector Súper Chk1.** Se representa el BAC que contiene el locus de Chk1, así como los otros 3 genes adyacentes (RP23-318C16). Mediante una tecnología basada en la recombinación, la región de interés (un fragmento de 35 Kb que contenía el locus de Chk1) se clonó en un vector mínimo, que llamamos vector Súper Chk1.

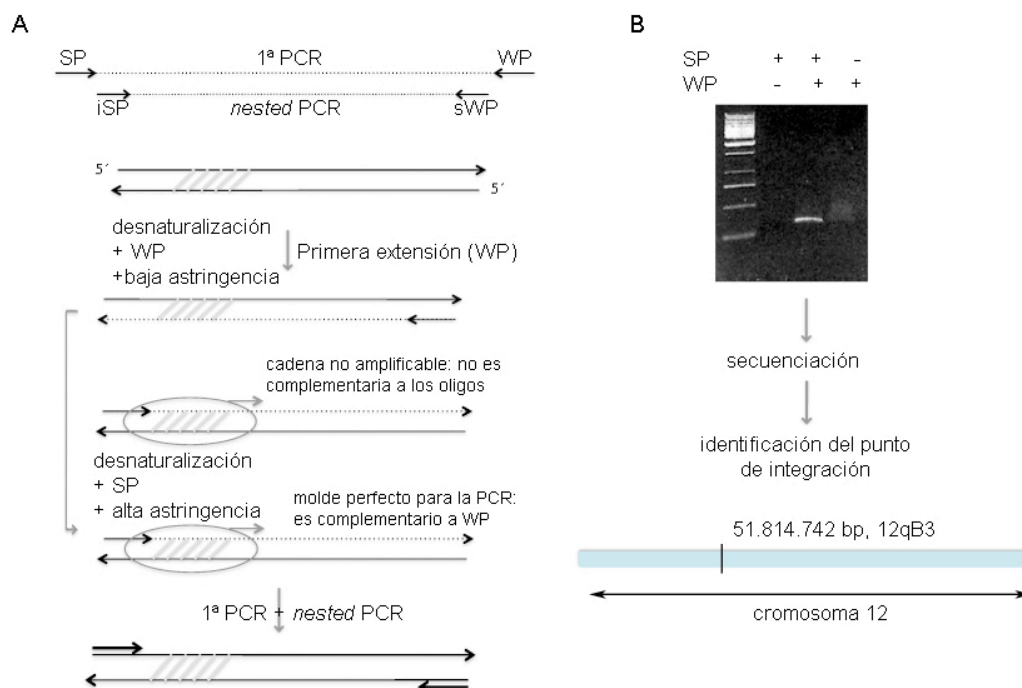
## 1. 2. Caracterización del modelo murino Súper Chk1

Una vez dispusimos del vector, procedimos a su microinyección en óvulos B6 fecundados. A continuación, los óvulos microinyectados se implantaron en hembras B6 receptoras (montadas por un macho vasectomizado para inducir una pseudogestación). El proceso se realizó 3 veces, y pudimos establecer 2 líneas transgénicas que identificamos mediante PCR realizada con oligos que anillan en la secuencia que codifica para la ampicilina, que se encuentra en el vector Súper Chk1 y que denominamos Súper Chk1 1 y Súper Chk1 2. Dado que la integración del vector microinyectado puede darse en cualquier punto del genoma, la generación de modelos transgénicos está sujeta a producir mutaciones por inserción en el genoma del ratón. Trabajar con dos líneas de ratones nos permite comprobar que los fenotipos observados se deben al transgén introducido y no al punto de inserción de éste. Todos los experimentos realizados en esta tesis se han hecho utilizando

ambas líneas de microinyección, a las que nos referimos indistintamente como Súper Chk1 o Chk1<sup>Súper/+</sup>.

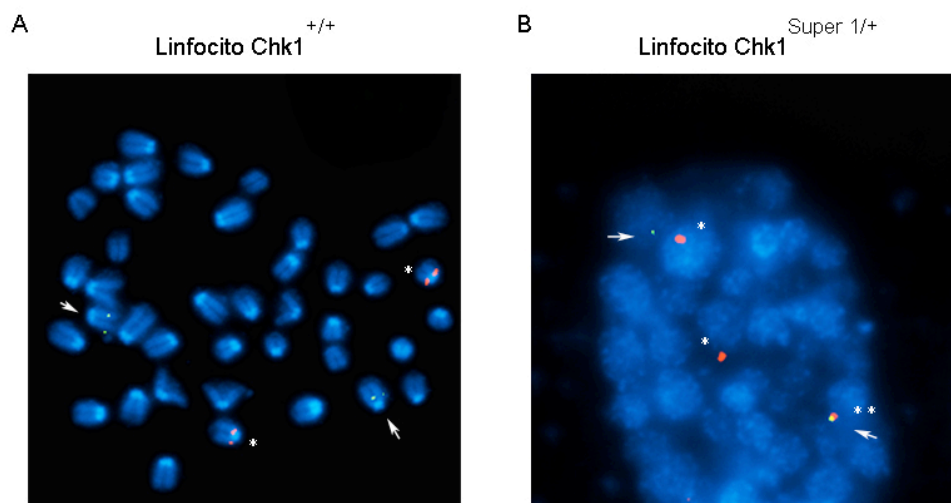
### 1. 2. 1. Descripción del lugar de integración

Para averiguar dónde se había integrado el vector Súper Chk1 se utilizó una estrategia denominada paseo cromosómico (Dominguez and Lopez-Larrea, 1994) en colaboración con el Dr. Orlando Domínguez (Jefe de la Unidad de Genómica). Para ello se partió de DNA sin digerir y se hicieron 2 PCRs consecutivas tal y como se explica en el apartado Materiales y Métodos y se esquematiza en la **figura 15**. El Dr. Orlando Domínguez trató de identificar el punto de integración del vector en ambas líneas de microinyección, sin embargo sólo obtuvimos un resultado claro en la línea que en esta tesis se llama Chk1<sup>Súper 1/+</sup>. Tras secuenciar el producto de PCR identificamos el punto de integración en la posición 51.814.742 bp del cromosoma 12, una región desprovista de secuencias que codifique alguna proteína descrita.



**Figura 15. Identificación del punto de integración del vector Súper Chk1 en la líneas de microinyección Chk1<sup>Súper 1/+</sup>.** A: Esquema del protocolo seguido (adaptado de (Dominguez and Lopez-Larrea, 1994) en el que se esquematizan las características de las PCRs seguidas. B: producto de PCR obtenido con los oligos WP y SP, el cual se secuenció para conocer el lugar de integración del vector Súper Chk1.

Para confirmar este dato realizamos una Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) sobre linfocitos silvestres y procedentes de animales que portaban el vector Súper Chk1 (a partir de ahora simplemente  $Chk1^{Súper/+}$ ) junto con el Grupo de Citogenética usando como sondas el vector Súper Chk1 y 2 BACs (RP24-376M12, cr. 12: 51.733.131-51.922.297 y RP2-274N1, cr. 12: 51.733.614- 51.893.223) que contenían la región donde habíamos localizado el punto de integración mediante el paseo cromosómico (**figura 16**). Como se muestra en la **figura 16 B**, los linfocitos  $Chk1^{Súper/+}$  portan 2 copias del locus Chk1 (puntos rojo, señalados con asteriscos) más una tercera copia de Chk1 (rojo, doble asterisco) que colocaliza con uno de los cromosomas de la pareja 12 (puntos verde, señalados con flechas).



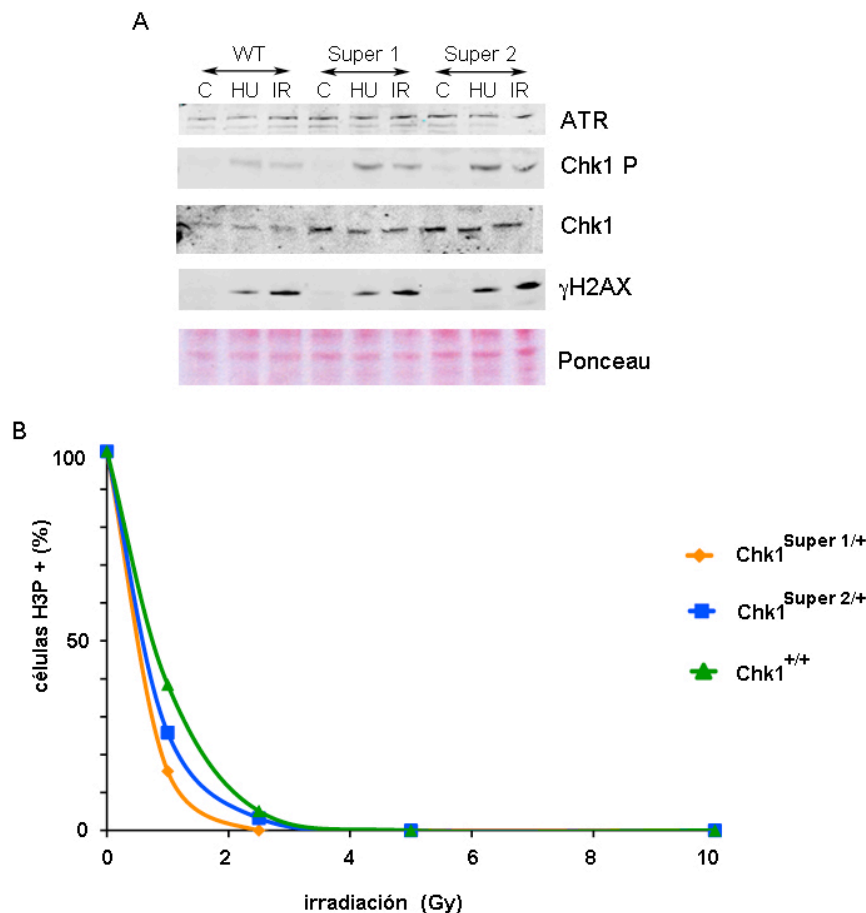
**Figura 16. Las células  $Chk1^{Súper 1/+}$  tienen integrado el vector Super Chk1 en el cromosoma 12.** A: In situ fluorescente realizada en un linfocito metafásico silvestre con sondas que reconocen los loci de Chk1 (cr. 9, asteriscos) y el punto de integración predicho por el paseo cromosómico (cr. 12, flechas). B: In situ fluorescente realizada en un linfocito interfásico  $Chk1^{Súper 1/+}$  con las mismas sondas.

Una vez determinado que el vector se había integrado en ambas líneas de microinyección, así como el punto exacto de la inserción en la línea  $Chk1^{Súper 1/+}$ , procedimos al estudio de las consecuencias de la posesión de una tercera copia de Chk1. Tras generar una cohorte de animales positivos y negativos para la integración del vector Súper Chk1, procedimos a su caracterización. Para todos los estudios realizados en esta tesis trabajamos con ambas líneas de transgénicos y poder así descartar el efecto posicional del transgén.

### 1. 2. 2. Caracterización a nivel celular

A partir de los modelos murinos de interés se pueden establecer diversas líneas celulares. Para esta tesis, produjimos fibroblastos embrionarios murinos (MEF) y purificamos linfocitos B del bazo. Estas células presentan ventajas respecto a las líneas establecidas, principalmente que al ser células primarias no tienen mutaciones ni alteraciones en rutas relevantes para nuestros estudios (como los *checkpoints*).

Utilizando MEF, pudimos establecer que los que tenían una copia extra del gen *Chk1* presentaban niveles más altos de la proteína *Chk1* (**figura 17 A**) y también de su forma fosforilada (detectable en presencia de daño). Es importante hacer notar que el incremento de la forma fosforilada en presencia de daño se da en las mismas condiciones que en los MEF silvestres. Es decir, los MEF Súper tienen unos niveles incrementados pero regulados de *Chk1*. Por otro lado, este incremento en los niveles de *Chk1* no conlleva una variación en los niveles de ATR ni de  $\gamma$ H2AX, otras proteínas mediadoras de la DDR. O sea, la ruta aguas arriba de *Chk1* está íntegra. Así, evaluamos si estos mayores niveles de *Chk1* P tendrían consecuencias fisiológicas. Para ello realizamos ensayos de detección del *checkpoint* G2/M tanto en MEF como en linfocitos B y pudimos observar que tanto unos como otros presentaban un *checkpoint* G2/M más robusto (mayor número de células detenían su ciclo celular ante dosis más bajas de daño). En la **figura 17 B** se muestra un experimento representativo de este ensayo donde se ve que los MEF *Chk1*<sup>Súper/+</sup> presentan menor porcentaje de células en fase M (marcado por la fosforilación de la histona 3 en su serina 10) al ser irradiadas (especialmente con 1 y 2.5 Gy) que los MEF silvestres. Esto significa que son capaces de detener su ciclo celular a unas dosis de irradiación a las que los MEF silvestres no lo hacen.

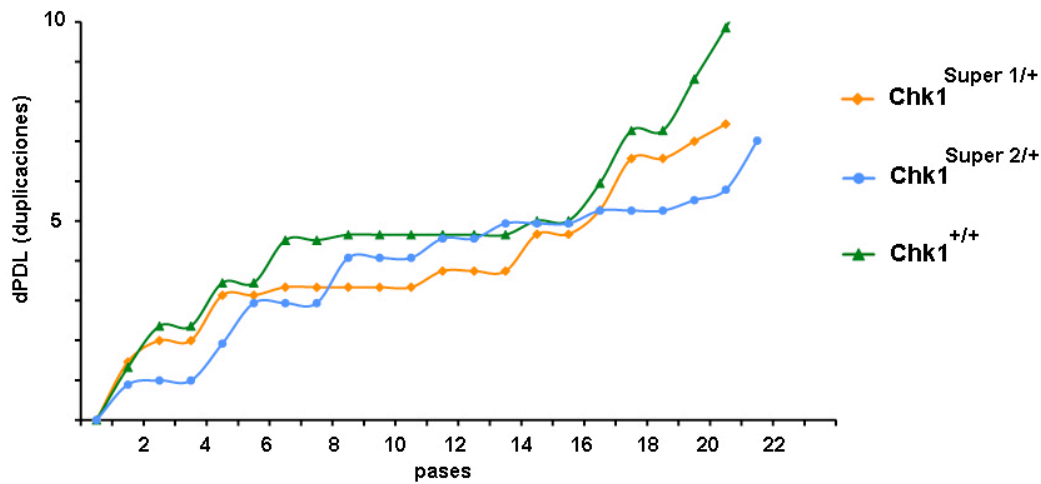


**Figura 17. Los MEF Chk1<sup>Súper/+</sup> tienen niveles más altos de la proteína Chk1 y un *checkpoint* G2/M más robusto.** A. Medida de los niveles de Chk1 y Chk1 P mediante *western blot* en MEF silvestres y Chk1<sup>Súper</sup> de ambas líneas de microinyección sin tratar (C), tratadas con HU 2 mM durante 2 horas (HU) o irradiadas con 10 Gy (IR). Se analizan también los niveles de ATR y γH2AX. B: Cuantificación de los niveles de células mitóticas mediante cuantificación de células H3P+ en MEF silvestres y Chk1<sup>Súper/+</sup> de ambas líneas de microinyección tras irradiar con 0, 1,25, 2,5, 5 y 10 Gy y esperar 1 hora.

Ya que estas células presentan un *checkpoint* más robusto, evaluamos si esta característica podría repercutir en la capacidad proliferativa de las mismas. Para ello realizamos una curva de proliferación y medimos la cantidad de veces que una población dada se duplicaba cada 3 días. Como se observó en 3 experimentos independientes, los MEF Chk1<sup>Súper/+</sup> no tienen afectada su capacidad de proliferación y se duplican igual que los silvestres. Como se ve en la **figura 18**, proliferan, entran en la parada proliferativa típica que presentan las células primarias y salen de ella de forma similar. Es decir, la mayor capacidad de parada de ciclo celular que presentan las células Chk1<sup>Súper/+</sup> sólo se observa en presencia de daño, como es la irradiación con la que indujimos el *checkpoint* G2/M. Sin

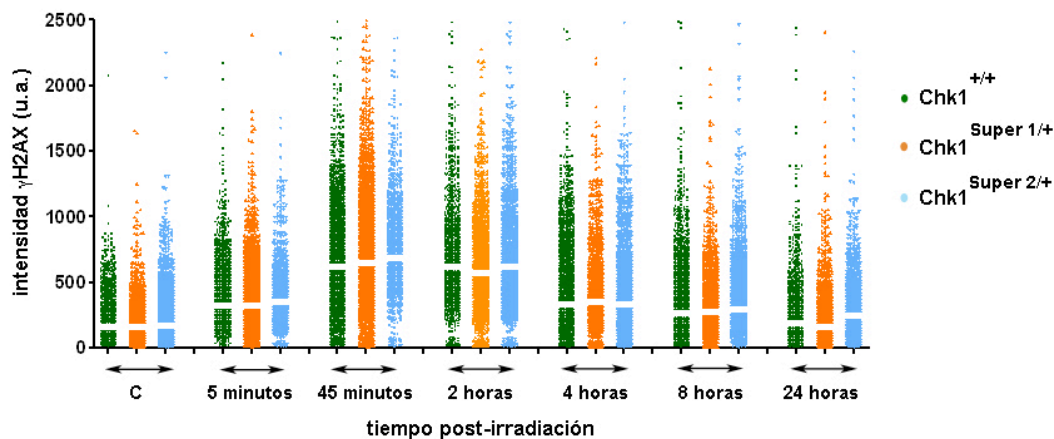


embargo, en una población sin dañar, los MEF  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$  no presentan defectos de crecimiento.



**Figura 18.** Los MEF silvestres y  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$  proliferan de manera similar. Perfil de acumulación de divisiones tras el pase seriado en cultivo (protocolo 3T3) de MEF silvestres y  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$ . Se muestra 1 experimento representativo de los 3 que se realizaron.

Como se ha comentado en la introducción, además de establecer los *checkpoints*,  $\text{Chk1}$  estimula la reparación del DNA. Puesto que los MEF  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$  de cada línea de microinyección presentan un *checkpoint* G2/M más robusto, decidimos comprobar si también presentaban un fenotipo hiperreparador. Como una primera aproximación, realizamos una cinética de reparación en la que cuantificamos la intensidad  $\gamma\text{H2AX}$  (marcador de rupturas de doble cadena) y observamos los tiempos de respuesta (medida como la formación y desaparición de focos de  $\gamma\text{H2AX}$ ) al irradiar MEF silvestres y  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$ . Este ensayo se realizó utilizando microscopía de alto rendimiento, que permite analizar numerosos campos con células y cuantificar la intensidad de la respuesta. En la **figura 19**, cada punto de cada barra representa la intensidad de  $\gamma\text{H2AX}$  en el núcleo de cada célula, lo cual permite estimar el daño existente y la respuesta generada. Como se observa, los MEF  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$  no tienen más  $\gamma\text{H2AX}$  ni durante más tiempo que los MEF silvestres, lo cual indica que el daño se repara al mismo ritmo tanto en MEF silvestres como en los  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}$ .



**Figura 19.** Los MEF Chk1<sup>Súper/+</sup> reparan el daño en el DNA inducido por irradiación igual que los silvestres. Cuantificación de los niveles de  $\gamma$ H2AX en MEF silvestres y Chk1<sup>Súper/+</sup> sin irradiar (C) e irradiados con 10 Gy y medidos a los tiempos indicados .

Cabe mencionar que Chk1 estimula principalmente reparación mediante recombinación homóloga (Andreassen et al., 2004; Collis et al., 2008; Sorensen et al., 2005). El ensayo de reparación de daño inducido por irradiación (figura 19) mide indirectamente la capacidad de reparación mediante la desaparición de focos de daño. Por tanto, no evalúa exactamente la capacidad de reparación y tampoco la específicamente estimulada por Chk1. Cabe la posibilidad de que los MEF Chk1<sup>Súper/+</sup> (o incluso los ratones Chk1<sup>Súper/+</sup>) tengan una mejor capacidad de reparación de las roturas cuya reparación es estimulada por Chk1, pregunta que esperamos contestar en un futuro próximo utilizando otros abordajes experimentales.

### 1. 2. 3. Caracterización a nivel de organismo

Además de generar células proveniente de los ratones Chk1<sup>Súper/+</sup>, hemos generado una cohorte de animales silvestres y Chk1<sup>Súper/+</sup> para su estudio. Hemos observado que el transgén se trasmite en las proporciones esperadas en ambas líneas de microinyección, así como que los animales Chk1<sup>Súper/+</sup> no presentan ningún fenotipo aparente. Los ratones Chk1<sup>Súper/+</sup> son iguales en tamaño que los silvestres, lo cual concuerda con la observación de que las células Chk1<sup>Súper/+</sup> no presentan defectos de proliferación. Por el momento, no podemos asegurar nada acerca de la supervivencia incrementada de estos animales pero podemos nuestra hipótesis es que si éstos tienen una mejor respuesta al daño quizá también mantengan su genoma en mejor estado. Una de las supuestas causas de envejecimiento es el estrés replicativo, un tipo de daño al que responden tanto ATR como Chk1. Por tanto,

una mejor respuesta de la vía de Chk1 podría conllevar un incremento en la esperanza de vida, o al menos un envejecimiento retardado. Este proyecto dará resultados a largo plazo, ya que los ratones mantenidos en animalario tienen una elevada esperanza de vida. Mientras tanto, decidimos estudiar si un incremento en los niveles de Chk1 es capaz de aliviar los fenotipos presentes en un modelo murino con altos niveles de estrés replicativo, como el modelo ATR Seckel, así como un modelo murino que no presenta estrés replicativo ni envejecimiento prematuro, sino cáncer: el modelo ATM KO.

### 1. 3. Efecto de un incremento en los niveles de Chk1 en modelos de daño en el DNA: estrés replicativo (ATR Seckel) y DSB (ATM KO)

Cuando una célula tiene dañado su DNA debe repararlo. Para ello, el sistema de respuesta a daño en el DNA se activa, estableciendo los *checkpoints* que permiten un tiempo de reparación. Cuando la reparación no es posible, este mismo sistema activa respuestas de apoptosis y senescencia. Como se ha comentado en la Introducción, este sistema se compone de 2 rutas principales:

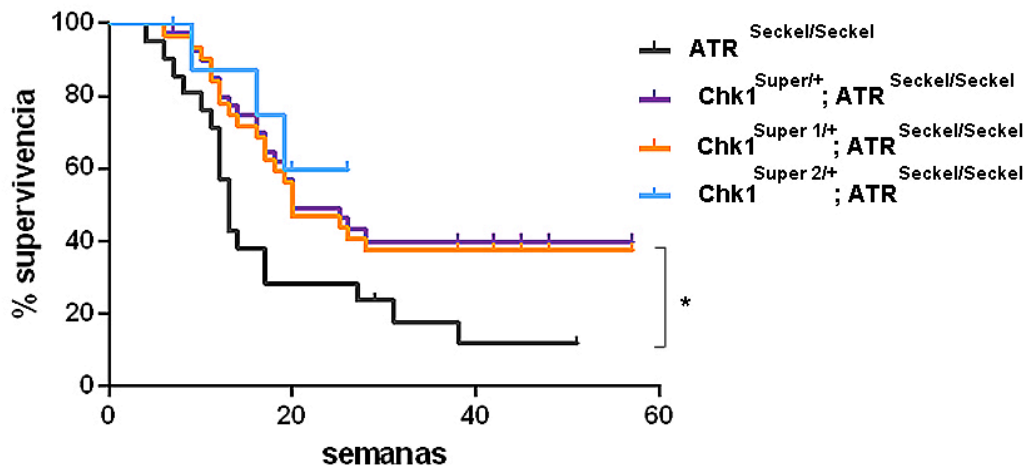
- la ruta activada por ATR/Chk1, activa sólo en fases S y G2, que responde a ssDNA. Respecto a defectos en esta ruta de señalización, se sabe que la depleción total de los niveles de ATR o Chk1 es incompatible con la vida (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000a). Sin embargo, bajos niveles de la proteína ATR se han asociado al raro Síndrome de Seckel (Murga et al., 2009b; O'Driscoll et al., 2003). Es decir, defectos en esta ruta producen alteraciones de desarrollo, que conllevan severos fenotipos incluyendo retraso mental y progeria. Curiosamente, bajos niveles de la proteína Chk1 se han asociado a microcefalia (Lin et al., 2005; Xu et al., 2004), también presente en el Síndrome de Seckel.
- la ruta activada por ATM/Chk2, que responde a lo largo de todo el ciclo celular a rupturas de doble cadena. En este caso, la ausencia de ATM es compatible con la vida y produce la enfermedad que da nombre a la proteína: ataxia telangectasia. Las personas con esta enfermedad desarrollan, entre otros fenotipos, tumores asociados a defectos de reparación de rupturas de doble cadena (como linfomas), pero no envejecen prematuramente y sus células no sufren estrés replicativo.

Es decir, el mantenimiento de la integridad genómica es necesario tanto para protegernos de envejecer prematuramente como para protegernos de desarrollar tumores. Por ello nos planteamos la utilidad del modelo Súper Chk1 para estudiar ambos aspectos de la integridad en el genoma, y especialmente el papel de Chk1 en la respuesta a estrés replicativo y su consecuencia a nivel de organismo: el envejecimiento.

### 1. 3. 1. Súper Chk1 en un fondo genético asociado a envejecimiento: ATR Seckel

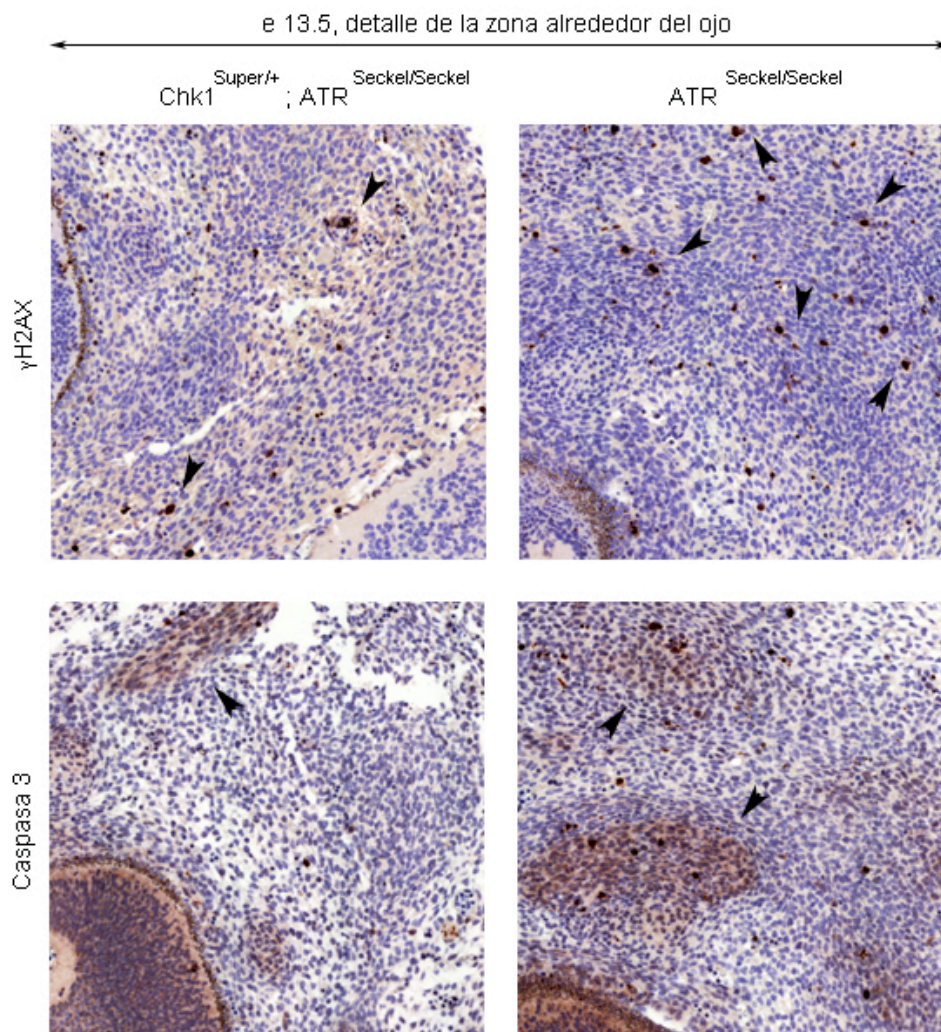
En nuestro laboratorio ya se había desarrollado un modelo hipomórfico para ATR, llamado ATR Seckel o simplemente Seckel (Murga et al., 2009b). La mutación presente en este modelo imita la presente en las personas con Síndrome de Seckel, y produce un defecto en la maduración del mRNA que codifica para ATR, cuya consecuencia es la reducción casi total de los niveles de la proteína ATR. El fenotipo de este modelo murino recapitula el que presentan los pacientes del Síndrome de Seckel. Entre otras, los ratones presentan un envejecimiento prematuro causado por un elevado estrés replicativo durante el desarrollo intrauterino, así como a un enanismo asociado a un defecto en la capacidad proliferativa del organismo. Además, debido a este estrés replicativo, el modelo presenta letalidad embrionaria parcial debido a defectos placentarios. Pero la característica más definitoria tanto de este modelo como de las personas que sufren este síndrome es la morfología craneoencefálica, que cursa con frente en retroceso (causada por muerte celular en los lóbulos frontales del cerebro) y microgнатia (mandíbula pequeña). Ya que Chk1 es la quinasa efectora de ATR, nos planteamos si una tercera copia de este gen podría rescatar este fenotipo asociado a la falta de ATR y a la acumulación de estrés replicativo que conlleva. Por otro lado, se han descrito numerosas proteínas diana de ATR, y este modelo nos permite estudiar específicamente el papel de Chk1 en esta respuesta, así como entender hasta qué punto el fenotipo asociado al Síndrome de Seckel se debe Chk1.

Nuestros resultados con líneas celulares apuntan a que las células Chk1<sup>Súper/+</sup> tienen una capacidad de respuesta al daño incrementada. Por eso pensamos que los mutantes Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> tendrían un rescate parcial del fenotipo producido por la mutación en el gen ATR. Para ello, generamos una cohorte de animales ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> y Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> y observamos su supervivencia. Como se observa en la **figura 20**, los animales Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> sobreviven más tiempo que los ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> ( $p=0.0371$ , test de Mantel-Cox).



**Figura 20.** Una tercera copia de *Chk1* rescata parcialmente el fenotipo de los ratones *ATR*<sup>Seckel/Seckel</sup>. La gráfica representa el porcentaje de animales vivos de cada genotipo frente al tiempo, en semanas.

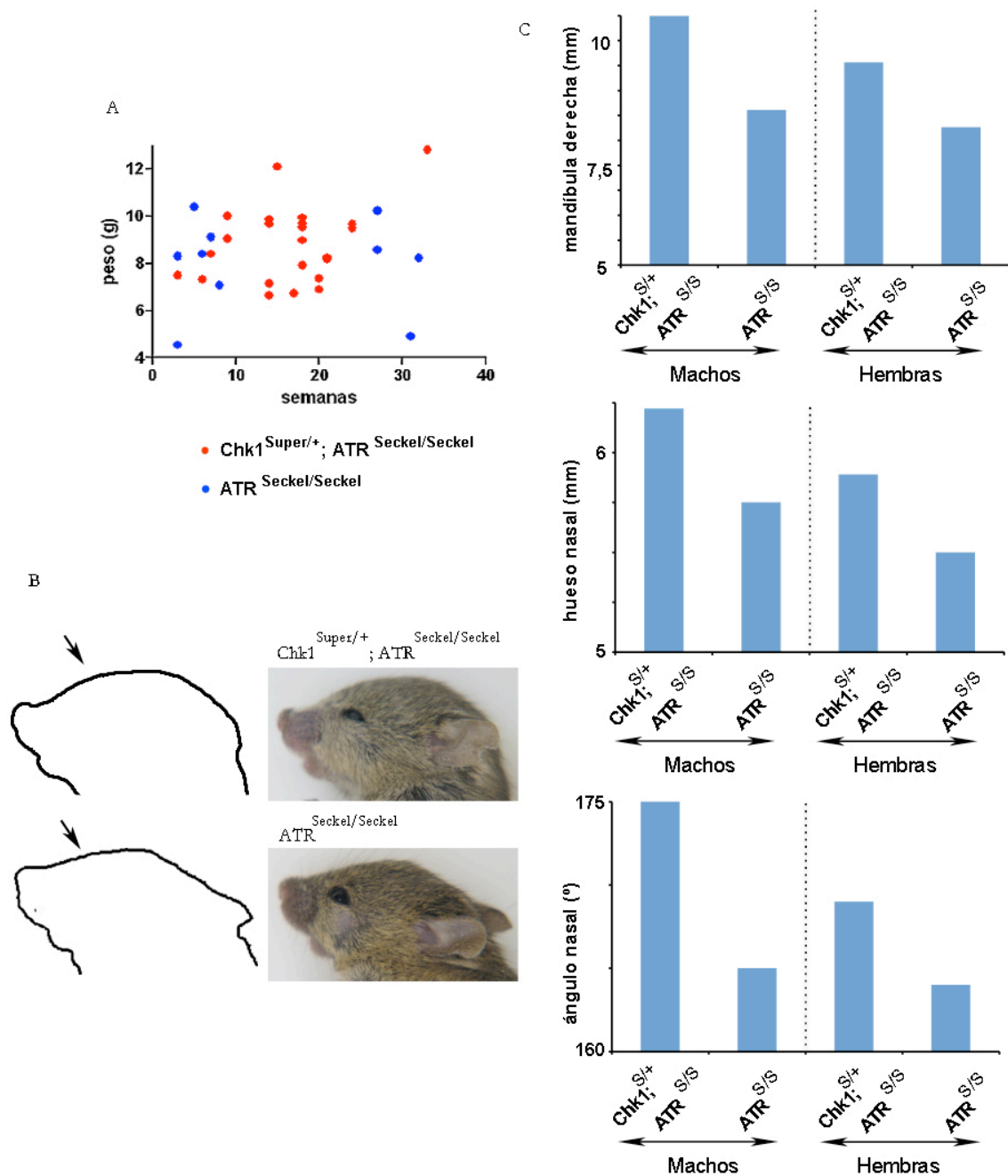
Ya que esa letalidad se debe en gran medida a defectos en el desarrollo de los embriones causados por defectos placentarios y por acumulación de muerte celular durante la etapa embrionaria, comprobamos si los embriones *Chk1*<sup>Súper/+</sup>; *ATR*<sup>Seckel/Seckel</sup> presentaban niveles más bajos de daño en el DNA (originado por el estrés replicativo asociado a la rápida replicación en presencia de niveles muy bajos de *ATR* de las células del embrión) y de muerte celular causada por el mismo. Resultados preliminares muestran que los embriones *Chk1*<sup>Súper/+</sup>; *ATR*<sup>Seckel/Seckel</sup> tienen niveles menores de daño en el DNA y de apoptosis, representados por  $\gamma$ H2AX y Caspasa 3 activa (**figura 21**). Nótese la menor cantidad de células con tinción de  $\gamma$ H2AX y Caspasa 3 en el embrión *Chk1*<sup>Súper/+</sup>; *ATR*<sup>Seckel/Seckel</sup>.



**Figura 21. Los animales  $Chk1^{Súper/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  tienen un mejor desarrollo embrionario.** Evaluación de los niveles de daño en el DNA y muerte celular en embriones  $Chk1^{Súper/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  y  $ATR^{Seckel/Seckel}$  de e13.5 mediante inmunohistoquímica realizada con anticuerpos contra  $\gamma H2AX$  y Caspasa 3. Se muestra un detalle de la zona del ojo, las cabezas de flecha señalan zonas con daño en el DNA (marcado por  $\gamma H2AX$ ) y muerte celular (marcado por Caspasa 3).

Esta mayor supervivencia celular no va acompañada de un rescate obvio en el tamaño de los animales a largo plazo. Para comprobar este hecho, pesamos varios animales en distintas etapas de la vida y no observamos diferencias significativas (**figura 22 A**). Puesto que el rescate de la supervivencia y del desarrollo embrionario es modesto, estudiamos en más detalle algunas características de estos animales. La característica más llamativa de los ratones  $ATR^{Seckel/Seckel}$  es la forma de su cabeza. Por ello analizamos en detalle la cabeza de animales  $ATR^{Seckel/Seckel}$  y  $Chk1^{Súper/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  y descubrimos que

el perfil es diferente ya que los segundos no tienen la frente tan plana como los ATR Seckel/Seckel (figura 22 B).



**Figura 22. Los ratones  $Chk1^{Super/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  presentan un rescate parcial de la morfología craneal.** A: Comparación del peso de ratones  $ATR^{Seckel/Seckel}$  y  $Chk1^{Super/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  de diferentes edades. B: Perfil de las cabezas de ambos genotipos, donde se señala la diferencia que se observa en la forma de la frente. C: Medidas de la longitud de la mandíbula, del hueso nasal y del ángulo nasal de ratones macho (M) y hembra (H)  $ATR^{Seckel/Seckel}$  y  $Chk1^{Super/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  de 42 semanas de edad.

Para hacer un estudio más exhaustivo, la Unidad de Imagen Molecular ha medido varios parámetros corporales en animales viejos (de 42 semanas) mediante tomografía

computerizada. Estas medidas se han realizado una única vez, pero resultados preliminares apuntan a que los animales  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  tienen una morfología craneal mejorada respecto a los animales  $\text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$ . En **figura 22 C** se representan los datos obtenidos de la medición del largo de la mandíbula, del largo del hueso nasal así como el ángulo del mismo. En los 3 casos, los animales  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  (tanto machos como hembras) presentan valores más elevados que parecen indicar que en los embriones  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  hay menos muerte celular permitiendo un mejor desarrollo del cráneo.

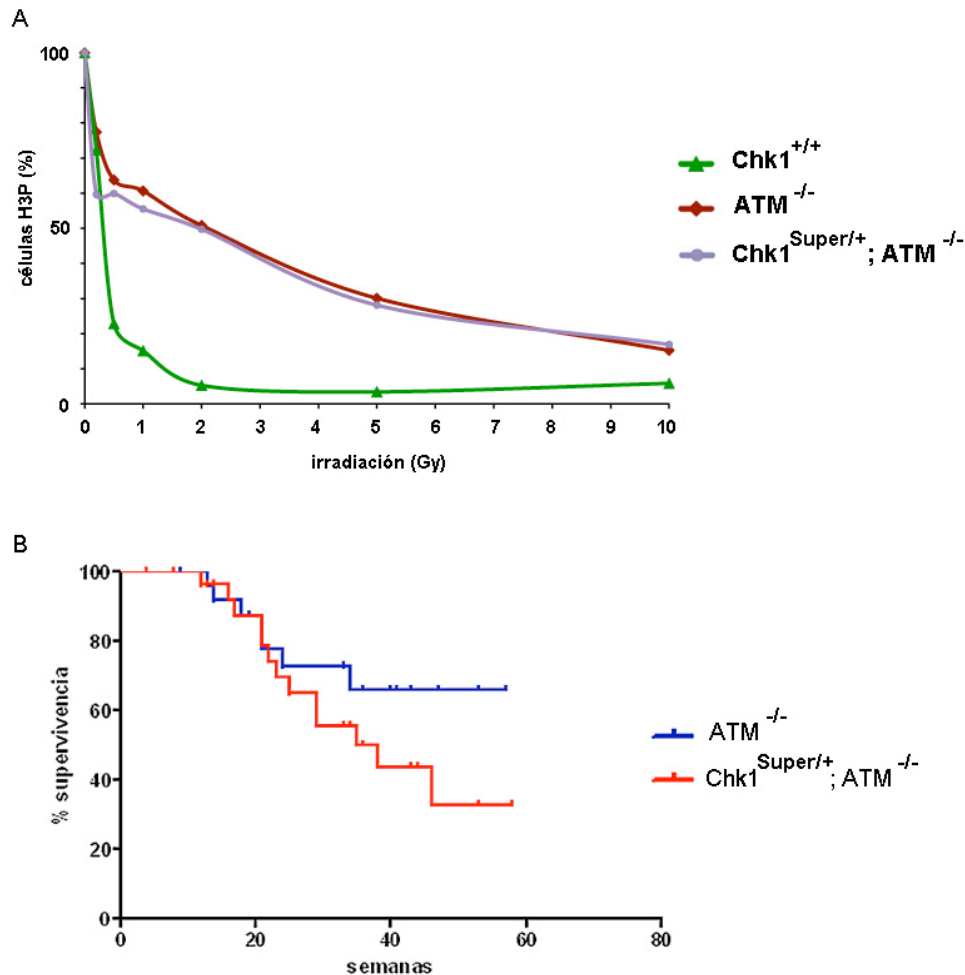
Hasta ahora hemos observado que una mejor respuesta asociada a Chk1 puede mejorar parcialmente los fenotipos asociados a estrés replicativo, por lo que decidimos estudiar esta respuesta en un fondo genético no asociado a estrés replicativo: el modelo ATM KO.

### 1. 3. 2. Súper Chk1 en un fondo genético no asociado a estrés replicativo: ATM KO

Hasta hace poco, se creía que las rutas activadas por ATM y ATR eran independientes. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que esta situación es más compleja: existe comunicación entre ambas rutas (Cuadrado et al., 2006) que se establece cuando aparecen rupturas de doble cadena durante las fases S y G2. Debido a estos resultados, decidimos estudiar si una tercera copia de Chk1 podría rescatar, al menos parcialmente, los defectos asociados a la ausencia de ATM. Las células provenientes de pacientes con ataxia telangectasia o de ratones  $\text{ATM}^{-/-}$  presentan una serie de anomalías, entre las que se incluye la desregulación de los *checkpoints* G1/S, intraS y G2M. El defecto más relevante es la ausencia del *checkpoint* G1/S, que no puede ser establecido por la actividad de la ruta de ATR. Como se describe en (Cuadrado et al., 2006), cuando existe daño en el DNA durante la fase G2 existe una activación de Chk1 dependiente de ATM (vía ATR). Así, quisimos evaluar si una mayor capacidad de respuesta de la ruta de ATR podría rescatar, al menos parcialmente, el defecto causado por la ausencia de ATM. Para responder esta pregunta, generamos ratones  $\text{ATM}^{-/-}$  y  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATM}^{-/-}$  y los mantuvimos para estudiar su desarrollo vital. En primer lugar estudiamos a nivel celular el *checkpoint* G2/M de linfocitos  $\text{ATM}^{-/-}$  y  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATM}^{-/-}$ . Los linfocitos  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATM}^{-/-}$  presentan el mismo defecto en el establecimiento del *checkpoint* G2/M que los  $\text{ATM}^{-/-}$  (**figura 23 A**). En segundo lugar, como se puede ver en la **figura 23 B** la supervivencia de los ratones  $\text{Chk1}^{\text{Súper/+}}; \text{ATM}^{-/-}$  no es significativamente diferente de la de



los animales  $ATM^{-/-}$  ( $p=0.2190$ , según el test de Mantel-Cox). En ambos casos, numerosos animales desarrollaron linfomas tímicos casi a la misma edad. Por tanto, concluimos que una tercera copia de  $Chk1$  no mejora la respuesta a daño en el DNA no asociada a estrés replicativo, como es el caso del daño al que responde  $ATM$ .



**Figura 23. Una tercera copia de  $Chk1$  no rescata el fenotipo de los ratones  $ATM^{-/-}$ .** A: Cuantificación de los niveles de células mitóticas mediante cuantificación de células H3P+ en linfocitos  $ATM^{-/-}$  y  $Chk1^{Super+/+}; ATM^{-/-}$  tras irradiar con 0, 0.5, 1, 2, 5 y 10 Gy y esperar 1 hora. B: Curva de supervivencia de los ratones  $ATM^{-/-}$  y  $Chk1^{Super+/+}; ATM^{-/-}$  en la que se representan los animales vivos frente al tiempo en semanas.

Como resumen, podemos decir que el modelo Súper  $Chk1$  será una herramienta para entender mejor la relación entre estrés replicativo y envejecimiento que ya está ofreciendo resultados interesantes para nuestros estudios. Por una lado, hemos descubierto que la tercera copia de  $Chk1$  está correctamente regulada e induce un *checkpoint* G2M más robusto. Por otro lado, hemos descubierto que una tercera copia de  $Chk1$  alivia el fenotipo

causado por el estrés replicativo presente en el modelo ATR Seckel pero no el desarrollo de tumores asociados a DSB, como es el caso del modelo ATM KO.

Una de las consecuencias del estrés replicativo es el envejecimiento. Por tanto, una mejor respuesta de la vía de Chk1 podría conllevar un incremento en la esperanza de vida, que podría estar mediado por la mejora en la reparación estimulada por Chk1. Así, decidimos cruzar nuestro modelo Súper Chk1 con un modelo herramienta: el ratón LacZ (cedido por el laboratorio de J. Vijg). Este ratón porta numerosas copias del operón LacZ, y permite detectar las mutaciones que se acumulan debido a los tratamientos que recibe o genotipos con los que se cruza este modelo. De esta manera podremos cuantificar las mutaciones acumuladas en este locus (con aproximadamente igual tasa de mutaciones que el resto del genoma) y descubrir si mayores niveles de Chk1 son capaces de mantener el genoma íntegro por más tiempo.

## 2. Estudio del papel fisiológico de la ruta mediada por la SUMO ligasa Mms21

Como se ha comentado anteriormente, cada vez hay más evidencias de que otras modificaciones que no son la fosforilación juegan papeles importantes en la respuesta a daño en el DNA. La SUMOilación es una de ellas, y se ha relacionado de varias maneras con el mantenimiento de la integridad genómica. Como se ha comentado anteriormente, hasta el momento se han descrito una E1 SUMO activasa (Sae1/sae2) y una E2 SUMO conjugasa (Ubc9). Sin embargo existen varias E3 SUMO ligasas, que confieren especificidad a la reacción de SUMOilación. Por ello, comenzamos el estudio de Mms21, una proteína descubierta en levaduras (Prakash and Prakash, 1977), que tiene actividad SUMO ligasa (Andrews et al., 2005; Morikawa et al., 2004; Pebernard et al., 2004; Sergeant et al., 2005) y cuya deficiencia compromete severamente la integridad del genoma. Esta proteína ha sido muy estudiada en este sistema, pero aún así no se conocen en detalle su mecanismo de acción ni las rutas en las que interviene. Por otro lado, al comienzo de esta tesis había poca información referente a su papel en mamíferos y no se había desarrollado ningún modelo murino para esta proteína (ni tampoco para los otros componentes del complejo al que pertenece Mms21: el complejo Smc5/6). Por estos motivos, decidimos desarrollar 2 modelos murinos que nos permitieran estudiar el papel de esta proteína en el mantenimiento de la integridad genómica.

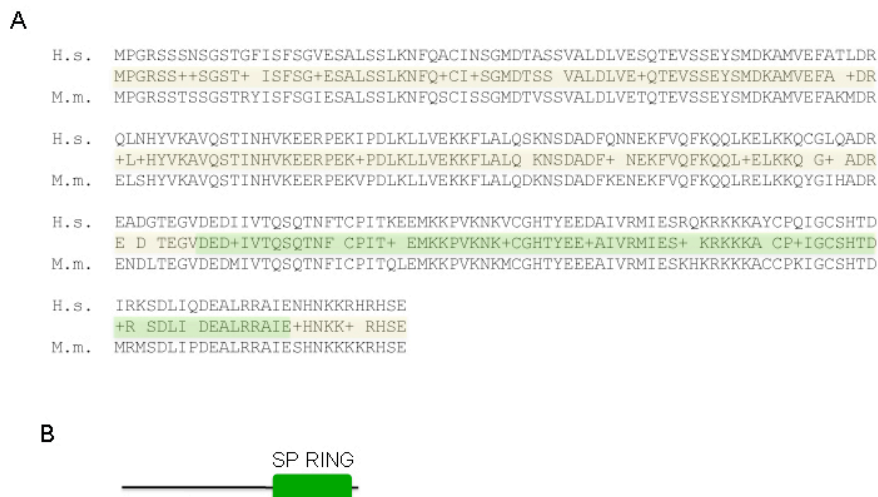
Como se ha comentado en la Introducción, Mms21 es una E3 SUMO ligasa que pertenece al complejo Smc5/6. Estas proteínas pertenecen a la misma familia que las Smc 1 a 4, que conforman los complejos llamados cohesina (Smc1/3) y condensina (Smc2/4). Mientras que el papel de estos complejos está bastante bien definido, el del complejo Smc 5/6 no lo está. Un hecho significativo es que en levaduras los mutantes defectuosos para Smc5, Smc6 o Mms21 produce fenotipos similares, lo que significa que Mms21 es una parte importante de este complejo y lo que se aprenda de esta proteína podría aplicarse al entendimiento del complejo en su conjunto.

## 2. 1. Estudios preliminares en células humanas

Para comenzar el estudio de esta proteína decidimos estudiar su expresión en células humanas. Ya que no encontramos anticuerpos disponibles decidimos desarrollar un anticuerpo monoclonal con ayuda de la Unidad de Monoclonales del CNIO.

### 2. 1. 1. Generación de un anticuerpo contra Mms21

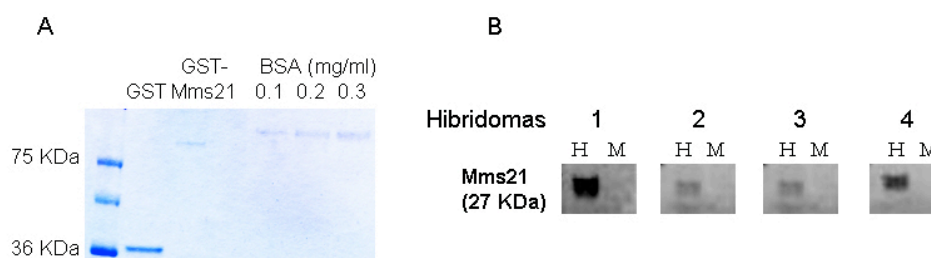
Mms21 es una proteína conservada desde levaduras hasta mamíferos, con un grado de homología muy alto entre las diferentes especies de mamíferos: la forma murina y la humana comparten un 97% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (**figura 24 A**). Es una proteína que consta de 247 aa con un único dominio descrito (SP RING) que se encuentra entre los aa 154 y 236 (marcado en verde en la **figura 24 A y B**) y tiene actividad SUMO ligasa.



**Figura 24. Similitud entre las secuencias humana y murina de Mms21.** A: Alineamiento de las secuencias proteicas de Mms21 humana y murina. Se destaca el dominio catalítico en verde y en amarillo el resto de la secuencia polipeptídica, que no posee ningún dominio definido. B: Estructura de la proteína, donde se muestra el dominio SP-RING.

Para generar el anticuerpo anti-Mms21 humano, clonamos el cDNA en un plásmido de expresión bacteriana que contiene GST. Para ello, a partir un clon disponible en la librería de plásmidos de la Unidad de Genómica del CNIO, realizamos una PCR con oligos específicos para amplificar la secuencia completa. La estrategia utilizada fue la tecnología

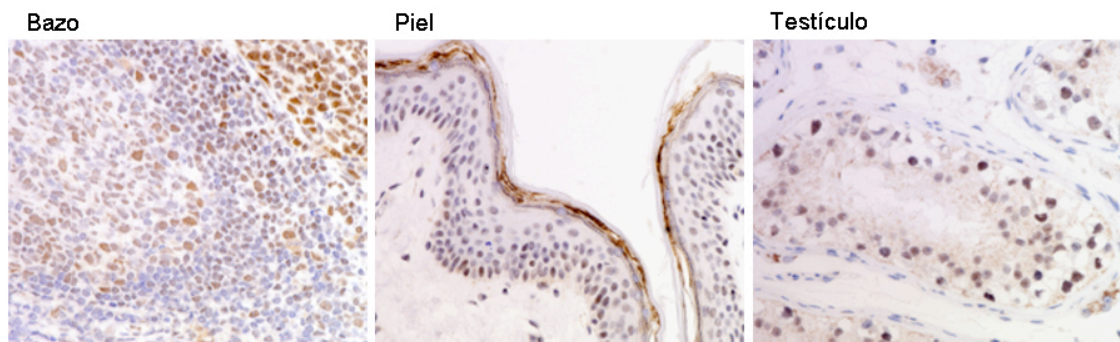
Gateway (Invitrogen), para lo cual primero clonamos la secuencia en un vector pENTR SD TOPO y luego, mediante recombinación, en un vector pDEST 15 GST. Posteriormente procedimos a la expresión y purificación de la proteína de fusión en bacterias *E. coli* BL21 (**figura 25 A**) y la concentramos para poder inyectar menos volumen de proteína resuspendida en PBS a cada ratón para su inmunización. Por último, se inyectó la proteína recombinante intraperitonealmente a 2 ratones y tras los 55 días requeridos se extrajeron los bazos y se purificaron los linfocitos B de dichos ratones. A continuación estos linfocitos B se fusionaron con la línea de mieloma NS-1 para producir varias líneas de hibridomas, que se subclonaron tal y como se especifica en el apartado Materiales y Métodos. Tras comprobar mediante ELISA e inmunotinción el nivel de producción de anticuerpos, se expandieron 15 clones. A continuación comprobamos la especificidad de todos ellos mediante *western blot* de lisados de células humanas (U2OS) y murinas (3T3) en los cuales vimos que los anticuerpos producidos eran específicos para la forma humana. A continuación seleccionamos y purificamos el que reconocía más específica e intensamente Mms21 en *western blot*. En la **figura 25 B** se muestran 4 de los 15 hibridomas que testamos. Para el resto de los experimentos incluidos en esta tesis utilizamos el hibridoma marcado como 1 en la **figura 25 B**.



**Figura 25. Generación de un anticuerpo monoclonal contra Mms21.** A: Gel teñido con azul de coomasie en el que determinamos el grado de purificación y los niveles de expresión de expresión GST-Mms21 recombinante. B: *western blots* realizados con los sueros de los hibridomas desarrollados por la Unidad de Anticuerpos Monoclonales en los que se detecta Mms21 procedente de extractos de células humanas (H) pero no de células murinas (M).

Una vez demostrada la actividad del anticuerpo para *western blot*, decidimos comprobar la eficacia del anticuerpo en inmunohistoquímica (**figura 26**). Para ello preparaciones de varios tejidos de origen humano se tiñeron con el anti-Mms21. Como se ve, Mms21 se expresa en células de tejidos proliferativos, como los centros germinales del

bazo, o la capa basal de la piel. Pero también se expresa en muy altos niveles en unas células muy concretas de los túbulos seminíferos del testículo: los espermatocitos. Estas células generarán los espermatozoides, y no están proliferando porque están paradas en profase I realizando la recombinación meiótica que tiene lugar durante la espermatogénesis. Esta observación es muy interesante ya que los datos de levaduras sugieren que esta proteína está relacionada con la recombinación homóloga, como se ha comentado en la Introducción.



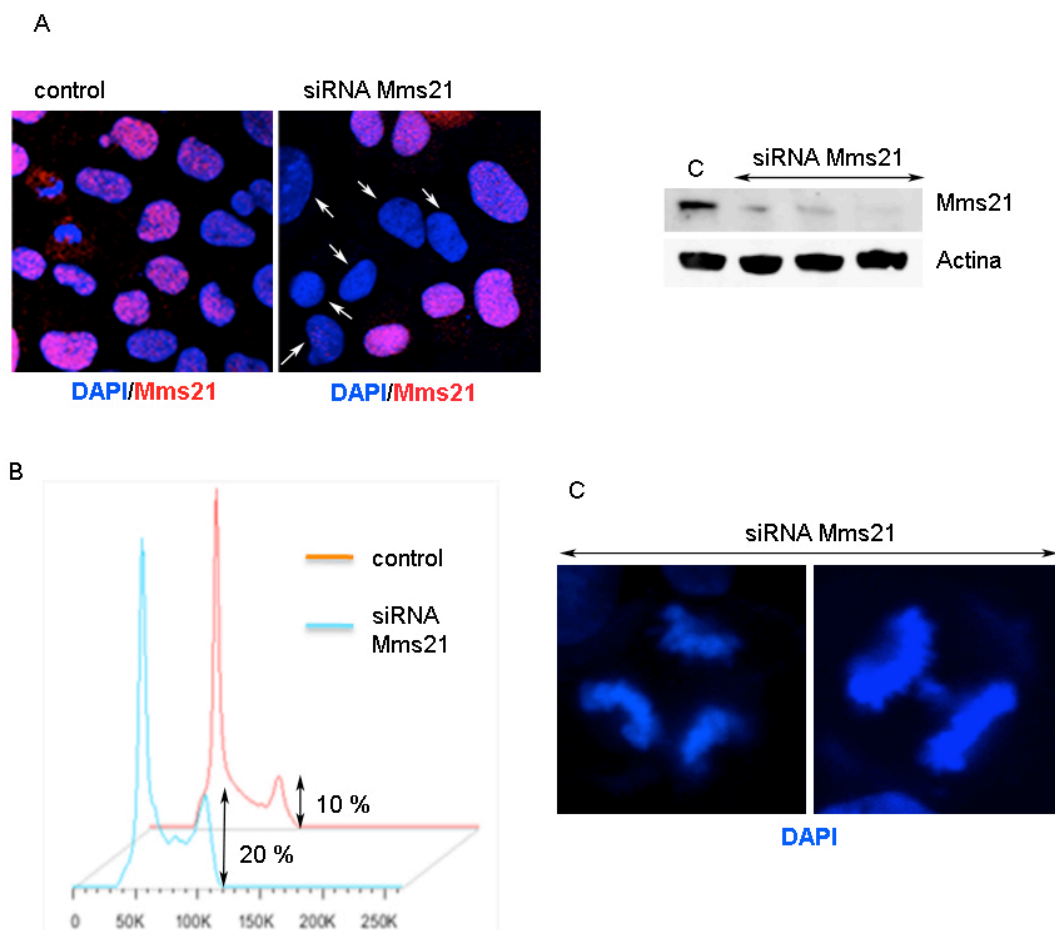
**Figura 26. Expresión de Mms21 en varios tejidos humanos.** Inmunohistoquímica con anti-Mms21 realizada en tejidos humanos donde hay proliferación (bazo y piel) y recombinación (testículo).

Para aproximarnos al estudio del papel de Mms21 en células humanas decidimos comenzar estudiando su papel en líneas humanas establecidas.

### 2. 1. 2. Estudio de la expresión de Mms21 en líneas humanas establecidas

Una vez generados los anticuerpos necesarios comprobamos mediante inmunofluorescencia convencional que la localización de Mms21 es nuclear, así como que la tinción es uniforme en todo el núcleo. Para asegurarnos de la especificidad del anticuerpo transfectamos células U2OS con siRNA contra Mms21 (Invitrogen). Usando 20 nM de siRNA contra Mms21 y analizando las células 2 días después vimos que aproximadamente el 50% de las células había sufrido una severa reducción de los niveles de Mms21 (**figura 27 A**). Esta reducción puede incrementarse transfectando 2 veces consecutivamente las células (**figura 27 A**). El efecto de este tratamiento es la muerte de las células, mayoritariamente por catástrofe mitótica (no se muestra). Por ello, para estos estudios realizamos una única transfección con la que reducíamos los niveles al 50 % y permitíamos

a la población celular continuar proliferando. A consecuencia de este tratamiento observamos que las células con bajos niveles de Mms21 se acumulan en G2/M (**figura 27 B**) y durante mitosis presentan estructuras aberrantes como puentes anafásicos o placas metafísicas multipolares (**figura 27 C**).

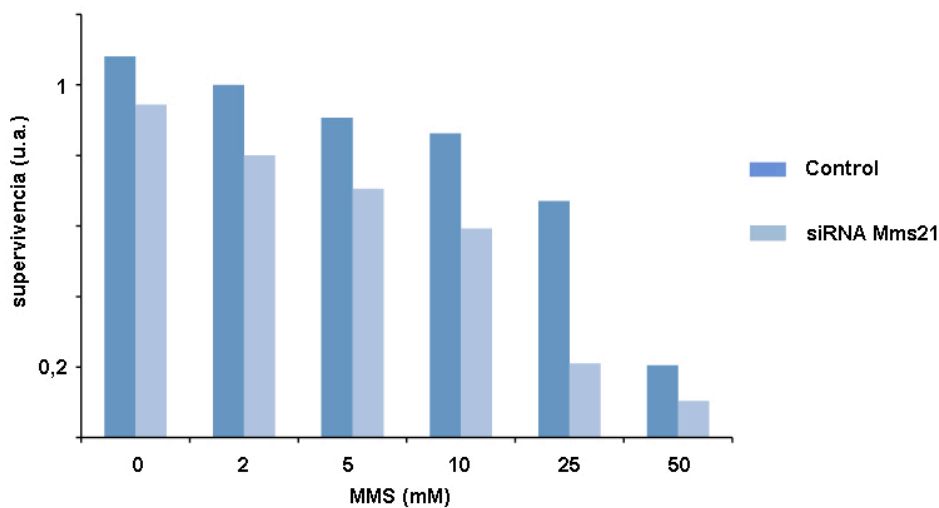


**Figura 27. Efecto de la reducción de Mms21 en células humanas.** A: Inmunotinción de células humanas tratadas o sin tratar con siRNA contra Mms21 y analizadas a las 48 h para determinar el patrón de expresión de Mms21 y *western blot* para determinar la efectividad del tratamiento con el siRNA contra Mms21. B: Ciclo celular de células control y tratadas con siRNA analizadas a las 48 h para determinar el porcentaje de la población 4n (G2). C: Tinción con DAPI de células tratadas con siRNA contra Mms21.

Dado este fenotipo, nos preguntamos si se debía a una falta de detección y señalización del daño o a una reparación deficiente del mismo. Así, estudiamos la capacidad de señalización de daño en el DNA y de reparación del mismo en células con bajos niveles de Mms21. Tal y como se ha descrito en levaduras mediante ensayos de activación del *checkpoint* G2/M y análisis mediante *western blot* de los sustratos de la DDR, los bajos niveles

de Mms21 no impiden la señalización del daño en el DNA. Respecto a la reparación del daño, tampoco pudimos observar diferencias entre células con bajos niveles de Mms21 células silvestres.

Así pues, los defectos mitóticos observados en células con bajos niveles de Mms21 no son problema ni de detección y señalización de daño ni de reparación del mismo. A pesar de ello, pudimos comprobar que las células con bajos niveles de Mms21 son más sensibles al tratamiento con MMS en el sentido de que su supervivencia se veía más comprometida que la de las células silvestres ante un tratamiento con MMS (**figura 28**). Esto nos llevó a pensar que la sensibilidad al MMS de las células con bajos niveles de Mms21 no se debe a un defecto de reparación de roturas del DNA sino a un defecto en el procesamiento de las lesiones generadas por el MMS.



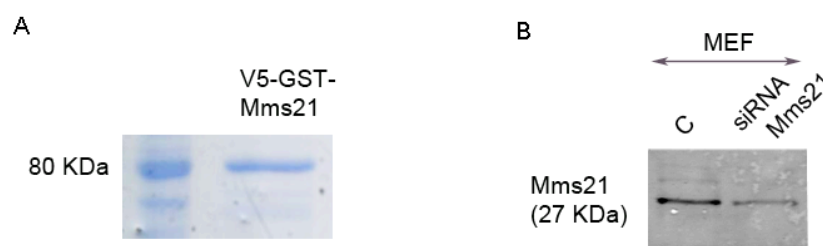
**Figura 28. Ensayo de supervivencia en células silvestres y tratadas con siRNA contra Mms21.** Se mide la cantidad de células que sobreviven a los tratamientos indicados tras 1 hora de exposición a MMS más un tiempo de recuperación de 24 horas.

Estos experimentos nos sugieren que las células humanas con bajos niveles de Mms21 se acumulan en G2/M, presentan mitosis aberrantes y son hipersensibles al tratamiento con MMS, pero que esto no se debe a defectos en la señalización o en la reparación.



## 2. 2. Estudios preliminares en ratones

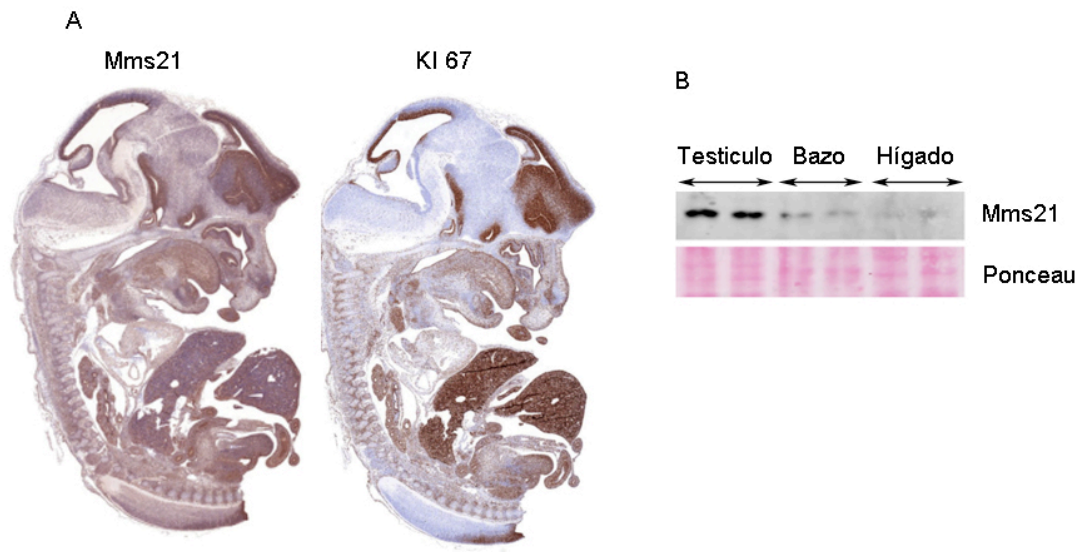
De forma similar, aunque realizado por la Unidad de Proteómica del CNIO, se purificó la forma murina de Mms21 fusionada a la etiqueta V5-GST (**figura 29 A**). A continuación se inmunizaron 2 conejos (VivoTecnica, Tres Cantos, España) y purificamos el anticuerpo anti-Mms21 del suero obtenido de uno de los conejos y comprobamos su especificidad mediante *western blot* (**figura 29 B**). El anticuerpo policlonal generado resultó ser específico y, de manera similar al anticuerpo contra la forma humana, el anticuerpo policlonal contra la forma murina no es capaz de reconocer la forma humana.



**Figura 29. Desarrollo de un anticuerpo policlonal contra Mms21.** A: Gel teñido con azul de coomasie para determinar el grado de purificación y los niveles de expresión de expresión V5-GST-Mms21 recombinante. B: *western blot* con el anticuerpo policlonal purificado en el que se detecta Mms21 en lisados de MEF silvestres.

### 2. 2. 1. Estudio de la expresión de Mms21 en tejidos

Dados los resultados del estudio inmunohistoquímico realizado sobre algunos tejidos humanos, quisimos comprobar la expresión en tejidos de ratón. Para ello, elegimos teñir un embrión de estadio e13.5 con el anticuerpo contra Mms21 y también con un anticuerpo que marca tejidos proliferativos: KI67. Como se puede observar en la **figura 30 A**, existe una correlación entre Mms21 y KI 67, indicando que Mms21 está presente principalmente en células que proliferan. Por otro lado, también estudiamos los niveles de expresión de Mms21 en distintos tejidos murinos. Para ello, lisamos extractos de varios tejidos adultos (testículo, bazo, hígado, pulmón, músculo, intestino y cerebro) y analizamos mediante *western blot* los niveles de Mms21 en cada tejido. En la **figura 30 B** se muestran los 3 tejidos que expresan más altos niveles de Mms21, de los cuales el que expresa mayores niveles de Mms21, con gran diferencia, es el testículo.



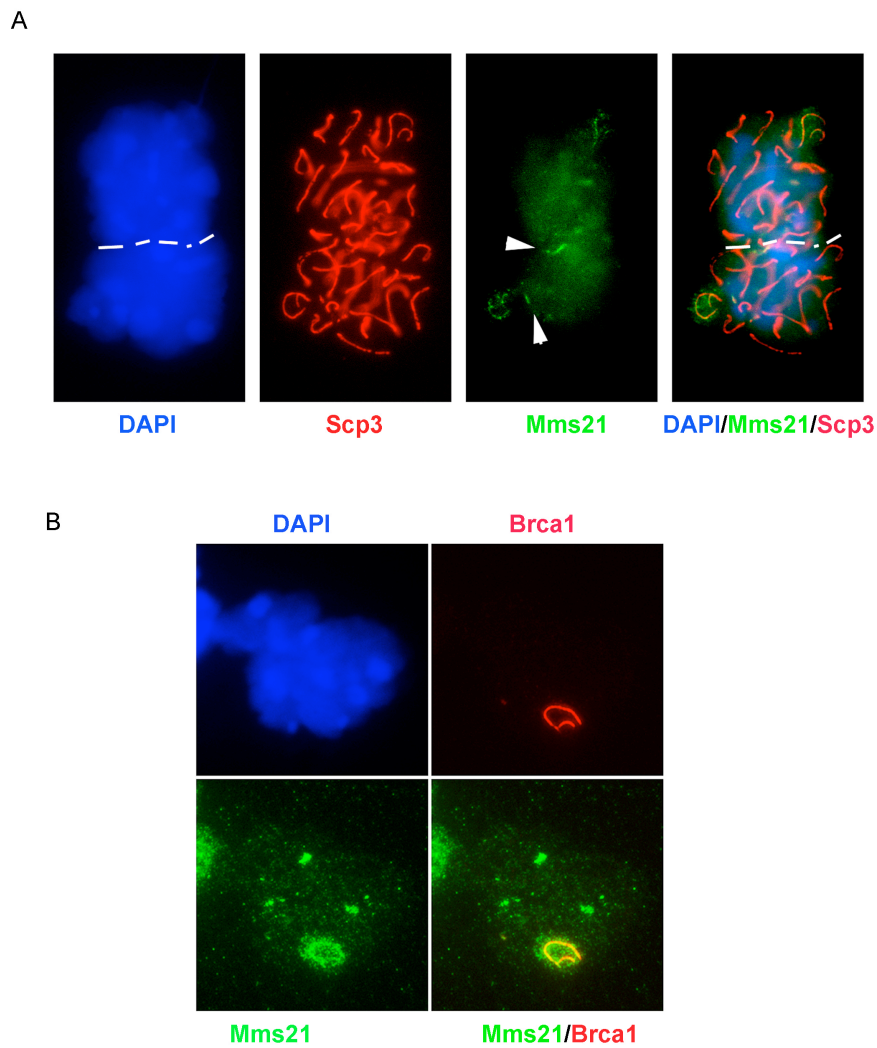
**Figura 30. Expresión de Mms21 en tejidos murinos.** A: Tinción inmunohistoquímica de un embrión de e13.5 con anti-Mms21 y anti-KI-67. B: *Western blot* realizado con extractos proteicos procedentes de varios tejidos murinos adultos.

Este resultado nos recordó la fuerte tinción de Mms21 que se observaba en espermatoцитos procedentes de testículos humanos (ver **figura 26**). Estas células están paradas en G2 realizando la recombinación meiótica (mediante recombinación homóloga mediada por Spo 11 y Rad 51) (Handel and Schimenti, 2010). Para estudiar este hecho en más detalle purificamos espermatoцитos de ratones silvestres y realizamos inmunotinciones con anticuerpos contra las proteínas Mms21 y Scp3 (proteína del complejo sinaptonémico). La profase I de la meiosis es una fase larga y compleja durante la cual se rompe activamente el DNA (gracias a la enzima Spo11) y se repara de tal manera que los cromosomas homólogos intercambian fragmentos de DNA, proceso que incrementa la variabilidad de la información genética de la población. Esta fase dura varios días y se puede subdividir a su vez en otras 4 fases: leptotene, zigotene, paquitene y diplotene. Estas fases se pueden diferenciar gracias al patrón de tinción de Scp3, así como por el grado de fragmentación del DNA (determinable mediante tinción con  $\gamma$ H2AX):

- Durante leptotene, el patrón de Scp3 forma débiles hilos ya que los cromosomas no están sinapsados o apareados. A pesar de ello, y en contra de lo que podría esperarse, el DNA está siendo fragmentado y se detecta una tinción pannuclear de  $\gamma$ H2AX.

- Durante zigotene, la sinapsis incrementa, lo cual es observable porque en algunos fragmentos el patrón de tinción de Scp3 es más intenso. A la vez, el DNA está siendo reparado mediante recombinación homóloga mediada por Rad51 y la tinción de  $\gamma$ H2AX va desapareciendo.
- Durante paquitene la sinapsis es completa, y Scp3 forma grueso hilos a lo largo de todos los bivalente (cromosomas homólogos sinapsados). Apenas quedan zonas asinapsadas, la principal es la conformada por las regiones no homólogas de los cromosomas X e Y, que no deben intercambiar información. En este momento se dispara un *checkpoint* de asinapsis, y esta estructura, llamada cuerpo sexual o cuerpo XY, se puede detectar mediante tinción con  $\gamma$ H2AX, ATR o Brca1. Esta interesante observación aún no se comprende, pero se sabe que el cuerpo XY no presenta rupturas en el DNA. Durante esta fase el DNA ya ha sido reparado y sólo queda que los bivalentes se resuelvan.
- Durante diplotene el patrón de Scp3 vuelve a ser débil ya que los cromosomas homólogos se están separando, ya habiendo recombinado sus cromátidas.

Al realizar inmunofluorescencias en espermatocitos con Scp3 y Mms21 descubrimos que el anticuerpo anti-Mms21 no tiñe ninguna estructura durante las fases en la cuales hay rotura y reparación del DNA, pero sí tiñe algunas estructuras en paquitene, cuando la sinapsis es casi completa. El patrón de Mms21 en esta fase es ahusado y poco abundante, propio de las estructuras asinapsadas (**figura 31 A**). En cada espermatocito hay una región de asinapsis obligatoria: las regiones no homólogas de los cromosomas X e Y, por lo que decidimos comprobar si Mms21 reconoce regiones asinapsadas mirando si Mms21 localiza en el cuerpo XY. Esta zona de asinapsis es reconocida por proteínas como Brca1, aunque el papel que desempeña sigue sin entenderse aunque se sabe que no se trata de una ruptura del DNA. Como se muestra en la **figura 31 B**, Mms21 es capaz de reconocer esta estructura, al igual que Brca1. Esta observación es consistente con la localización de Smc5 (proteína a cuyo complejo pertenece Mms21), que ya había sido descrita (Taylor et al., 2001).



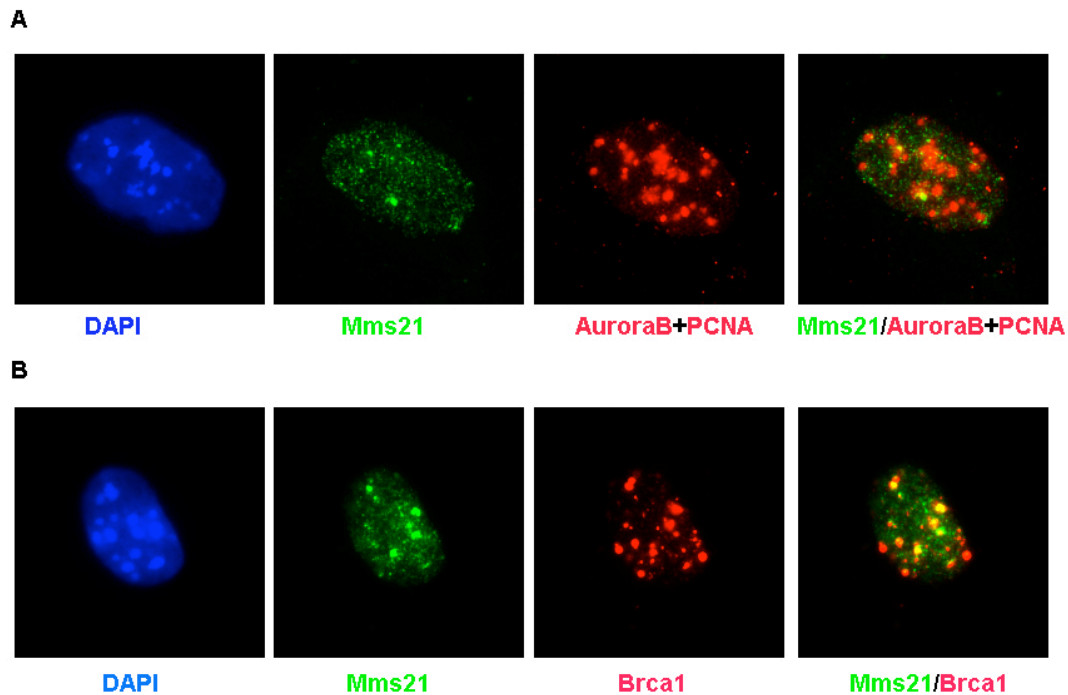
**Figura 31. Inmunotinción de espermatoцитos murinos silvestres.** A: Inmunotinción de 2 espermatoцитos en paquitene (definido por el patrón de Scp3). B: Inmunotinción del cuerpo XY con anti-Brca1 y anti-Mms21.

Así pues, Mms21 reconoce en espermatoцитos una estructura que no es una rotura del DNA, observación que encaja con el hecho de que las células con bajos niveles de Mms21 detectan y reparan igual que las silvestres las roturas generadas mediante varios tratamientos, aunque esto no explica la menor supervivencia ante tratamientos con MMS.

### 2. 2. 2. Estudio de la expresión de Mms21 en células

Ya que Mms21 colocaliza con Brca1 en espermatoцитos, decidimos estudiar este fenómeno en células somáticas. Si bien, como ya se había mostrado (**figura 27**), Mms21 presenta un patrón nuclear difuso, mediante una fijación que permite extraer el citoplasma

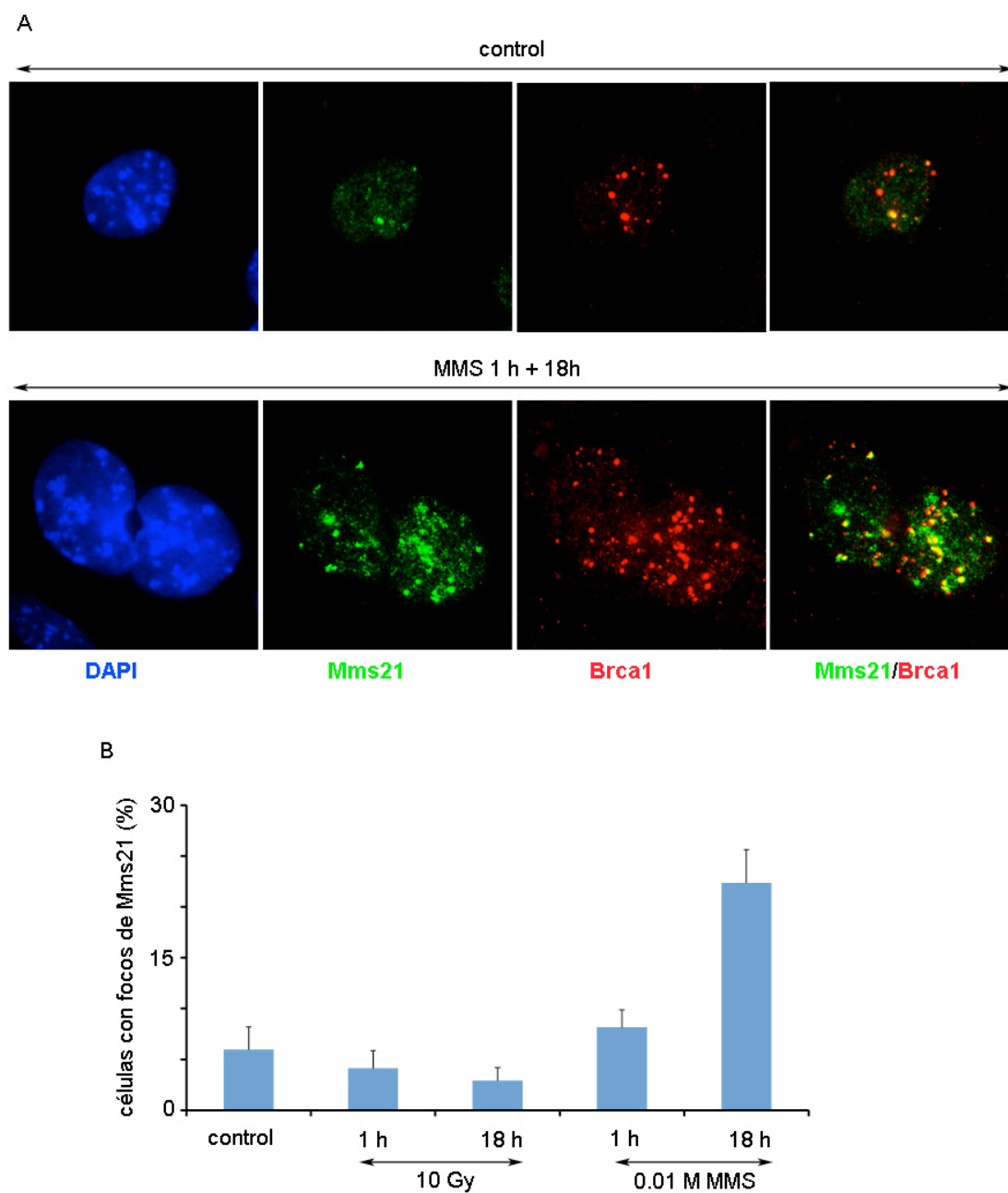
y parte del nucleoplasma, pudimos ver que Mms21 forma focos asociados a las fases S y G2 ya que aparecen en MEF silvestres que también expresan PCNA o AuroraB (**figura 32 A**). Además, tal y como sucedía en el cuerpo XY, los focos de Mms21 colocalizan en gran medida con los focos de Brca1 (**figura 32 B**).



**Figura 32. Mms21 forma focos asociados a Brca1 en células en fases S y G2.** A: Inmunofluorescencia realizada en MEF silvestres sin dañar con anti-PCNA (marcador de fase S) y anti-AuroraB (marcador de fase G2). B: Inmunofluorescencia realizada en MEF silvestres sin dañar realizada con anti-Mms21 y anti-Brca1.

Esta observación es muy interesante ya que se sabe que Brca1 puede formar varios tipos de focos. Por un lado, puede relocarse a los focos inducidos por daño, como la irradiación, promoviendo la reparación del DSB mediante recombinación homóloga. En este caso, Brca1 colocaliza con otras proteínas que se encuentran en las rupturas de doble cadena (como  $\gamma$ H2AX y 53BP1). Sin embargo, Brca1 también forma focos en células no dañadas. En este caso, los focos no son DSB ni colocalizan con  $\gamma$ H2AX y 53BP1. De hecho, apenas se conocen proteínas que colocalicen con estos focos, que a partir de ahora llamamos focos endógenos. Al contrario que Brca1, Mms21 no se relociza a focos asociados a DSB ni colocaliza con otras proteínas que sí lo hacen. Por ello, quisimos encontrar alguna condición en la que pudiéramos incrementar los focos de Mms21. Para ello tratamos MEF silvestres con irradiación (como control de la inducción de los focos de

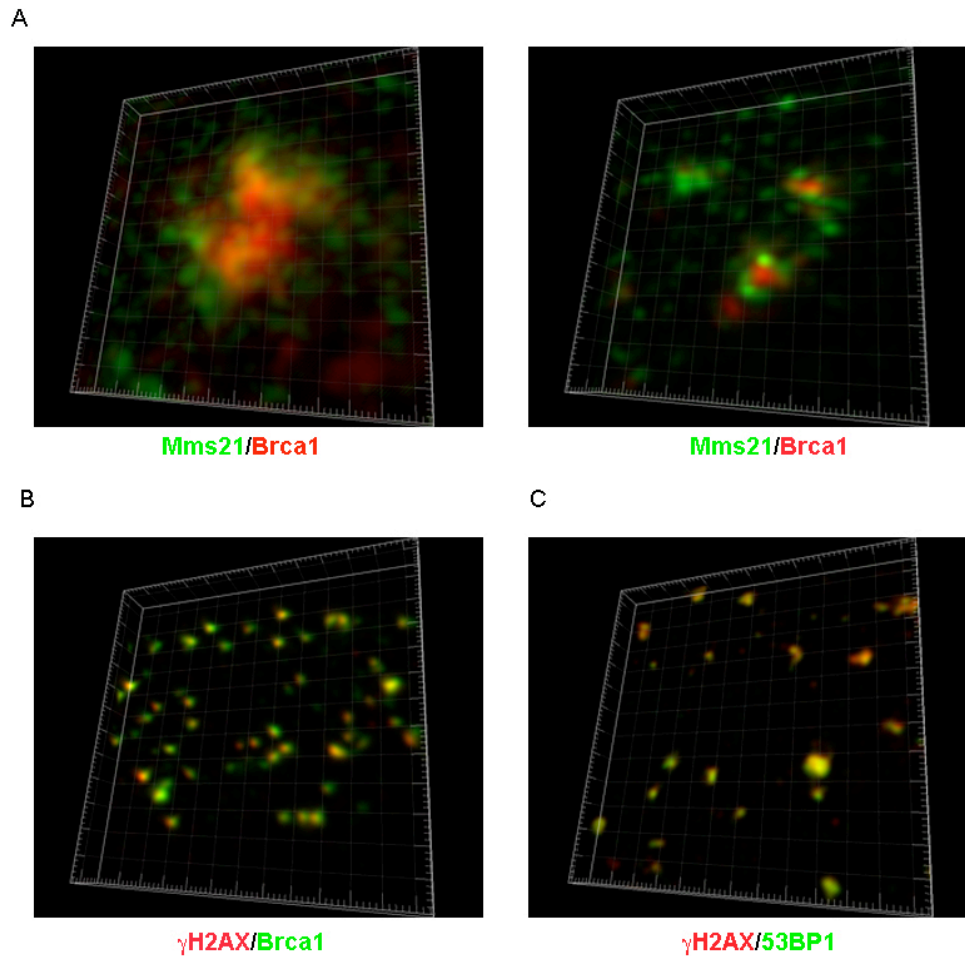
Brca1 pero no de Mms21) y con MMS en distintas condiciones. Como se muestra en la **figura 33 B**, los focos de Mms21 no incrementan cuando las células son irradiadas ni cuando son tratadas con MMS durante 1 hora aunque los de Brca1 sí lo hacen. Esta observación encaja con el hecho que las células con bajos niveles de Mms21 tengan una DDR similar a las células silvestres. Sin embargo, los tratamiento con MMS sí inducen focos de Mms21 cuando se permite que las células se recuperen de estos tratamientos (**figura 33 A**). Esta observación encaja con lo que sugiere (Branzei et al., 2006): Mms21 no tendría relación con la reparación del daño generado por MMS sino con el manejo de estructuras intermediarias de la recombinación que surgen cuando se detienen las horquillas de replicación, algo que se induce con tratamiento de MMS. Así, los focos de Mms21 también se pueden inducir con inhibidores de la enzima PARP (iPARP), que causan roturas de cadena sencilla que también provocan la parada de las horquillas de replicación y la creación de estructuras intermediarias de la recombinación.



**Figura 33. Inducción de los focos de Mms21.** A: Inmunofluorescencia realizada en MEF sin tratar y tratados con 0.01 M MMS durante 1 hora a los que luego se les permite una recuperación de 18 horas con anti-Mms21 y anti-Brca1. B: Cuantificación de los focos de Mms21 en MEF sin tratar (control) y tratados con 10 Gy o 0.01 M MMS y analizando el número de focos de Mms21 a 1 hora y tras 18 horas.

Dada esta colocación entre Mms21 y Brca1, quisimos ver en más detalle la estructura de estos focos endógenos. Para ello analizamos mediante microscopía confocal la estructura de los mismos. Como se ve en la **figura 34 A**, Mms21 y Brca1 se encuentran uno al lado del otro, en la misma estructura pero en espacios excluyentes. Es más, Mms21

parece rodear a Brca1, como si reconocieran zonas diferentes de la misma estructura. Esta disposición es característica de esta estructura, ya que Brca1 puede colocalizar perfectamente con otras proteína en otras estructuras, como es el caso de los focos inducidos por irradiación en los que de Brca1 y  $\gamma$ H2AX o  $\gamma$ H2AX y 53BP1 colocalizan de forma precisa (**figura 34 B y C**).

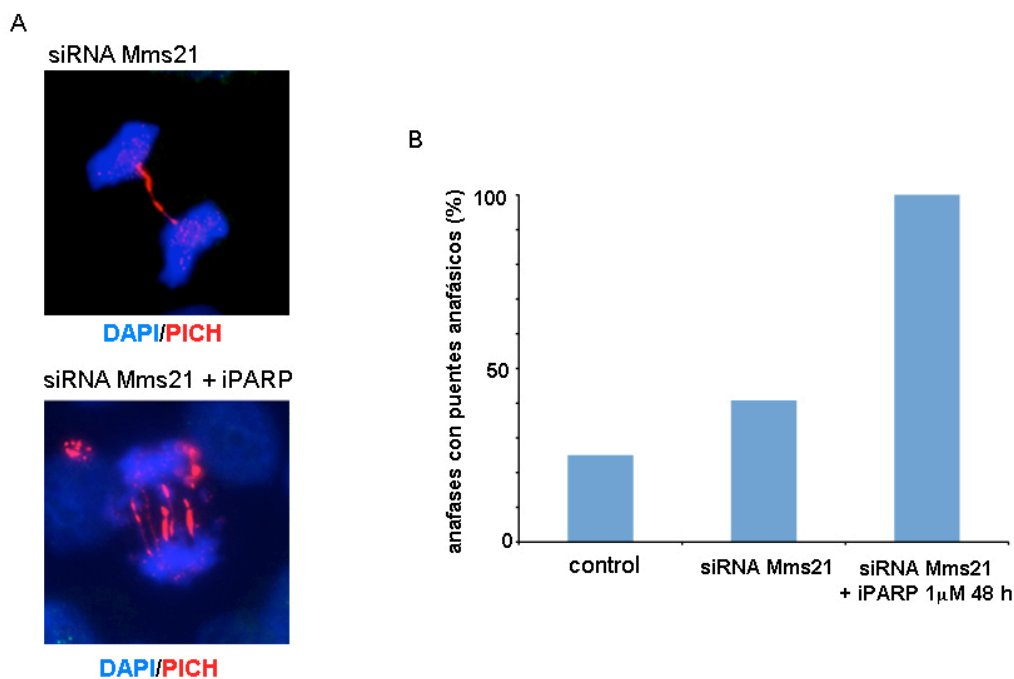


**Figura 34. Estructura de los focos de Mms21 y Brca1.** A: Reconstrucción 3D de un foco de Mms21 y Brca1. B: Reconstrucción 3D de focos inducidos por radiación de  $\gamma$ H2AX y Brca1. C: Ídem,  $\gamma$ H2AX y 53BP1.

Ya que habíamos visto en MEF silvestres que el número de focos de Mms21 asociados a Brca1 incrementa al tratar las células con MMS o iPARP, decidimos estudiar la consecuencia de estos tratamientos en condiciones de bajos niveles de Mms21. Comenzamos estudiando líneas humanas establecidas porque ya habíamos sido capaces de



ver puentes anafásicos en células tratadas con siRNA contra Mms21 (**figura 27 C**). Por otro lado, decidimos utilizar iPARP para estudiar viabilidad y sensibilidad ya que recientemente se ha descrito que la ausencia de Brca1 sensibiliza enormemente las células a los tratamientos con iPARP (Turner et al., 2008). Este hecho se conoce como letalidad sintética, y se está utilizando en el tratamiento de tumores de mama (Helleday, 2010). Células HeLa tratadas con siRNA contra Mms21 e iPARP durante 24 o 48 horas presentaron niveles altísimos de aberraciones mitóticas. En concreto, el número de anafases que presentaban puentes cromosómicos (detectados tanto mediante tinción con DAPI como con inmunotinción contra la proteína PICH) incrementó hasta el 100%, presentando la mayoría de ellas varios puentes (**figura 35**).



**Figura 35. Las células con bajos niveles de Mms21 son hipersensibles al tratamiento con iPARP.** A: Inmunofluorescencia realizada en células HeLa transfectadas con siRNA contra Mms21 sin tratar y tratadas con iPARP (1µM durante 48 horas) en las que se analiza la acumulación de puentes anafásicos (marcados por PICH). B: Cuantificación de las mitosis con puentes anafásicos en células control, tratadas con siRNA contra Mms21 y tratadas con siRNA contra Mms21 y con iPARP 1µM durante 48 horas.

En conclusión, y gracias a las observaciones realizadas en tejidos murinos (**figura 30**) y espermatoцитos (**figura 31**), hemos descubierto que Mms21 colocaliza con Brca1 en focos endógenos que pueden ser inducidos mediante tratamientos con MMS o iPARP. Si bien no conocemos su función, el hecho de que aumente el número de puentes anafásicos sugiere

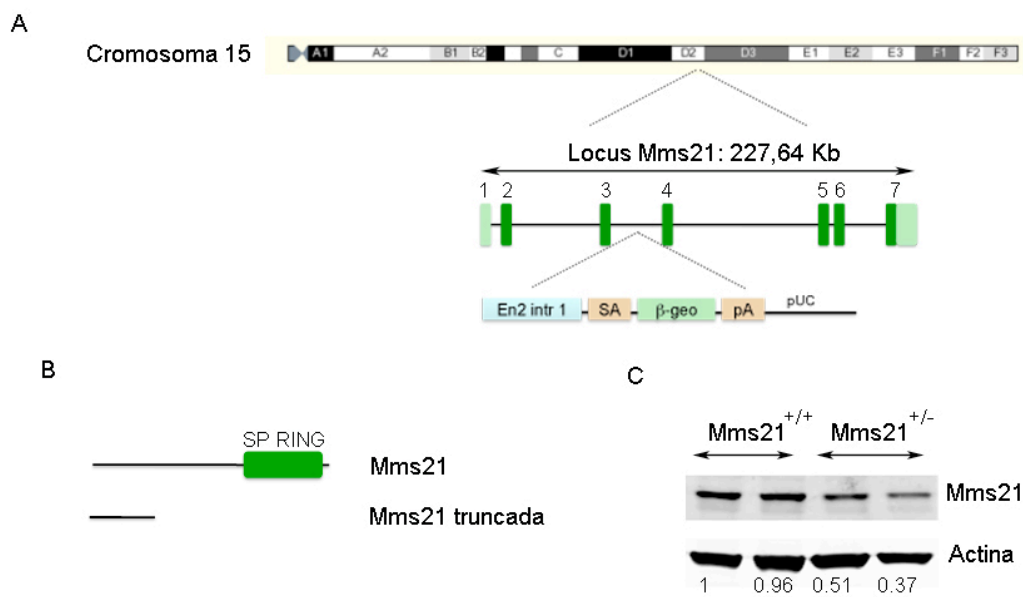
que el complejo podría tener relación con el manejo de las estructuras intermediarias de la recombinación, como se ha sugerido en levaduras. Llegados a este punto, decidimos desarrollar dos modelos murinos que nos permitieran evaluar las consecuencias fisiológicas de la pérdida de función de Mms21.

## 2. 3. Generación de modelos murinos

Mms21 es esencial en levaduras, y los mutantes hipomorfos son hipersensibles a agentes que causan daño en el DNA. En lo referente a modelos murinos, hasta ahora no se ha publicado ningún modelo de ninguna de las proteínas del complejo Smc5/5, al que pertenece Mms21. Por ello, nos planteamos generar varios modelos y poder entender en más detalle su papel fisiológico en el mantenimiento de la integridad genómica.

### 2. 3. 1. Mms21 KO

A pesar del carácter esencial descrito para este complejo en levaduras, decidimos generar un modelo de pérdida de función (*knock out*, KO) por si una reducción en los niveles de Mms21 podría revelar fenotipos haploinsuficientes. Esta línea de ratones se generó a partir de un clon de ES que obtuvimos del Sanger Institute (clon AA0032), que poseía un *genetrapp* integrado en el intrón 3 – 4 del gen de Mms21. Este *genetrapp* consta de un aceptor de *splicing*, una proteína de fusión  $\beta$ -geo (neomicina más  $\beta$ -gal) y un codón de finalización seguido de un poliA (**figura 36 A**). La consecuencia de esta inserción es la interrupción de la traducción del mRNA de Mms21 tras el exón 3, lo que genera una proteína truncada de unos 80 aa que no tiene el dominio catalítico SP-RING (**figura 36 B**). Esta línea de ES fue microinyectada en blastos B6 por la Unidad de Transgénicos, generando quimeras que se cruzaron con animales B6 silvestres para generar animales Mms21<sup>GT/+</sup>. Un análisis mediante *western blot* reveló que los niveles de Mms21 en linfocitos procedentes de animales Mms21<sup>GT/+</sup> se reducían alrededor del 50% (**figura 36 C**). Esto indica que el alelo con el *genetrapp* insertado (GT) se comporta como un alelo nulo, por lo que, para simplificar la nomenclatura, a partir de ahora nos referimos a estos animales como Mms21<sup>+/-</sup>.

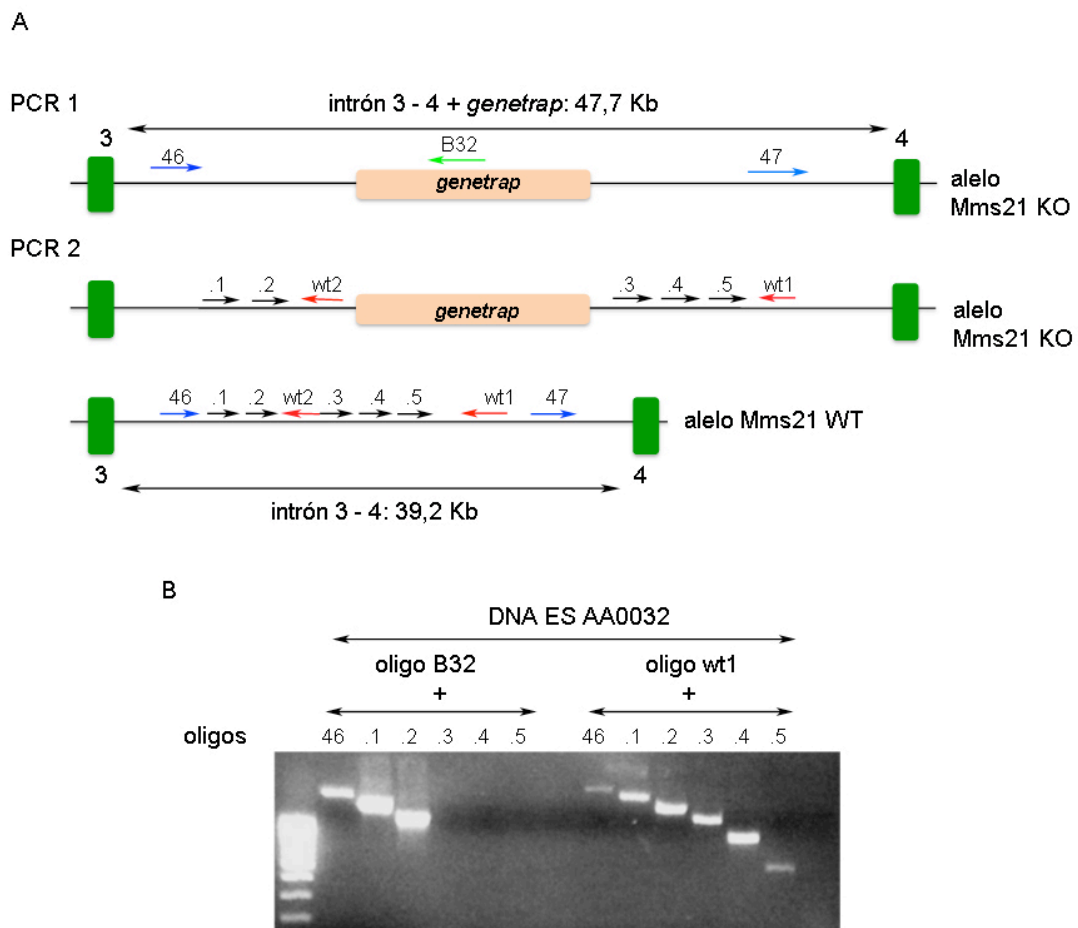


**Figura 36. Estructura del locus de Mms21.** A: Locus de Mms21, estructura del gen y punto de inserción del *genetrap*. B: La inserción del *genetrap* produce una versión truncada de Mms21 sin el dominio catalítico SP-RING. C: análisis mediante western blot de los niveles de Mms21 en linfocitos procedentes de animales silvestres y Mms21<sup>GT/+</sup> o Mms21<sup>+/-</sup>, debido a la reducción del 50% en los niveles de Mms21.

### 2. 3. 1. 1. Caracterización del lugar de integración del *genetrap* en el locus *Mms21*

En ratones, el locus de Mms21 se encuentra en el cromosoma 15. Consta de casi 230 Kb, que se disponen en 7 exones y 6 intrones muy grandes y con muchas zonas repetitivas, y produce una única variante de *splicing*. La inserción del *genetrap* se había confirmado (datos aportados por Welcome Trust Sanger Institute) mediante la técnica 5'RACE. Esta técnica permite determinar el exón detrás del cual está insertado el *genetrap* de interés, con lo que el sitio exacto de integración no se conocía. Dado que el intrón 3-4 tiene 39,181 Kb, el genotipado mediante PCR de estos ratones no era posible. Por ello decidimos localizar el punto de inserción mediante una aproximación basada en 2 PCRs secuenciales. Para la primera, diseñamos oligos *forward* o 5' cada 1000 pb aproximadamente a lo largo de todo el intrón y realizamos PCRs con un oligo *reverse* o 3' que anilla en el *genetrap* (B32). En la **figura 37 A** se indican los oligos 46, 47 y B32. Dado que el intrón 3-4 es tan grande, sólo aparecieron producto de PCR en las reacciones hechas con los oligos más cercanos al *genetrap* (oligos 45 y 46) y nunca a partir del 46, por lo que dedujimos que el punto de inserción del mismo estaba antes del punto en el que anilla este oligo **figura 37 A**. Para definir mejor el punto de inserción y para tener una manera de genotipar también el alelo

silvestre, diseñamos nuevos oligos *forward* (que llamamos 46.1 a 46.5) entre el oligo 46 y el 47 y un oligo *reverse* wt1 justo antes del oligo 47 (**figura 37 A**). Al realizar estas PCRs sólo obtuvimos productos con los oligos 46.3 a 46.6, por lo que dedujimos que el *genetrap* se encontraba antes de la secuencia con la que anilla el oligo 3. Así, diseñamos un oligo *reverse* wt2 justo después del oligo 46.2. En la **figura 37 B** se muestran los productos de PCR obtenidos con esta estrategia. Realizada con DNA procedente del clon AA0032 y con los oligos indicados en la figura, se ve que el clon porta un alelo con el *genetrap* que interrumpe la expresión de Mms21 (alelo KO) y otro alelo silvestre (alelo wt). Finalmente, mediante secuenciación de la PCR realizada con los oligos 46N2 y B32 determinamos que el punto de inserción estaba en la posición 34.741 del intrón 3-4, o lo que es lo mismo, en la posición 59.282.428 del cromosoma 15.



**Figura 37. Estrategia para encontrar el punto de inserción del *genetrap* de Mms21.** A: Esquema del alelo KO y el alelo wt, y los oligos que se utilizaron para descubrir el punto de integración. B: PCR realizada con los oligos dibujados en (A) con DNA procedente del clon AA0032 (Mms21 <sup>+/+</sup>).

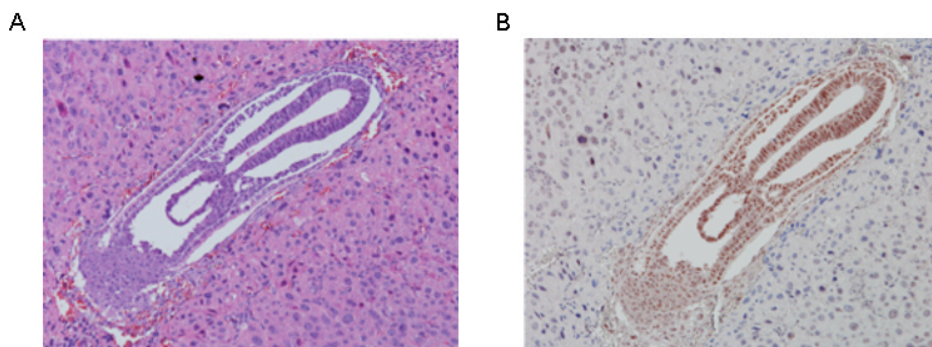
### 2. 3. 1. 2. *Mms21* es esencial para el desarrollo embrionario murino

Una vez establecido el punto de inserción del *genetrap* pudimos analizar la frecuencia con la que aparecían los diferentes alelos (silvestre, heterocigoto y *knock out* o KO). Tras analizar un número estadísticamente significativo de animales nacidos de ratones *Mms21*<sup>+/-</sup> cruzados entre sí (123 animales) descubrimos que las proporciones se ajustaban a una razón mendeliana donde uno de los alelos es letal. Así, encontramos un 62% de heterocigotos, un 38% de silvestres y un 0% de animales *Mms21*<sup>-/-</sup> (Tabla 2).

Adultos (n=123)	Esperado	Obtenido	Esperado si <i>Mms21</i> <sup>-/-</sup> es letal
<i>Mms21</i> <sup>-/-</sup>	25%	0%	0%
<i>Mms21</i> <sup>+/-</sup>	50%	61,78%	66,66%
<i>Mms21</i> <sup>+/+</sup>	25%	38,21%	33,33%

**Tabla 2. Los ratones *Mms21*<sup>-/-</sup> mueren antes del nacimiento.** Se muestran las frecuencias esperadas y observadas en el nacimiento para cada genotipo (*Mms21*<sup>+/+</sup>, *Mms21*<sup>+/-</sup> y *Mms21*<sup>-/-</sup>) tanto si existiera letalidad embrionaria como si no existiera.

En vista de estos resultados, analizamos la frecuencia de animales *Mms21*<sup>-/-</sup> en distintos estadios embrionarios. No detectamos ningún embrión *Mms21* a mitad de gestación (e10.5 y e13.5), ni tampoco gran número de abortos, sugiriendo que la muerte ocurre mucho antes de los estadios e13.5 y e10.5. También analizamos secciones de deciduas de un total de 18 embriones de estadio e6.5. Si los embriones *Mms21*<sup>-/-</sup> estuvieran presentes en esta fase, deberíamos haber encontrado un 25%, es decir, 4 ó 5. Sin embargo, todos los embriones que analizamos tenían buena morfología y resultaron ser positivos para la tinción contra *Mms21*, indicando que la muerte de los embriones *Mms21* debía ocurrir antes de esta fase (figura 38).



**Figura 38. Inmunohistoquímica e inmunohistotinciones de un embrión de e6.5 en buen estado,** representativo del análisis de embriones de e6.5. A: Hematoxilina/ Eosina. B: Mms21.

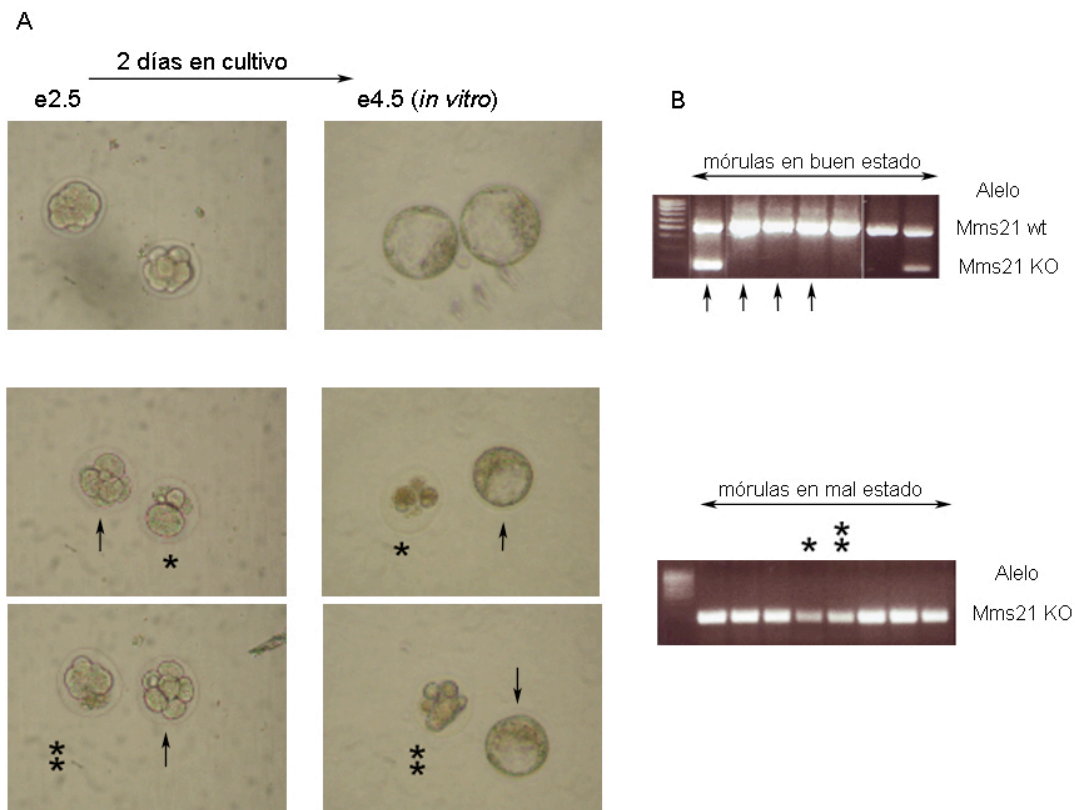
Dado estos resultados, extrajimos mórulas (embriones de estadio e2.5) y pudimos demostrar mediante PCR que en esta fase aparecen embriones Mms21<sup>-/-</sup> en proporciones mendelianas (**Tabla 3**). Así, la pérdida de Mms21 produce letalidad embrionaria entre los estadios e2.5 y e6.5.

	Mms21 <sup>+/+</sup>	Mms21 <sup>+/-</sup>	Mms21 <sup>-/-</sup>
e2.5 (n=45)	28,88%	48,88%	22,22%

**Tabla 3. Los ratones Mms21<sup>-/-</sup> progresan hasta estadio e2.5.** Proporciones de los genotipos Mms21<sup>+/+</sup>, Mms21<sup>+/-</sup> y Mms21<sup>-/-</sup> obtenidas en 45 embriones de e2.5.

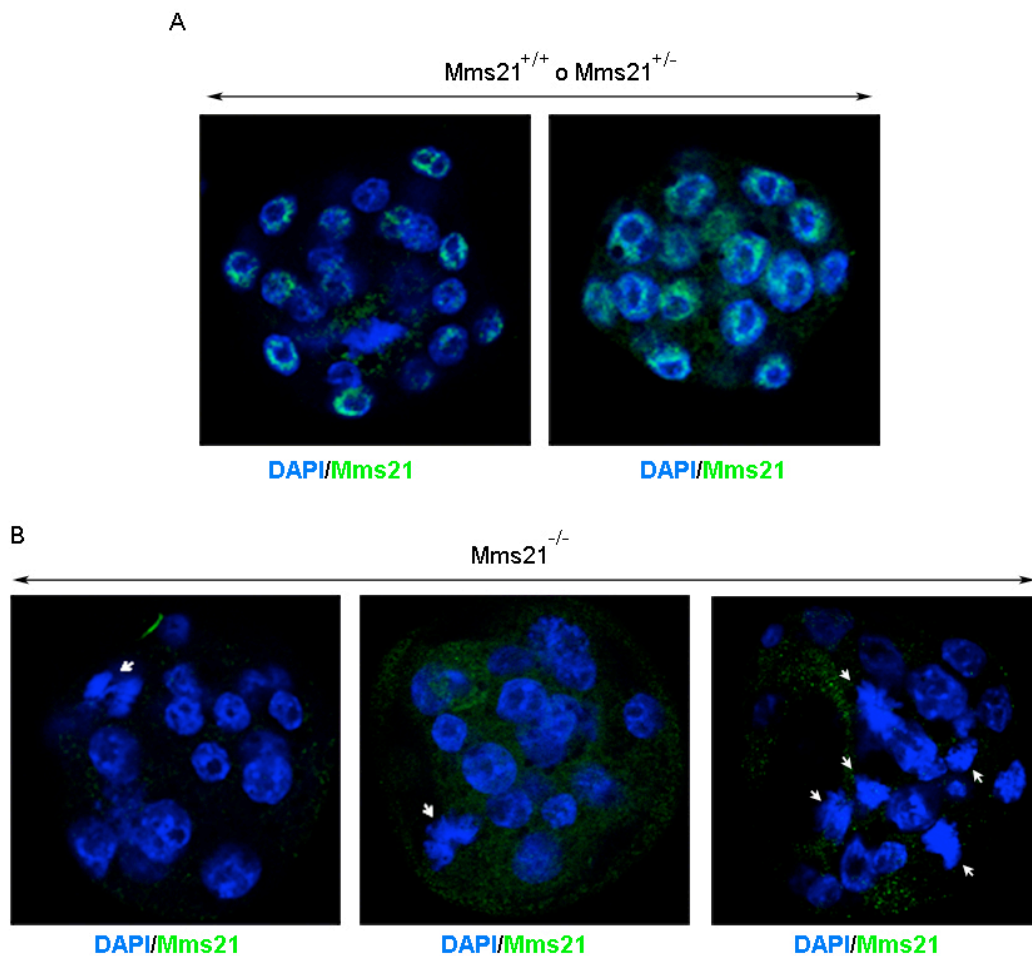
Para entender que les ocurría a los embriones Mms21<sup>-/-</sup> cultivamos *in vitro* mórulas y observamos que aproximadamente el 25% de ellas degeneraba al los 2 días en cultivo, antes de llegar a la fase de blastocisto (**figura 39 A**). Antes de degenerar completamente, ésta mórulas en mal estado presentaban blastómeros de distinto tamaño lo cual encaja con una segregación de cromosomas anómala. Al genotipar estos embriones, vimos que eran todos Mms21<sup>-/-</sup> (**figura 39 B**). Así pues, concluimos que los embriones Mms21<sup>-/-</sup> presentan letalidad preimplantacional, posiblemente asociada a defectos de segregación.

También intentamos establecer líneas de ES Mms21<sup>-/-</sup>, resultando esto imposible ya que la masa celular interna (a partir de la cual se establecen las colonias de ES) de los embriones Mms21<sup>-/-</sup> degenera rápidamente o ni siquiera se forma. Finalmente intentamos rescatar la letalidad cruzando animales Mms21<sup>+/-</sup> y p53<sup>+/-</sup> entre sí para generar animales Mms21<sup>-/-</sup>; p53<sup>-/-</sup> ya que la ausencia de p53 rescata total o parcialmente el fenotipo letal de algunos modelos murinos de proteínas de reparación, como es el caso de los modelos murinos Lig4<sup>-/-</sup>; p53<sup>-/-</sup> o Brca1<sup>Δ11/Δ11</sup>, p53<sup>-/-</sup> (Frank et al., 2000; Xu et al., 2001). En nuestro caso, no observamos ningún adulto Mms21<sup>-/-</sup>; p53<sup>-/-</sup>, así como ningún embrión de e10.5. por tanto, concluimos que la ausencia de p53 no rescata de forma significativa la letalidad de los ratones Mms21<sup>-/-</sup>.



**Figura 39. Los embriones  $Mms21^{-/-}$  degeneran antes de llegar a la fase de blastocisto.** A: Fotografía de varias mórulas al ser extraídas (e2.5) y tras 2 días de cultivo (e4.5). Los asteriscos marcan embriones en mal estado y las flechas embriones en buen estado. B: PCR *nested* de algunos embriones, realizada tras 2 días de cultivo. Todos los embriones en buen estado resultaron ser  $Mms21^{+/+}$  o  $Mms21^{+/-}$  (flechas) y todos los embriones en mal estado son  $Mms21^{-/-}$ .

Sabiendo esto, quisimos entender las causas de la muerte de los embriones  $Mms21^{-/-}$ . Para ello, extrajimos mórulas y pudimos diferenciar mediante inmunofluorescencia realizada con el anticuerpo que desarrollamos contra *Mms21* entre embriones silvestres o heterocigotos y embriones homocigotos nulos. De manera notoria, los embriones  $Mms21^{-/-}$  presentaban un número muy elevado de células arrestadas en mitosis, y además en algunas de estas mitosis pudimos ver puentes anafásicos y otras aberraciones (**Figura 40 B**). Por ello, concluimos que la causa de la muerte de éstos es la misma que la observada en células humanas con bajos niveles de *Mms21*: la acumulación de estructuras mitóticas aberrantes.



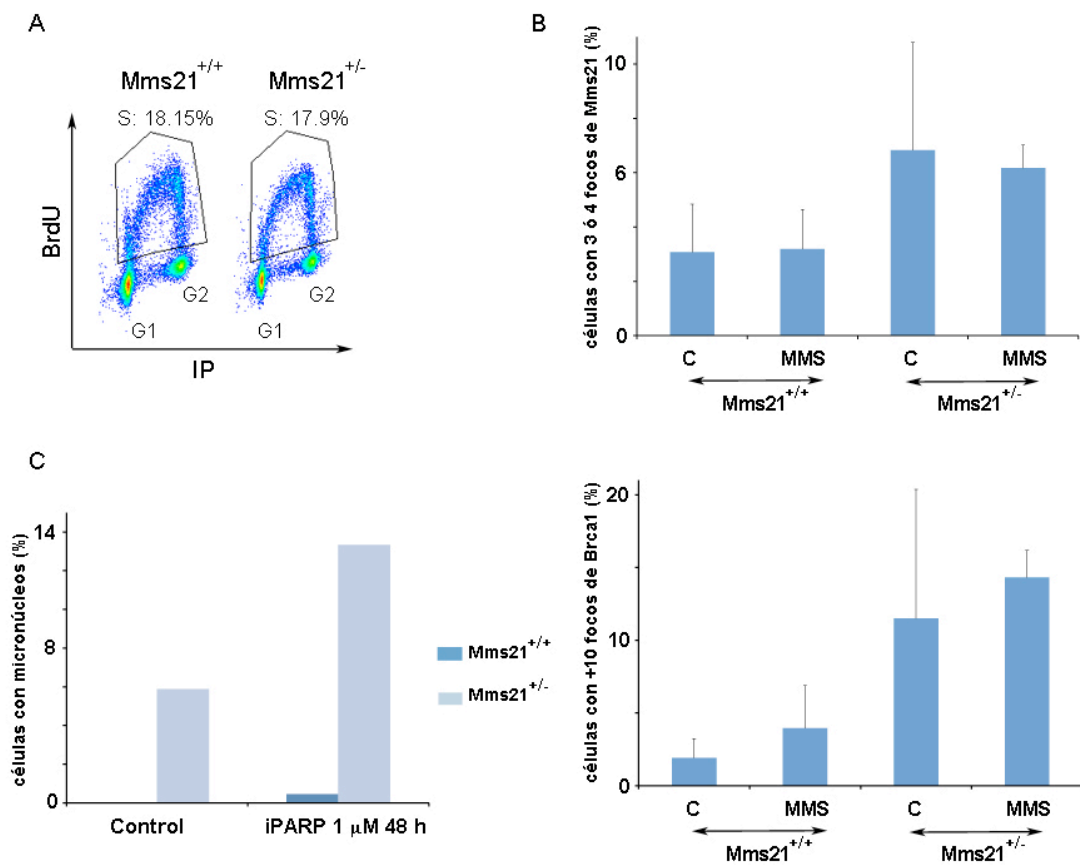
**Figura 40. Inmunotinción de mórulas.** A: Mórulas Mms21 silvestres o heterocigotas (presentan tinción de Mms21 y mitosis normales). B: Las mórulas Mms21<sup>-/-</sup> no presentan tinción de Mms21 y tienen mitosis aberrantes, marcadas por las flechas.

### 2. 3. 1. 3. Caracterización de células Mms21 heterocigotas

Para comenzar el estudio del fenotipo de los ratones Mms21<sup>+/-</sup> comenzamos estudiando 2 tipos celulares primarios que podemos obtener fácilmente de ellos: MEF y linfocitos B. Los MEF son células procedentes de embriones con una capacidad proliferativa limitada pero suficiente para permitir numerosos estudios, siendo su principal ventaja es que son células primarias que no tiene alteradas rutas relevantes para nuestros estudios. Puesto que se extraen de embriones de estadio e13.5, tan solo pudimos trabajar con MEF Mms21<sup>+/+</sup> y Mms21<sup>+/-</sup>. Para comenzar, comparamos su capacidad proliferativa (medida por su incorporación de BrdU), que resultó ser muy similar (**figura 41 A**).



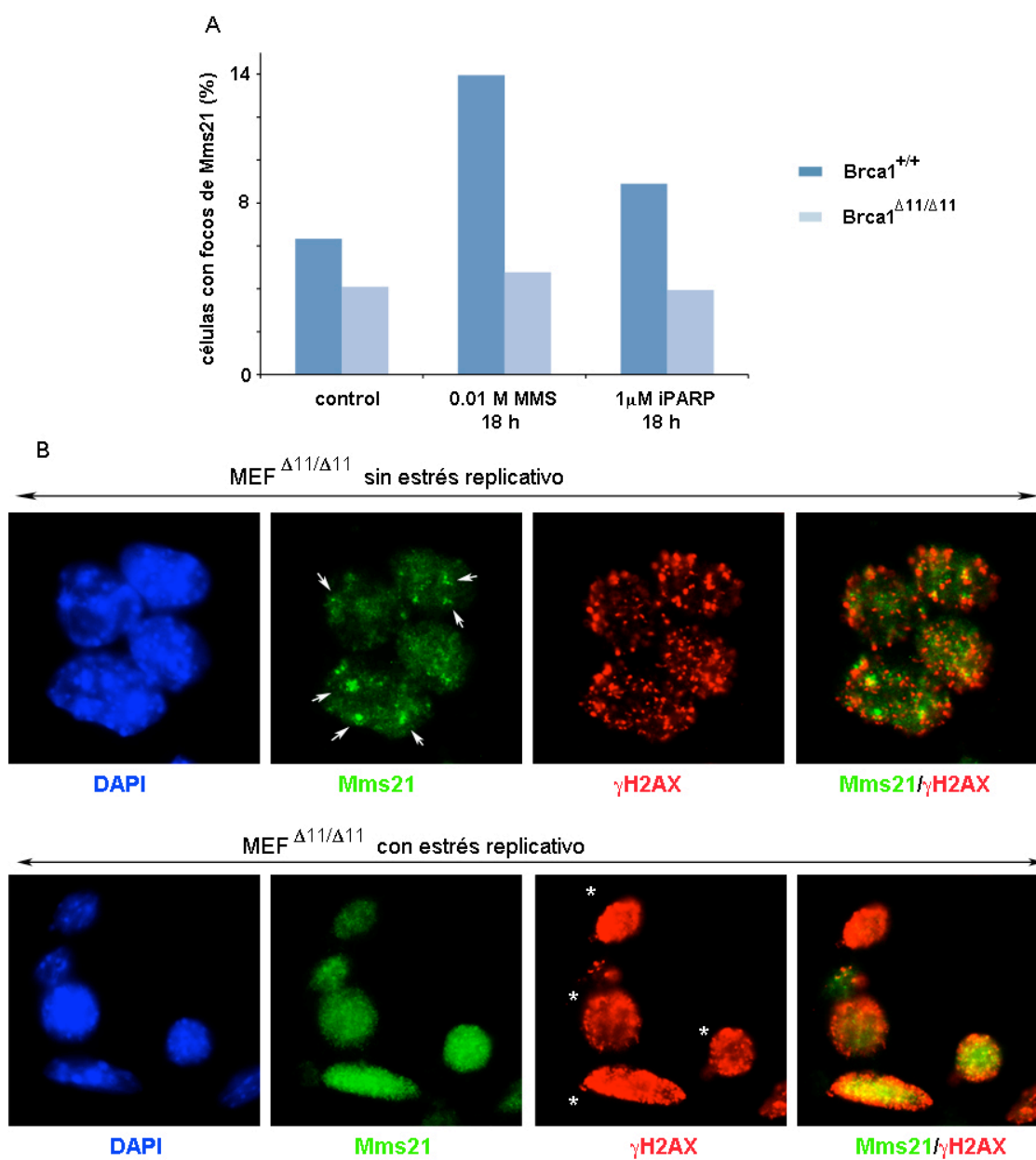
También comprobamos si la formación de focos de Mms21 y de Brca1 sufría alguna variación. El análisis realizado indica que los MEF Mms21<sup>+/-</sup> tienen más focos de Brca1 que los silvestres. Como se muestra en **figura 41 B**, la población de células Mms21<sup>+/-</sup> presenta más células con 3 ó 4 focos de Mms21 y con más de 10 focos de Brca1. En el caso de Mms21, esta población con 3 ó 4 focos de Mms21 no incrementa ante un tratamiento con MMS (tratamiento de 1 hora y recuperación de 18 horas), lo que significa que las estructuras que Mms21 está reconociendo en esas células probablemente no se deben al tratamiento con MMS. Es decir, la disminución en los niveles de Mms21 implica la acumulación de estas estructuras. Esto significa que Mms21 es un gen haploinsuficiente, es decir, la pérdida del 50% de la proteína (**figura 36 C**) es capaz de producir un fenotipo diferente al de las células silvestres. Debido a que las células humanas y los embriones Mms21<sup>-/-</sup> presentan mitosis con puentes anafásicos, decidimos analizar esta situación en los MEF Mms21<sup>+/-</sup>. Dado que la frecuencia de mitosis es muy baja en MEF, decidimos analizar el número de micronúcleos, que se forman como consecuencia de los puentes anafásicos (Hoffelder et al., 2004). Como se ve en la **figura 41 C**, los MEF Mms21<sup>+/-</sup> acumulan mayor número de ellos. Dado que son células primarias, poco resistentes a la pérdida de material genético, la consecuencia de estos tratamientos se traduce en una elevada mortalidad, más alta en el caso de los heterocigotos. Esto indica que los MEF Mms21<sup>+/-</sup> son más sensibles a MMS y iPARP que los silvestres, al igual que lo son las células humanas con bajos niveles de Mms21.



**Figura 41. Caracterización de los MEF Mms21<sup>+/-</sup>.** A: Medida de la proliferación por incorporación de BrdU, se representan las fases G1, S y G2. PI: yoduro de propidio. B: Cuantificación de las células con 3 ó 4 focos de Mms21 y más de 10 focos de Brca1 sin tratamiento (C) y con 0.01 M MMS 1h más recuperación de 18 h. C: Medición de la acumulación de micronúcleos en MEF Mms21<sup>+/+</sup> y Mms21<sup>+/-</sup> sin tratamiento y con 1 μM iPARP durante 48 horas.

Ya que los MEF Mms21<sup>+/-</sup> tienen más focos de Brca1, nos preguntamos cuál sería el efecto de la ausencia de Brca1 sobre los focos de Mms21. Los ratones Brca1<sup>-/-</sup> presentan letalidad embrionaria preimplantacional, con lo que no se pueden generar MEF de este genotipo. Por ello trabajamos con MEF provenientes de ratones Brca1<sup>Δ11/Δ11</sup> (forma truncada de Brca1 no funcional) inmortalizados con SV40 (cedidos por el laboratorio del Dr. Andre Nussenzweig, NIH, Bethesda, EEUU). Tanto los MEF <sup>Δ11/Δ11</sup> como los silvestres proliferan al mismo ritmo, y en estado no dañado ambos son capaces de formar focos de Mms21. Esto significa que la ausencia de Brca1 (funcional) no parece afectar a la formación de focos de Mms21. Sin embargo, pudimos observar una diferencia en la capacidad de formación de focos de estas células ante un tratamiento con MMS (en las condiciones que incrementan los focos de Mms21). Los MEF silvestres se comportan de la manera esperada, pero no así los MEF Brca<sup>Δ11/Δ11</sup>, que parecen incapaces de formar más focos de

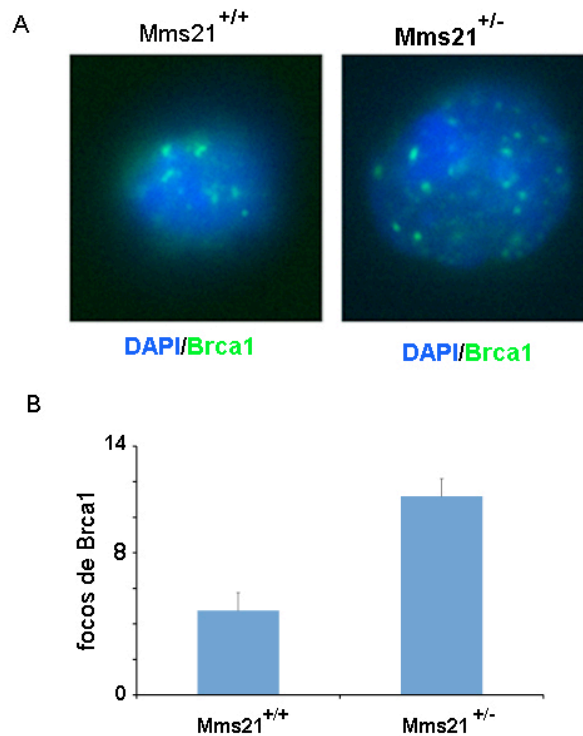
Mms21 en estas condiciones (**figura 42 A**). Sin embargo, los MEF *Brca1* <sup>$\Delta 11/\Delta 11$</sup>  acumulan severo estrés replicativo (marcado por una tinción pannuclear de  $\gamma$ H2AX) ante los mismos tratamientos que permitían la replicación en las silvestres. Este estrés aparece cuando numerosas horquillas de replicación colapsan debido al tratamiento con MMS en un fondo sin *Brca1* (funcional). Así, los focos de Mms21 se forman con normalidad en las células sin estrés replicativo (**figura 42 B**). Por tanto, *Brca1* no es esencial para la formación de focos de Mms21.



**Figura 42.** Los MEF *Brca1* <sup>$\Delta 11/\Delta 11$</sup>  son capaces de formar focos de Mms21. A: Cuantificación de los focos de Mms21 inducidos por 0.01 M MMS y 1  $\mu$ M iPARP (1 y 8 horas respectivamente, con recuperación de 18

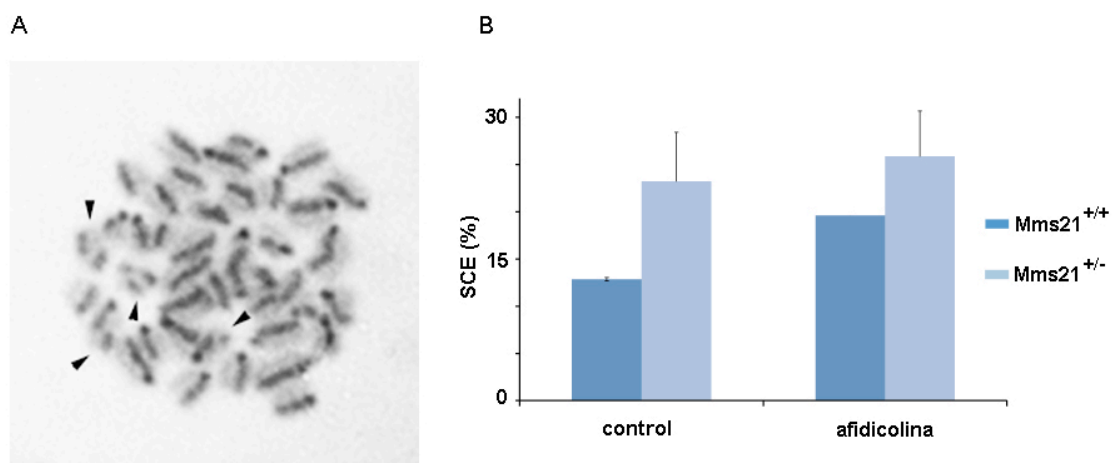
horas) en MEF silvestres y Brca1 <sup>Δ11/Δ11</sup>. B: Inmunofluorescencia realizada en MEF Brca1 <sup>Δ11/Δ11</sup> tratados con 0.01 M MMS. Las células que no acumulan estrés replicativo son capaces de formar focos de Mms21 (flechas) aunque la mayoría de los MEF Brca1 <sup>Δ11/Δ11</sup> presentan estrés replicativo (asteriscos) y no forman focos de Mms21.

Los linfocitos B conforman una población muy homogénea ya que en el bazo adulto se encuentran en G0 y al extraerlos y estimularlos adecuadamente, comienzan a proliferar rápidamente y en varias oleadas. Por ello, utilizamos estas células para estudiar la relación funcional entre Mms21 y Brca1 y sus consecuencias. Por un lado, tal y como habíamos descrito en MEF, observamos mediante inmunofluorescencia mayor número de focos de Brca1 en los linfocitos heterocigotos para Mms21 que en los silvestres, aún en ausencia de daño (**figura 43**). Como era de esperar, ambos focos están presentes sólo en linfocitos estimulados para que proliferen, ya que la función de ambas proteínas está asociada a recombinación homóloga y por tanto a las fases S y G2.



**Figura 43. Estudios en linfocitos B Mms21 <sup>+/-</sup>.** A: Inmunofluorescencia realizada con anti-Brca1 de linfocitos B Mms21 <sup>+/+</sup> y Mms21 <sup>+/-</sup> proliferando. B: Cuantificación de focos de Brca1 en linfocitos Mms21 <sup>+/-</sup> y Mms21 <sup>+/+</sup>.

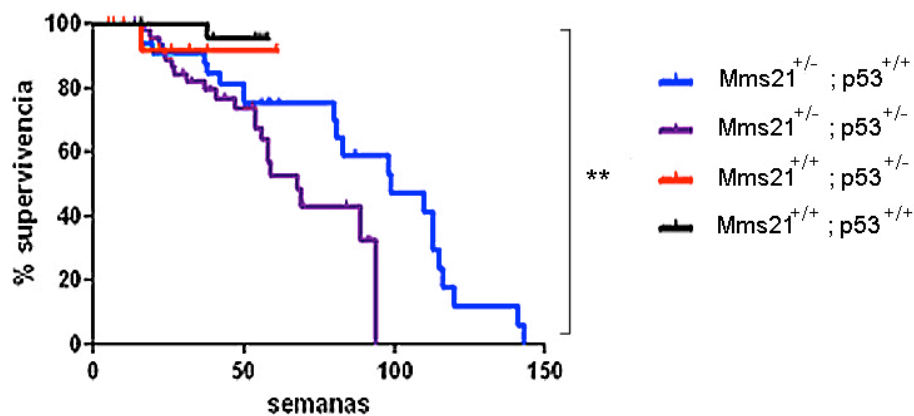
Por otro lado, nos preguntamos cual sería la consecuencia de poseer menores niveles de Mms21 y mayores de focos de Brca1. En levaduras, Mms21 y el complejo al que pertenecen, se ha asociado a la resolución de estructuras intermediarias de la recombinación (Branzei et al., 2006). Por ello decidimos estudiar la capacidad recombinogénica de los linfocitos Mms21 heterocigotos utilizando una técnica que mide el número de intercambios por recombinación homóloga que se dan entre las cromátidas hermanas de cada cromosoma (*sister chromatid exchange*, SCE). Como se muestra en la **figura 44**, los linfocitos B con la mitad de dosis de Mms21 presentan casi el doble de eventos de recombinación que los silvestres en condiciones basales, es decir, se puede decir que son más recombinogénicos que los silvestres. Además, esta tasa de recombinación apenas puede ser incrementada con afidicolina ya que los linfocitos silvestres incrementan en aproximadamente un 30% sus eventos de recombinación ante este tratamiento mientras que los linfocitos Mms21 <sup>+/-</sup> apenas lo hacen en un 10%. Una posibilidad es que los bajos niveles de Mms21 permitan la acumulación de estructuras que se resuelven dando lugar a un evento de SCE. Sin embargo, la afidicolina induce roturas que también son reparadas de esta manera, pero en este caso los bajos niveles de Mms21 no permiten que la estructura se resuelva de la misma manera. De forma muy interesante, MEF Smc5 <sup>+/-</sup> (proteína del complejo al que pertenece Mms21) también presentan elevados niveles de SCE (A. R. Lehman, comunicación personal).



**Figura 44. Los linfocitos B Mms21 <sup>+/-</sup> tienen más SCE que los silvestres.** A: Metafase representativa con eventos de SCE (flechas). B: Cuantificación de los niveles de SCE en linfocitos B sin tratar (control) y con un tratamiento de 0.2  $\mu$ M afidicolina durante 18 horas.

2. 3. 1. 4. *Mms21* y cáncer

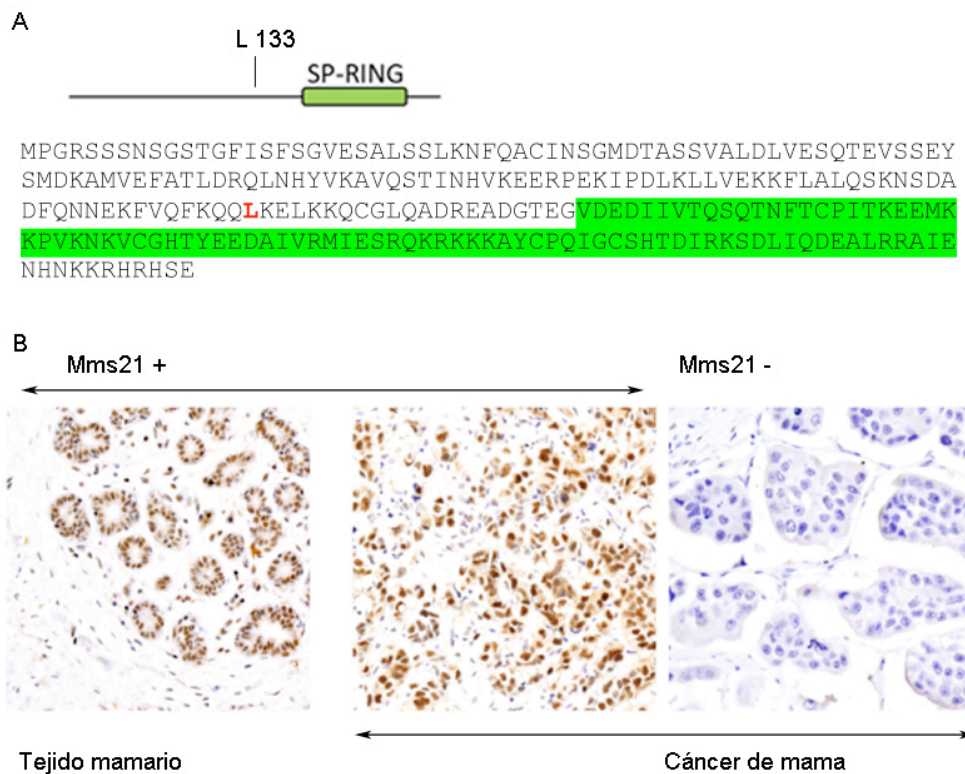
Dado el fenotipo que presentan las levaduras mutantes es plausible que esta proteína tenga alguna relación en la protección frente al desarrollo de tumores, ya que interviene en el mantenimiento de la integridad genómica. Sin embargo, hasta el comienzo de esta tesis no había ningún modelo que permitiera el validar esta hipótesis. Para ello, realizamos una curva Kaplan-Meier con ratones silvestres y *Mms21*<sup>+/-</sup> (**figura 45**). Como se puede observar, los ratones *Mms21* heterocigotos tienen una alta esperanza de vida pero terminan desarrollando tumores, generalmente linfomas, con más frecuencia que los silvestres ( $p=0.0165$ , test Mantel-Cox). Es decir, la pérdida de un alelo de *Mms21* es protumoral, o lo que es lo mismo, *Mms21* es un gen haploinsuficiente. Este fenotipo es más evidente al perder un alelo de *p53*, ya que en un fondo *p53*<sup>+/-</sup> se aumenta el fenotipo de los ratones *Mms21* heterocigotos, presentando más tumores y un espectro más variado (no se muestra). Hemos genotipado los tumores de varios ratones y todos ellos retienen el alelo silvestre de *Mms21*, por lo que concluimos que el desarrollo de tumores se debe a la hiperrecombinación de las células *Mms21*<sup>+/-</sup>, que induce la pérdida de otros genes que favorecen el desarrollo tumoral. Esta observación es consistente con el hecho de que estemos observando tumores muy variados en los animales *Mms21*<sup>+/-</sup>; *p53*<sup>+/-</sup>, algo que no observamos ni en animales *Mms21*<sup>+/-</sup> ni en ratones *p53*<sup>+/-</sup>.



**Figura 45. Los ratones *Mms21*<sup>+/-</sup> desarrollan tumores.** Curva de supervivencia de los ratones silvestres, *Mms21*<sup>+/-</sup>, *p53*<sup>+/-</sup> y *Mms21*<sup>+/-</sup>; *p53*<sup>+/-</sup>, en la que se representa la proporción de animales vivos frente el tiempo, en semanas.

Esta característica es reminiscente del fenotipo presentado por personas con síndromes hiperrecombinogénicos, como es el caso de personas con Síndrome de Bloom (causado por mutaciones en la proteína BLM). Estas personas desarrollan numerosos y variados tumores a temprana edad, siendo uno de los más frecuentes el cáncer de colon. Puesto que los ratones *Mms21*<sup>+/-</sup> presentan mayores niveles de recombinación, hemos comenzado un experimento para comprobar si éstos pueden desarrollar tumores asociados al fenotipo hiperrecombinogénico de las personas con Síndrome de Bloom. En concreto, hemos tratado una cohorte de animales silvestres y *Mms21*<sup>+/-</sup> con un mutágeno (azoxymetano) y un agente proinflamatorio (dextrán sulfato) para estudiar el desarrollo de adenomas en el colon, tal y como se describe en (Greten et al., 2004). Este experimento nos permitirá observar si existen diferencias en el desarrollo de adenomas de colon entre ambos genotipos al igual que se han observado en el modelo BLM KO (Luo et al., 2000).

El hecho de que los ratones *Mms21*<sup>+/-</sup> desarrollen tumores junto con las observaciones que relacionan *Mms21* con *Brca1* (conocido supresor de tumores cuya ausencia produce cáncer de mama) nos llevó a investigar el estatus de *Mms21* en diversos tumores de mama familiares catalogados como BrcaX (sin mutaciones en *Brca1* ni en *Brca2*). En colaboración con el Grupo de Genética Humana estudiamos unas 300 familias BrcaX, de las cuales 2 presentaban una delección en heterocigosis del nucleótido T346 que genera de un codón de parada 54 bp más debajo de la misma, cuya consecuencia es que la versión mutante de *Mms21* pierde el dominio SP-RING (dominio catalítico, aa 154 a aa 236) ya que la traducción se detiene en la L133 (**figura 46 A**). Ambas familias presentan miembros que han desarrollado cáncer de mama. Sin embargo, esta mutación también ha sido encontrada en una familia en la que ningún miembro ha desarrollado tumores. Actualmente se están estudiando más casos para poder tener resultados concluyentes sobre el papel de *Mms21* en el desarrollo de tumores de mama. Por otro lado, también se ha estudiado la expresión de *Mms21* en tumores de mama de diferentes personas y se ha encontrado un subgrupo de ellos que no presentan tinción de *Mms21* (**figura 46 B**). En concreto, se han analizado 64 tumores positivos para KI67 (marcador de proliferación), de los cuales un 4% de los casos BrcaX no presentaban tinción de *Mms21* y un 15% de los casos *Brca1* tampoco la presentaban.



**Figura 46. Mms21 en tumores humanos.** A: Una deleción en la T346 produce un codón de parada 54 bp aguas abajo y provoca la terminación de la traducción en la L133, que produce una versión truncada de Mms21 sin dominio SP-RING. B: Inmunohistoquímica de tejido mamario sano y 2 tumores de mama con anti-Mms21.

Si bien preliminares, estos datos sugieren un papel de Mms21 en el desarrollo de tumores mamarios. De manera interesante, recientemente se han empezado a describir mutaciones somáticas en Mms21 y Smc6 en tumores esporádicos de mama (Base de Datos Cosmic, Welcome Trust Sanger Institute) en frecuencias similares a las presentadas por Brca1 y Brca2.

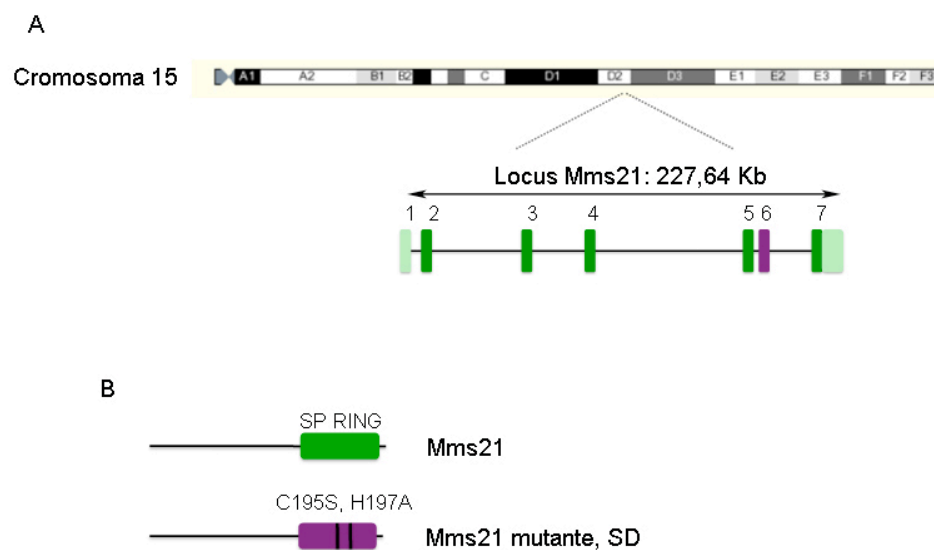
Gen mutado	Frecuencia
Brca1	4%
Brca2	2%
Smc6	4%
Mms21	2%



**Tabla 4. Frecuencia de mutación en los genes indicados en cáncer esporádico de mama.** Las mutaciones en Smc6 y Mms21 se dan en las mismas proporciones que en Brca1 y Brca2.

### 2. 3. 2. Mms21 KI

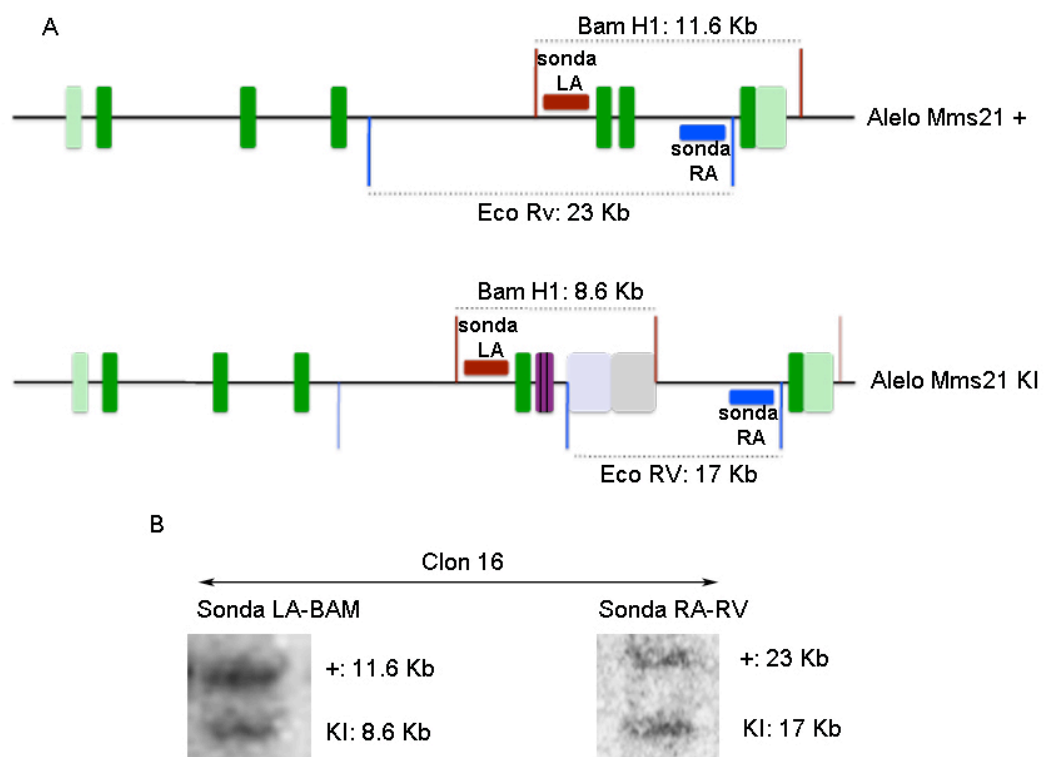
Dado que el modelo Mms21 KO presenta letalidad embrionaria, decidimos generar un modelo murino que portara mutaciones en el dominio SP RING, codificado por el exón 6 (**figura 47 A**), que inactivaran la actividad catalítica de Mms21 sin interrumpir su expresión (modelo *knock in*, KI, al que llamamos SUMO DEAD o SD). Esto nos permitiría estudiar mejor el papel de la SUMOilación realizada por Mms21 en la respuesta a daño en el DNA. Las mutaciones que portan estos ratones, C195S y H197A, son homólogas a las descritas en levaduras mutantes con el dominio SP-RING inactivado ([Andrews et al., 2005](#); [Cost and Cozzarelli, 2006](#)), y **figura 47 B**. Ya en otras ocasiones se han causado la pérdida de la actividad SUMO ligasa mutado las cisteínas de los dominios SP RING.



**Figura 47. Estructura del locus de Mms21.** A: estructura de los exones del gen que codifica Mms21. Se marca en morado el exón 6, que codifica el dominio catalítico SP-RING. B: Esquema de la estructura de la proteína Mms21 silvestre y la versión mutante, con ambas mutaciones que inactivan el dominio SP-RING.

Para generar este modelo, contactamos con la compañía GeneBridges, que clonó mediante recombinación un vector que portaba el exón 6 (que codifica el dominio catalítico) en el que introdujeron ambas mutaciones que inactivan el mismo. Este vector fue electroporado en ES B6 silvestres por la Unidad de Transgénicos, que generó 300 clones de

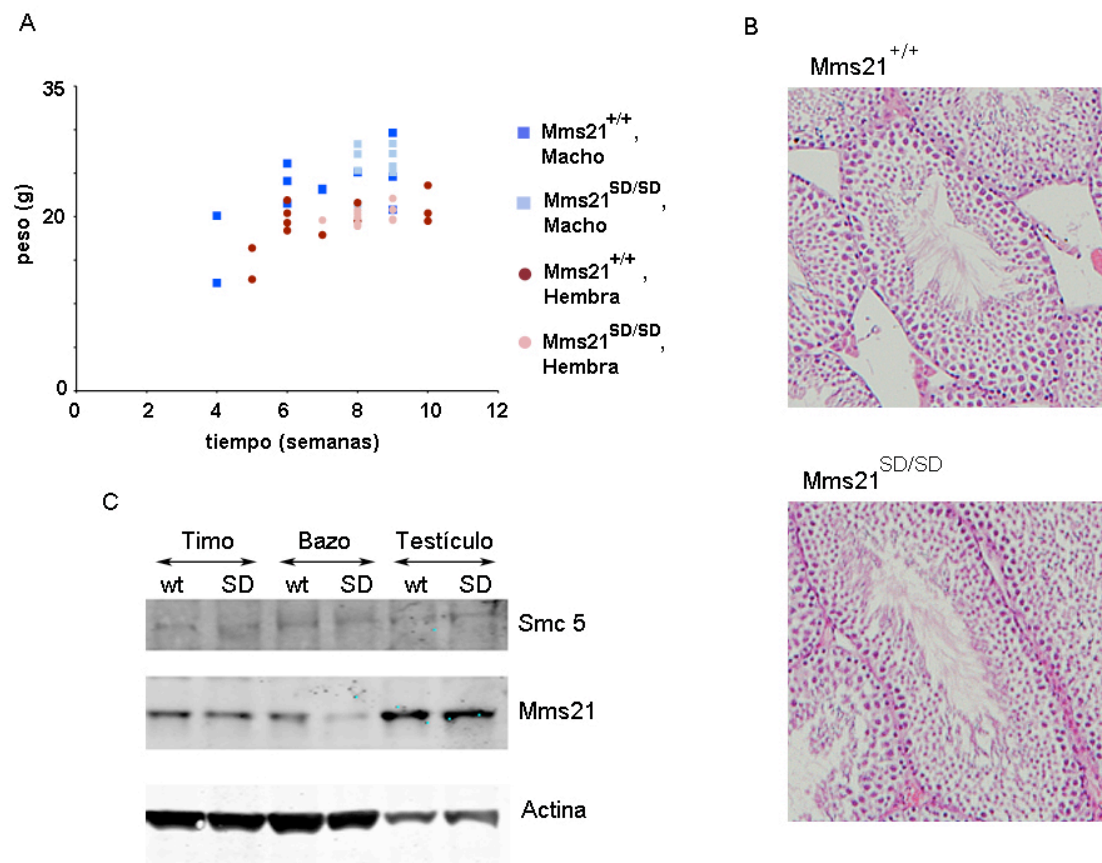
ES resistentes a neomicina. Nosotros verificamos por *southern blot* la presencia de clones recombinantes siguiendo la estrategia indicada en la **figura 48 A**. Para ello, el DNA de los diferentes clones fue digerido con BamH1, separamos mediante electroforesis y transferimos a membrana para posteriormente hibridarla con la sonda correspondiente (LA). Tras identificar algunos clones positivos (en los que el vector parecía haberse integrado por recombinación homóloga), comprobamos que el vector estaba íntegro realizando otro *southern blot* con la sonda RA. El clon 16 fue uno de los clones que resultó tener integrado el vector correctamente (**figura 48 B**).



**Figura 48. Esquema de la estrategia de *southern blot* seguida para identificar clones recombinantes *Mms21*<sup>+/SD</sup>.** A: Sobre el esquema del locus *Mms21*, se representan las enzimas de restricción (BamH1 y EcoRV) y las sondas (LA y RA) utilizadas, así como el tamaño esperado de los fragmentos de restricción tanto en el alelo silvestre (*Mms21* +) como en el mutante (*mms21* KI). En el alelo *Mms21* KI se resaltan las mutaciones en el exón 6 (morado) y el *cassette* que confiere resistencia a neomicina (gris), que tiene 2 dianas de restricción, para BamH1 y EcoRV, que el alelo silvestre no tiene. B: *Southern blot* del clon 16, que se utilizó para generar la línea *Mms21* KI (o *Mms21* SD), donde se ven las bandas que corresponden a los alelos silvestre (+) y recombinante (KI).

A continuación realizamos PCRs del exón 6 del locus de *Mms21* de los clones de ES que seleccionamos como positivos para ambos lados del vector para comprobar por

secuenciación que las mutaciones de interés se mantenían intactas. Así, elegimos el clon 16, que se electroporó en blastos B6 silvestres. A continuación, éstos se implantaron en madres pseudogestantes que parieron quimeras, las cuales cruzamos con animales silvestres para generar animales  $Mms21^{+/SD}$ . Del cruce entre ratones  $Mms21^{+/SD}$  entre sí hemos obtenido animales  $Mms21^{SD/SD}$  en frecuencia mendeliana que no presentan ningún fenotipo aparente. Para comenzar, decidimos pesar a los animales  $Mms21^{+/+}$  y  $Mms21^{SD/SD}$ , como medida del tamaño, ya que una reducción en el tamaño es un fenotipo clásico de los mutantes de la DDR. Como se ve en la **figura 49 A**, los animales de ambos genotipos tienen un tamaño parecido. Aún no disponemos de información referente a la supervivencia y al desarrollo de tumores puesto que estos animales son muy jóvenes. Para continuar el estudio de estos ratones decidimos analizar los testículos de los mismos, ya que  $Mms21$  colocaliza en las regiones asinapsadas de los espermatozoides y parece tener algún papel en meiosis. Observamos que los testículos procedentes de ratones  $Mms21^{SD/SD}$  eran indistinguibles de los de ratones  $Mms21^{+/+}$  (**figura 49 B**). De hecho, también hemos obtenido camadas de cruces de ratones  $Mms21^{SD/SD}$  entre sí, indicando que tanto machos como hembras son fértiles. Es decir, el papel de la SUMOilación llevada a cabo por  $Mms21$  durante la meiosis es dispensable para la generación de gametos. Por último, hemos estudiado los niveles de expresión de  $Mms21$  mediante *western blot* en varios tejidos para comparar los niveles de esta proteína en animales  $Mms21^{+/+}$  y  $Mms21^{SD/SD}$ . Como se muestra en la **figura 49 C**,  $Mms21^{SD}$  se expresa en los mismos niveles que la versión silvestre, lo que indica que la mutación que inactiva el dominio catalítico no reduce la estabilidad de la proteína. Asimismo, hemos visto que los niveles de  $Smc5$ , otra de las proteínas del complejo, son similares.

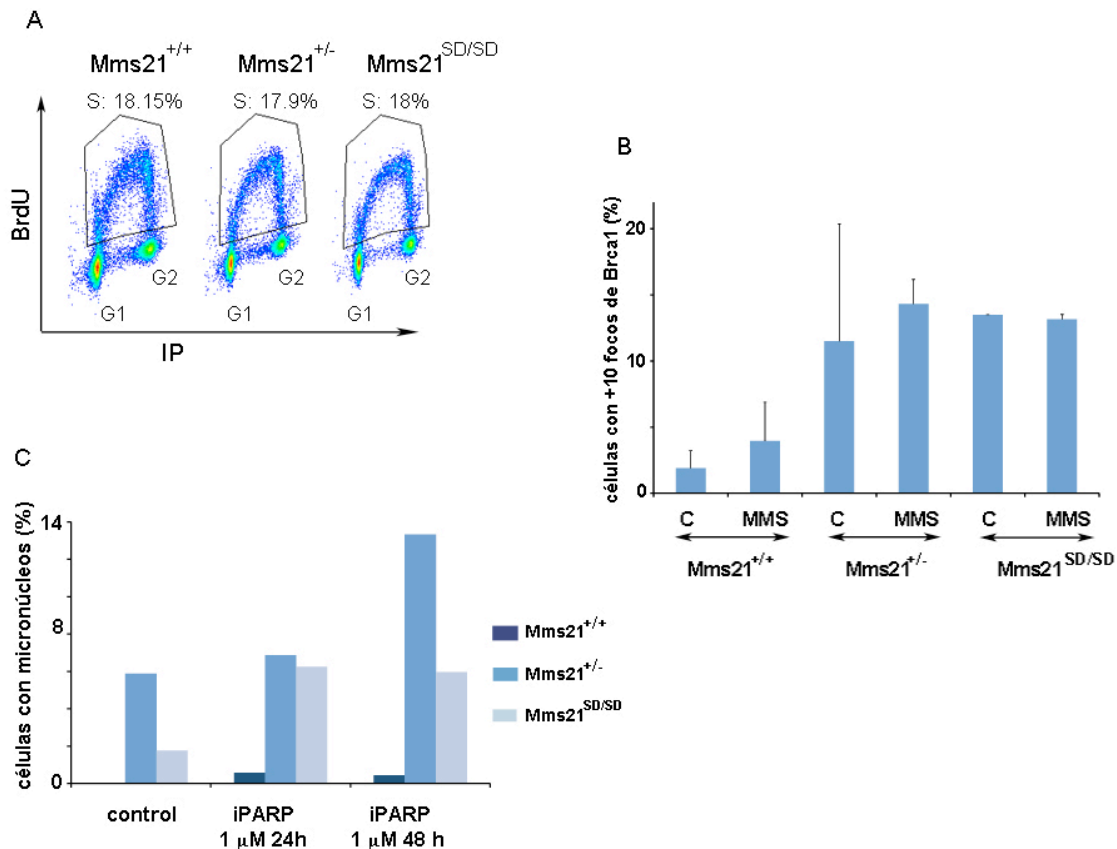


**Figura 49. Estudio de los tejidos Mms21 SD.** A: Gráfica en la que se representan los pesos de los animales Mms21<sup>+/+</sup> y Mms21<sup>SD/SD</sup> frente al tiempo, en semanas. B: Inmunohistoquímica (hematoxilina/eosina) de testículos procedentes de un ratón silvestre y otro Mms21<sup>SD/SD</sup>. C: Medida de los niveles de Mms21 y Smc5 mediante *western blot* en tejidos procedentes de ratones Mms21<sup>+/+</sup> y Mms21<sup>SD/SD</sup>.

### 2. 3. 2. 2. Caracterización preliminar de células Mms21 SD

Para comenzar la caracterización del modelo Mms21 SD decidimos extraer MEF y realizar los mismos experimentos realizados con los MEF Mms21<sup>+/-</sup>, y así poder también comparar ambos modelos en paralelo. Por ello, estudiamos su capacidad proliferativa (que es igual a la de los MEF silvestres y los Mms21<sup>+/-</sup>), su capacidad de generar focos de Mms21 y Brca1 y la consecuencia de los tratamientos con MMS o iPARP (formación de micronúcleos). Como se muestra en la **figura 50 A**, las células de los 3 genotipos incorporan BrdU de forma similar, lo que permite concluir que las diferencias observadas en otros aspectos no se deben a diferencias en la capacidad proliferativa. Respecto a los focos de Brca1, al igual que ocurre en los MEF Mms21<sup>+/-</sup>, los Mms21<sup>SD/SD</sup> acumulan mayor número que los silvestres. Esto podría significar ser una prueba de que Mms21 SD

no es funcional y por tanto se están acumulando las estructuras que reconocen tanto Mms21 como Brca1. Y finalmente, respecto a las consecuencias de los tratamientos con iPARP, resultados preliminares indican que los MEF  $Mms21^{SD/SD}$  presentan un incremento en el número de micronúcleos, al igual que lo hacen los MEF  $Mms21^{+/-}$  **figura 50 C**. Esta observación es consistente con el hecho de que los MEF  $Mms21^{SD/SD}$  acumulen muchos focos de Brca1, ya que la ruta de Mms21 está inactiva.



**Figura 50. Caracterización de los MEF  $Mms21^{SD/SD}$ .** A: Medida de la proliferación por incorporación de BrdU, se representan las fases G1, S y G2. PI: yoduro de propidio. B: Cuantificación de las células más de 10 focos de Brca1 sin tratamiento (C) y con 0.01 M MMS 1h más recuperación de 18 h. C: Medición de la acumulación de micronúcleos en MEF  $Mms21^{+/+}$  y  $Mms21^{+/-}$  sin tratamiento y con 1  $\mu$ M iPARP durante 24 y 48 horas.

En conclusión, nos encontramos con dos modelos genéticos de la misma proteína, Mms21, con lo que hemos estudiado 2 situaciones diferentes. En el caso del modelo  $Mms21$  KO, hemos descrito las consecuencias en células u organismos de la ausencia de Mms21, y probablemente de todo el complejo Smc5/6 ya que se ha descrito que la ausencia de cualquiera de las proteínas del complejo produce la desestabilización del mismo

(Duan et al., 2009). Para resumir, la ausencia de Mms21 es incompatible con la vida y produce letalidad embrionaria preimplantacional. En heterocigosis, las células presentan un fenotipo hiperrecombinogénico, que se traduce en una alta incidencia de tumores a nivel de organismo. En el caso del modelo Mms21 SD, nos encontramos ante una situación en que parece no desestabilizarse el complejo pero sí inactivarse la actividad enzimática. Actualmente estamos realizando experimentos para conocer la actividad catalítica de Mms21 SD. Por tanto hemos desarrollado un modelo que nos permitirá estudiar el papel de la SUMOilación llevada a cabo por Mms21. De esta manera, este modelo nos permitiría el estudio de proteínas diana de Mms21, las cuales apenas se conocen. Respecto al efecto fisiológico de la inactividad de Mms21, podemos decir que produce la acumulación de focos de Brca1, con lo cual podríamos inferir que también será un modelo proclive a la recombinación y al desarrollo de tumores. Estas cuestiones sobrepasan el tiempo de esta tesis y están actualmente en estudio.

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

Con este trabajo de investigación hemos querido profundizar en varios aspectos de la DDR. Como se desprende tanto de los resultados de otros grupos como de los nuestros, desajustes en la DDR tienen consecuencias tan dispares como el envejecimiento y el cáncer. Podemos considerar, pues, la DDR como una barrera frente a la transformación que si se desregula nos puede hacer envejecer. Para estudiar ambas caras de esta moneda, para esta tesis hemos desarrollado modelos murinos de dos proteínas que participan en el mantenimiento de la integridad genómica: Chk1 y Mms21.

### 1. La DDR y el envejecimiento

Podemos definir el envejecimiento como un progresivo e irreversible deterioro del organismo asociado a un incremento del riesgo de muerte. Este deterioro que nos impone la propia vida está siendo estudiado desde varios flancos. Respecto al daño en el DNA y a la DDR, sabemos que una desregulación de la ruta de ATR produce senescencia a nivel celular (Toledo et al., 2008) y progeria a nivel de organismo (Murga et al., 2009b). También se ha descrito que se puede inducir un patrón de expresión génica propio de la vejez mediante dosis subletales de daño en el DNA (Niedernhofer et al., 2006).

Sin embargo, sabemos poco del papel de la DDR en un contexto fisiológico: el deterioro normal acumulado por el tiempo de vida, sin ningún agente que lo promueva. Como ya se ha dicho, la ausencia tanto de ATR como de Chk1 producen letalidad embrionaria preimplantacional (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000a). Por esta razón, nos planteamos desarrollar un modelo de ganancia de función que nos permitiera estudiar el papel de esta ruta en este contexto no asociado a síndrome alguno y sin problemas derivados de la ausencia de estos genes.

#### 1. 1. Súper Chk1

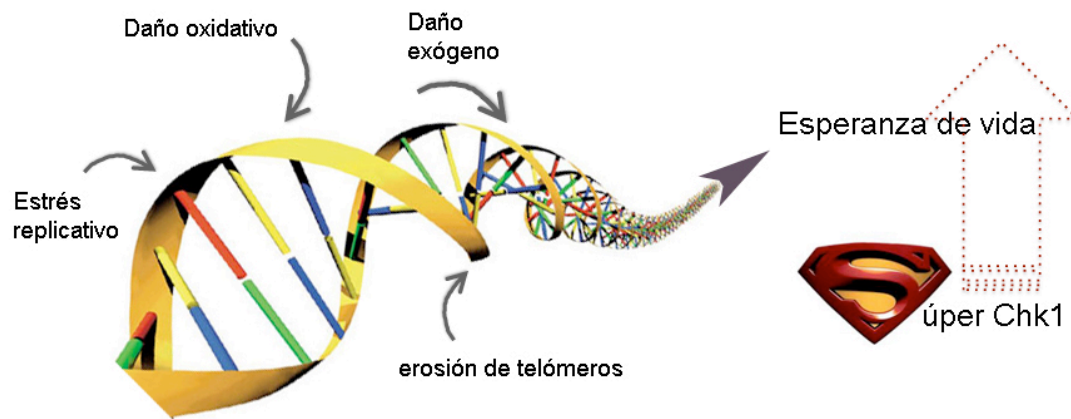
Chk1 participa en la respuesta al daño en el DNA, pero sólo durante las fases S y G2 del ciclo. Debido a que propicia reparación mediante recombinación homóloga (proceso que no se debe llevar a cabo durante G1 por el peligro que supone recombinar con una hebra no homóloga), Chk1 está fuertemente regulado. Es un gen diana de E2F1 (Carrassa et al., 2003), lo cual demuestra la importancia de la zona reguladora del gen para



la correcta expresión de Chk1. Por ello, y también debido a que una hiperactividad de la ruta de ATR induce senescencia, decidimos desarrollar un modelo de ganancia de función que conservara esta zona reguladora. Estos modelos de ganancia de función de genes que incluyen su zona reguladora ya han sido utilizados por otros grupos, y fueron denominados modelos Súper (García-Cao et al., 2002; Matheu et al., 2004). En nuestro caso, no sólo optamos por este tipo de modelo, sino que decidimos subclonar el locus de Chk1 en un vector más pequeño. De esta forma, evitamos desarrollar modelos Súper de los genes adyacentes al locus de Chk1: Acrv1, Itm1 y Ei24. Es decir, nos encontramos ante un modelo genéticamente “limpio”.

Por otro lado, la transgénesis implica la inserción del vector que porta el locus de interés en cualquier punto del genoma. De ahí la importancia de trabajar en paralelo con dos líneas de microinyección, que denominamos Chk1<sup>Súper 1</sup> y Chk1<sup>Súper 2</sup> por comodidad. Esta estrategia nos permite descartar que el fenotipo se deba al punto de inserción del vector. Todos los experimentos realizados en esta tesis se hicieron con ambas líneas en paralelo, con lo que podemos concluir que el fenotipo observado se debe a la tercera copia de Chk1 y no al punto de inserción. De las dos líneas generadas, fue posible localizar el punto de inserción de una de ellas, en el cromosoma 12. En el punto de inserción no se encuentra ningún gen descrito, y sin embargo, no hemos podido generar ratones que porten dos copias extra de Chk1. Esto sugiere que esta secuencia de DNA del cromosoma 12 no es sólo una región espaciadora, y que probablemente tenga alguna función no descrita. Respecto a la otra línea, resultados preliminares indican que sí es posible obtener ratones con dos copias, e incluso de tres copias si se combinaran con la otra línea.

De los resultados que se desprenden de los experimentos de esta tesis, podemos inferir que una tercera copia de Chk1 protege del envejecimiento causado por el estrés replicativo. ¿Si una copia de más protege frente al envejecimiento, que harán dos y tres copias? ¿Y si fuera posible alargar la vida simplemente teniendo el DNA en mejor estado? ¿Es este estrés quien impone el límite de la esperanza de vida? (**figura 51**)



**Figura 51. El papel de Chk1 en la esperanza de vida.** El estrés replicativo se encuentra entre las causas del envejecimiento. Se plantea el papel de Chk1 en la respuesta a este estrés y el envejecimiento.

## 1. 2. El efecto de una dosis extra de Chk1 a nivel celular

Para entender el efecto de una dosis extra de Chk1 hemos planteado una serie de experimentos tanto en células como en ratones. A nivel celular, hemos concluido que una copia extra de Chk1 produce un incremento en los niveles de proteína de forma regulada. Por un lado, las células Chk1<sup>Súper/+</sup> responden a agentes genotóxicos fosforilando Chk1, al igual que lo hacen las células silvestres, sin observarse ninguna desproporción. Por otro lado, las células Chk1<sup>Súper/+</sup> establecen mejor el *checkpoint* G2/M (algo que depende directamente de Chk1) pero reparan el daño inducido por irradiación de manera similar a las silvestres (ya que esta reparación no depende ni directamente ni únicamente de Chk1). Por último, las células Chk1<sup>Súper/+</sup> proliferan al mismo ritmo que las silvestres, lo que sugiere que no existe ninguna desregulación en la DDR mediada por Chk1. El hecho de que esta dosis extra de Chk1 sea funcional implica que la célula puede integrar este exceso sin mayores perjuicios. Es decir, tal y como esperábamos, esta copia está correctamente regulada y los niveles de las otras proteínas de las que depende Chk1 para activar la DDR (como ATR o Claspin) no son limitantes para su función.

Como ya se ha comentado, la principal función de ATR/Chk1 es establecer un *checkpoint* que permite un tiempo para reparar el DNA, a la vez que promueve la reparación del mismo. Una vez observado que esta dosis regulada de Chk1 tiene un efecto en la robustez del *checkpoint* G2/M inducido por irradiación, nos planteamos el efecto de esta dosis en reparación. Esta cuestión ha excedido el tiempo de esta tesis, pero podemos

plantear hipótesis. Chk1 promueve reparación mediante recombinación homóloga al fosforilar a Rad51. Por tanto, es posible que las células Chk1<sup>Súper/+</sup> tengan mayores niveles de recombinación. Sin embargo, ya que una mayor capacidad de establecer un *checkpoint* G2/M inducido por irradiación no tiene efecto sobre la proliferación en una población no dañada y que los ratones Chk1<sup>Súper/+</sup> no desarrollan tumores, postulamos que las células Chk1<sup>Súper/+</sup> no tendrán desregulada la ruta de recombinación homóloga y sólo presentarán mayores niveles de HR cuando sean estimuladas. Es decir, es probable que las células Chk1<sup>Súper/+</sup> serán hiperreparadoras, no hiperrecombinogénicas.

### 1. 3. El efecto de una dosis extra en la respuesta al estrés replicativo

#### 1. 3. 1. El envejecimiento

Hasta el momento se han definido varias causas que producen envejecimiento, como el estrés oxidativo, el acortamiento de telómeros o el estrés replicativo. De todos, éste es el menos entendido, y nos referimos con estrés replicativo a todos los problemas que surgen de la horquilla de replicación. En nuestro laboratorio ya se había desarrollado un modelo de estrés replicativo: el modelo ATR Seckel (Murga et al., 2009b). Este modelo presenta un severo fenotipo que incluye envejecimiento prematuro y malformaciones craneales. Entre las causas que producen envejecimiento en estos ratones podemos contar la acumulación de estrés replicativo durante el periodo embrionario (momento de máxima proliferación) y la reducida capacidad proliferativa (que produce tanto enanismo como una depleción de los nichos de ES en los tejidos adultos).

Como hemos demostrado en esta tesis, los ratones Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> tienen una mayor esperanza de vida. Ya que se ha descrito que la letalidad viene dada por defectos en la proliferación en el estadio embrionario, estudiamos los niveles de estrés en embriones Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATR<sup>Seckel/Seckel</sup> y observamos niveles algo menores de daño en el DNA y muerte celular (marcados por  $\gamma$ H2AX y Caspasa 3 activada). Es decir, teniendo en cuenta que la relación entre ATR es jerárquica (de tal modo que Chk1 es activado por ATR) parece que una tercera copia de Chk1 mejora una respuesta iniciada por un escaso nivel de ATR (5% aproximadamente). Es decir, existe una correlación entre un desarrollo intrauterino mejorado y una más alta esperanza de vida (**figura 52**).

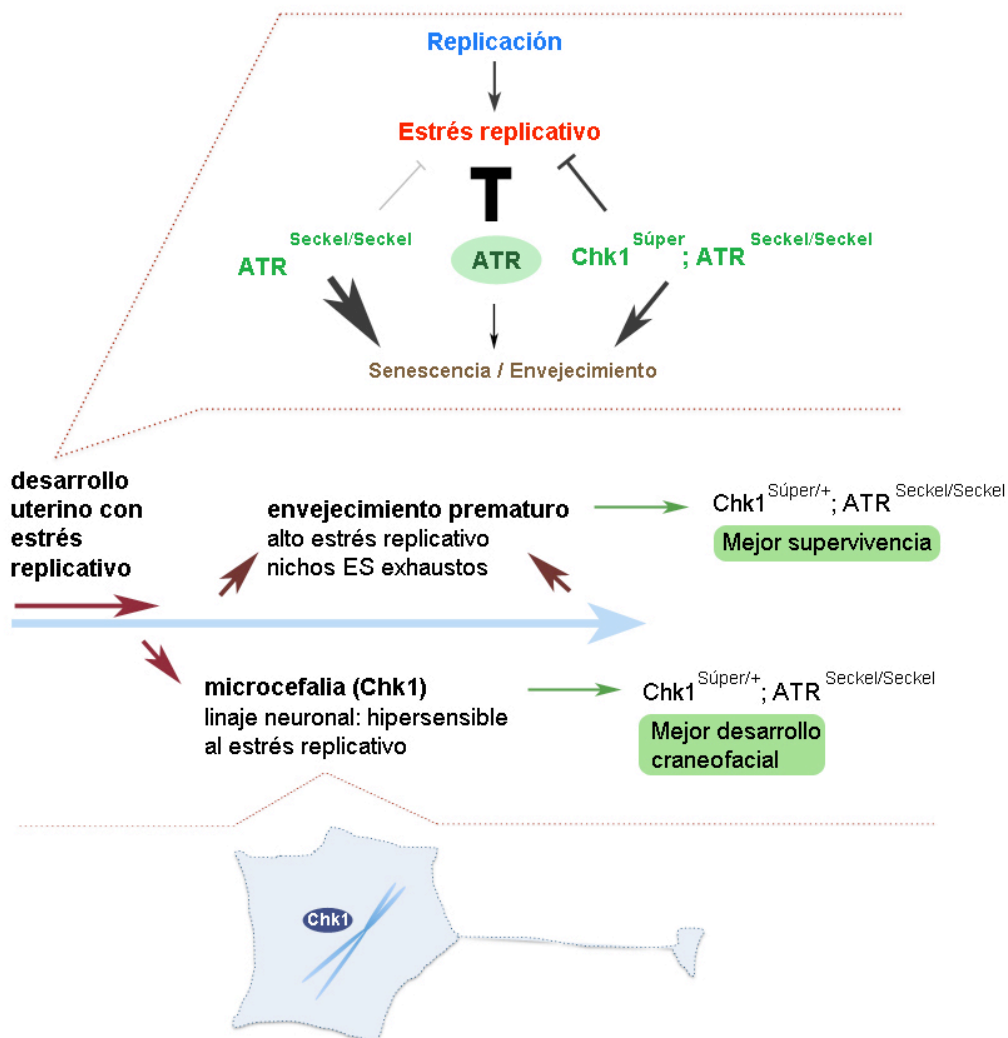
Respecto al tamaño de los ratones, aunque sí hemos observado una tendencia al alza en el peso de los ratones  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$ , estas diferencias no son significativas. El pequeño tamaño de los ratones  $\text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  se debe, en parte, a la pérdida de la capacidad proliferativa causada por los altos niveles de apoptosis que se dan durante el desarrollo embrionario. Durante esta etapa, todas las células proliferan rápidamente, por lo que la acumulación de daño en el DNA es particularmente nociva. Dado que el tamaño de los ratones es similar, podemos inferir que la capacidad proliferativa de las células  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  no es suficiente para generar un ratón adulto de tamaño normal. La causa última de la muerte de los ratones  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  es la anemia severa (pancitopenia), causada por un defecto en la capacidad de renovación de la sangre. También hemos estudiado la sangre de ratones viejos  $\text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  y  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  y no hemos observado diferencias. Esto sugiere que la capacidad proliferativa de los tejidos adultos  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  es similar a los  $\text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$ .

Es decir, los ratones  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  tienen una esperanza de vida incrementada respecto a los animales  $\text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$ . Esto no parece deberse a una mejora en la capacidad proliferativa de las células, ya que los ratones tienen el mismo tamaño y presentan pancitopenia en edades avanzadas. La principal diferencia entre ambos genotipos se encuentra durante el desarrollo uterino, durante la cual los ratones  $\text{Chk1}^{\text{Súper}/+}; \text{ATR}^{\text{Seckel/Seckel}}$  presentan menores niveles de daño en el DNA y muerte celular. Probablemente se deba a una mejor respuesta al estrés replicativo cuyas consecuencias son suficientes para alargar la vida pero no para mejorar el tamaño.

### 1. 3. 2. La microcefalia

Como se ha comentado en la Introducción, defectos en Chk1 ha sido relacionados con el fenotipo de microcefalia presentado por pacientes de varios síndromes. Algunos de estos síndromes, como el Síndrome de Seckel o el Síndrome de Nijmegen, son causados por defectos en proteínas de la DDR (como son ATR y Nbs1 respectivamente). Pero otros son causados por defectos en otras proteínas (microcefalina, MCPH1 y pericentrina, PCNT) que implican un defecto en la regulación de Chk1 directamente. En estos casos, se ha demostrado que defectos en MCPH1 y PCNT conllevan que Chk1 no se localice correctamente en los centrosomas, con lo que se da una desregulación en la actividad de Cdk1 (Griffith et al., 2008; Tíbelius et al., 2009). Esto sugiere que los defectos asociados a

los síndromes anteriores se deben muy probablemente a una desregulación de Chk1, más que a un defecto en la DDR en general ya que en los casos anteriores la actividad de ATR es correcta. Por otro lado, también se ha descrito que los linajes neuronales son especialmente sensibles a la ausencia de Chk1, lo cual constituye una explicación de este fenotipo. Respecto a los estudios realizados para esta tesis, podemos decir que los ratones  $Chk1^{Súper/+}; ATR^{Seckel/Seckel}$  presentan mejores valores de mandíbula y hueso y ángulo nasal, indicando un mejor desarrollo del cerebro (**figura 52**). Dada esta observación sería muy interesante estudiar la resistencia al estrés replicativo en los linaje neuronal  $Chk1^{Súper/+}$ . Es posible que este modelo ofrezca pistas sobre la sensibilidad especial que muestran estas células al estrés replicativo.



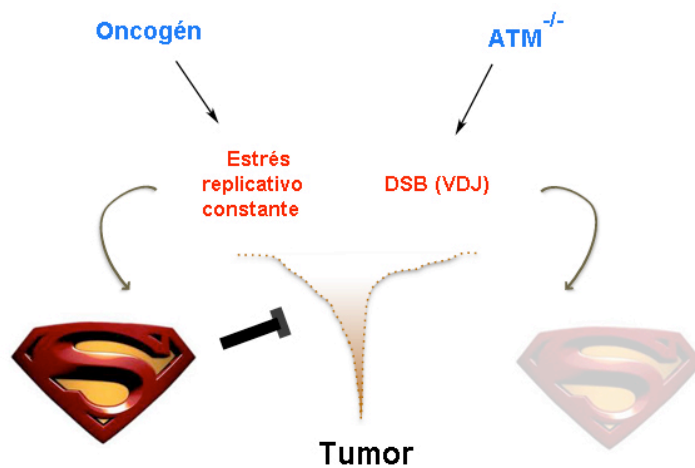
**Figura 52.** El papel del eje ATR/Chk1 en el envejecimiento y la microcefalia. Mayores niveles de Chk1 permiten una mejor respuesta al estrés replicativo durante el desarrollo embrionario.

## 1. 4. Chk1 y la transformación

El envejecimiento no es la única consecuencia de la desregulación de la DDR. Muchos de los síndromes causados por mutaciones en proteínas que señalizan o reparan el DNA se asocian a una alta incidencia de tumores. Un ejemplo es el Síndrome AT (Ataxia Telangectasia), causado por mutaciones en ATM. Los pacientes de este síndrome no padecen de progeria, sino que desarrollan con mucha frecuencia tumores, especialmente linfomas. Esto es debido a una incorrecta religación del DNA durante la recombinación VDJ y CSR durante el desarrollo linfoide. Estos pacientes también presentan ataxia (lo cual demuestra, una vez más, la extrema sensibilidad de los linajes neuronales a las lesiones en el DNA) e hipersensibilidad a la irradiación (cuya causa reside en la incapacidad de reparar las lesiones generadas, algo similar a lo que ocurre en la línea linfoide).

Respecto al papel de la DDR en el desarrollo tumoral, se ha propuesto que ésta puede actuar como una primera barrera, activando respuestas como la senescencia y la apoptosis cuando las lesiones de las células pretumorales no pueden ser reparadas (Bartkova et al., 2005; Braig et al., 2005; Collado et al., 2005; Gorgoulis, 2005). En este sentido, se ha observado que se puede activar una respuesta de senescencia en cultivo, asociada a la hiperproliferación inducida por algunos oncogenes (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). Respecto a ATM en concreto, se ha observado que su ausencia no empeora los tumores asociados a un oncogen que produce estrés replicativo, como es el caso de Ras (Efeyan et al., 2009). Una explicación a este hecho es que ATM no responde al tipo de estrés causado por este oncogén. De hecho, nuestros resultados realizados con ratones Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATM<sup>-/-</sup> avalan este modelo ya que los tumores que desarrollan los ratones ATM<sup>-/-</sup> se deben, al igual que ocurre en los pacientes del Síndrome AT, a anomalías en el desarrollo linfoide y no al estrés replicativo (**figura 53**). Las células Chk1<sup>Súper/+</sup>; ATM<sup>-/-</sup> no experimentan la mejoría en el *checkpoint* G2/M que presentan las células Chk1<sup>Súper/+</sup>. Esto se debe a que la activación de Chk1 en este caso es dependiente de ATM, vía activación de ATR (Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006). Así, en una situación en la que no hay ATM, los mayores niveles de Chk1 son irrelevantes. Al irradiar unas células se crean DSB, que activan a ATM. En aquellas células que se encuentren en fase G2 habrá una cooperación entre ATM y ATR, de tal manera que al producirse la resección de los extremos del DNA para su reparación, ATR/Chk1 se activarán por la presencia de ssDNA y establecerán más robustamente el *checkpoint* G2/M. Es por esto que el *checkpoint* G2/M

depende tanto de ATM como de Chk1. Es decir, una tercera copia de Chk1 no rescata un fenotipo no asociado a estrés replicativo. A nivel de organismo, las consecuencia es que tanto los ratones  $ATM^{-/-}$  como los  $Chk1^{Súper/+}$ ;  $ATM^{-/-}$  desarrollan tumores, principalmente linfomas tímicos. Sin embargo, es posible que los ratones  $Chk1^{Súper/+}$  estén protegidos de tumores causados por oncogenes que inducen hiperreplicación. Es decir, ante un tumor causado por estrés replicativo, y no por DSB, una dosis extra de Chk1 podría frenar el desarrollo del tumor.



**Figura 53. Chk1 y la transformación.** Ante un tipo de tumor con por altos niveles de estrés replicativo, una dosis extra de Chk1 podría frenar el desarrollo del tumor.

¿Cómo es posible que durante el desarrollo  $Chk1^{Súper/+}$  proteja del envejecimiento (menor senescencia) y que durante el desarrollo tumoral  $Chk1^{Súper/+}$  proteja de la transformación (mayor senescencia)? Esta paradoja se puede explicar por los niveles de ATR/Chk1. Durante el desarrollo embrionario en los ratones  $ATR^{Seckel/Seckel}$  la causa que provoca el estrés replicativo es el propio déficit de ATR. Por eso, una mayor posibilidad de transmitir ese daño generado (a través de la mayor cantidad de Chk1) palia parcialmente los defectos de ATR. Sin embargo, los oncogenes que producen una hiperreplicación lo hacen de forma desregulada, y producen estrés replicativo. En este caso, los niveles de ATR son suficientes (100%), y la respuesta activada sería la senescencia. Por este motivo, una mayor cantidad (regulada) de Chk1 daría mayor robustez al eje ATR/Chk1, promoviendo más fuertemente la respuesta de senescencia.

## 1. 5. El efecto de una dosis extra en la reparación

Como ya se ha comentado, una posible consecuencia de la posesión de una tercera copia de Chk1 es la capacidad de reparar mejor. A nivel de organismo, esta capacidad hiperreparadora podría significar un mejor estado del genoma y una mayor esperanza de vida. Por el momento, hemos generado una cohorte de animales silvestres y Chk1<sup>Súper/+</sup> para estudiar su desarrollo vital. Actualmente, estos animales rondan los 2 años de vida con lo que dispondremos de resultados en breve. Sin embargo, este experimento sólo nos dirá si los ratones Chk1<sup>Súper/+</sup> viven más o no. Serán necesarios otros estudios para comprobar el estado de estos animales tan mayores. Que vivan más o vivan mejor no explica el motivo de este hecho. Para responder a esta pregunta contamos con un modelo murino desarrollado en el laboratorio de J. Vijg (Gossen et al., 1989). Se trata de un ratón transgénico que porta varias copias en tándem de un plásmido con la secuencia que codifica la proteína LacZ (pUR288-*lacZ*). Este plásmido se puede recuperar fácilmente a partir de extractos de DNA de los tejidos de interés de los ratones de estudio. Una vez transformado en bacterias y crecido en agar con galactosa, produce colonias azules. Cualquier mutación produce la pérdida del color azul, la correlación entre mutaciones y color es directa y la lectura fácil. Por eso hemos generado una cohorte de animales LacZ<sup>+</sup> y Chk1<sup>Súper/+</sup>; LacZ<sup>+</sup>. La ventaja de este modelo es que podemos recuperar estos plásmidos de animales de distintas edades o con distintos tratamientos y ver con relativa facilidad si los animales Chk1<sup>Súper/+</sup>; LacZ<sup>+</sup> acumulan menos mutaciones *in vivo* y en distintos órganos. Esta cohorte de animales ronda el año de vida, un periodo de tiempo en el que los ratones de animalario aún no muestran señales de envejecimiento, por lo que aún es pronto para analizar el estado del genoma de estos animales. Dado que los animales Chk1<sup>Súper/+</sup>; LacZ<sup>+</sup> están mejor protegidos del estrés replicativo (mediante una mejor respuesta y quizá, una mejor reparación), es posible que su genoma (y el tándem LacZ, como región representativa) porte menos mutaciones.

El estrés replicativo se cuenta entre las numerosas causas de mutaciones en el DNA. Se ha propuesto que esto se debe a que las zonas que replican tardíamente acumulan grandes regiones de ssDNA, ya sea por detención de la horquilla de replicación debido a la depleción de nucleótidos, ya sea por la presencia de heterocromatina. Sin lugar a duda, la acumulación de lesiones de todo tipo tiene consecuencias tan negativas como el envejecimiento y el desarrollo de tumores. Y sin embargo, cabe mencionar que el estrés



replicativo parece ser una fuente de evolución. Se ha observado una alta correlación entre las zonas de replicación tardía, muy proclives a acumular lesiones debido al estrés replicativo y la divergencia entre secuencias humana y del chimpancé, indicando una relación entre este tipo de daño y la evolución de las especies (Stamatoyannopoulos et al., 2009a). Esto se debe a que la tasa de mutaciones es mayor en estas regiones heterocromáticas o asociadas a replicación tardía, en las que se encuentran varios genes relacionados con el desarrollo embrionario, o que controlan la proliferación y la diferenciación celular. Por tanto, la mayor frecuencia de mutación en estas zonas tiene grandes consecuencias en la fisiología de las especies.

## **2. La DDR y el cáncer**

El mantenimiento de la integridad genómica es un aspecto fundamental del metabolismo del DNA. En las células sanas, las lesiones en el material genómico activan una serie de respuestas que conducen a su reparación o a la eliminación de la células si el daño es irreversible. Las células tumorales, en cambio, presentan altos niveles de aberraciones cromosómicas. Estas aberraciones conllevan una desregulación de numerosas rutas. Causa y consecuencia, la inestabilidad genómica es una característica de las células tumorales. En estas células, estas alteraciones no conducen a la reparación y a la muerte celular o parada de la proliferación, como ocurre en las células sanas. Esta incapacidad para responder de esta manera se debe en muchos casos a mutaciones en genes que codifican proteínas relacionadas con la detección, la respuesta y la reparación del DNA, lo cual conocemos como DDR. De hecho muchas proteínas que participan en estas rutas son consideradas supresores tumorales, como es el caso de p53, conocido como el “guardián del genoma”. Es por esto que el estudio en detalle de estas rutas que mantienen la integridad genómica es tan importante para entender las causas que subyacen el desarrollo de tumores.

### **2.1. Las respuestas alternativas**

Como se ha comentado en la Introducción, la DDR es una respuesta mediada, principalmente, por la fosforilación. Sin embargo, cada vez toman más relevancia otras modificaciones postraduccionales y por tanto, proteínas con actividades enzimáticas que no son quinasas. Existen numerosas modificaciones, siendo la Ubiquitinación la más famosa. Esta modificación tiene un importante papel en la DDR (Huang and D'Andrea, 2006). Sin

embargo, cada vez toman más relevancia otras, como es el caso de la SUMOilación (Hay, 2005; Morris, 2010).

Gran parte de los estudios referentes a SUMOilación y DDR se han llevado a cabo en levaduras, existiendo muy poca información referente a mamíferos. Esto implica que se desconoce su papel en la protección frente al desarrollo de tumores. Este es un campo fértil, donde el único modelo murino descrito hasta la fecha es el Ubc9 KO. Respecto a este modelo, se ha descrito que la eliminación de la E2 SUMO conjugasa Ubc9 causa letalidad embrionaria preimplantacional (Nacerddine et al., 2005) debido a la disrupción de numerosas rutas (Kuehn, 2005). Dada la relación de la DDR con el cáncer, el estudio de la E3 SUMO ligasa Mms21 mediante modelos murinos ofrecía la posibilidad de dar respuestas a esta pregunta.

### 2. 1. 1. El complejo Smc 5/6 y la estabilidad genómica

La última década ha asistido al descubrimiento de un complejo muy importante en el mantenimiento de la integridad genómica: el complejo Smc5/6. Este complejo está formado por la proteínas Smc 5 y 6, así como por unas subunidades que reciben el nombre de Nse (*non Smc proteins*). Las primeras pertenecen a la familia Smc (*Structural Maintenance of Chromosomes*), a la que también pertenecen Smc1 y Smc3 (que forman el complejo cohesina) y Smc2 y Smc4 (complejo condensina) (Losada and Hirano, 2005). Los 3 complejos tienen una estructura similar, determinado por la forma de los brazos de las proteínas Smc. Sin embargo tienen funciones diferentes. Cohesinas y condensinas tienen un papel fundamental en mitosis al mantener la cohesión y permitir la condensación de los cromosomas y defectos en estas proteínas conllevan una alteración en la dinámica de los cromosomas. Sin embargo, apenas se conocen detalles sobre el complejo Smc5/6, al que podríamos apodar, por similitud a los otros complejos Smc, complejo integrina. Gracias a los estudios realizados en levaduras, este complejo se relacionó, en un primer momento, con el mantenimiento de la integridad genómica y después con la reparación mediante recombinación homóloga. Sin embargo, su mecanismo de acción era desconocido, así como las rutas en las que interviene, y nada se sabía de su papel a nivel de organismo multicelular.

Uno de los miembros de este complejo es Mms21, que fue descubierta en levaduras (Prakash and Prakash, 1977). En un primer momento no se asoció al complejo Smc5/6,

aunque sí con el proceso de recombinación homóloga ya que las levaduras mutante para Mms21 mostraban niveles elevados de recombinación mitótica así como defectos en meiosis. A principios de esta década, cuando se descubrió el complejo Smc5/6, se describieron los otros componentes del complejo. Entre ellos se encontraba Nse2/Mms21, una E3 SUMO ligasa que se implicó en la respuesta al daño en el DNA y en el mantenimiento de la integridad genómica. Debido al fenotipo que presentan las levaduras mutantes para los diversos miembros del complejo, se propuso un papel esencial (no conocido) para el complejo y un papel en reparación para Mms21. Sin embargo, lo más probable es que no exista esta dicotomía entre complejo con Mms21 y complejo sin Mms21 ya que recientemente se ha descrito que Mms21 juega un papel fundamental en la nucleación del complejo (Duan et al., 2009). Según este estudio, la mitad N terminal de Mms21, donde no se encuentra el dominio catalítico, es una gran superficie de unión necesaria para la interacción con Smc5. De esta forma, si esta interacción no se da, el complejo entero se desestabiliza. De ahí que el fenotipo causado por la ausencia de Mms21 sea similar al causado por la ausencia de los otros miembros de complejo, pero que el fenotipo de los mutantes sin actividad SUMO ligasa de Mms21 sea tan diferente. Es decir, el estudio del modelo Mms21 KO ofrece respuestas válidas para el complejo Smc5/6, mientras que el estudio del modelo Mms21 SD ofrece respuestas sobre el papel de la SUMOilación llevada a cabo por Mms21.

## **2. 2. La expresión de Mms21 se asocia a Brca1**

Una vez contamos con un anticuerpo policlonal contra la forma murina de Mms21, procedimos a estudiar los niveles de expresión de esta proteína en diversos tejidos. Por un lado observamos que los niveles de Mms21 correlacionan con los de KI67, conocido marcador de proliferación. Es decir, la función de Mms21 es necesaria en células y tejidos que replican. Sin embargo, los niveles más altos de Mms21 se dan en el testículo y en concreto en los espermatoцитos. Esta observación es consistente con que se haya descrito que Smc5 y Smc6 se expresan en niveles muy altos en testículo (Taylor et al., 2001). Estas células se encuentran detenidas en la profase I de la meiosis realizando la recombinación meiótica que permite el intercambio de secuencias entre cromosomas homólogos. Gracias a los estudios realizados en espermatoцитos, hemos descubierto que Mms21 localiza en las regiones asinapsadas de los cromosomas, y que colocaliza con Brca1.

Una vez visto esto, quisimos comprobar si esta colocación se daba también en células somáticas y comprobamos la localización de Mms21 y Brca1 en MEF. Es importante resaltar no sólo que ambas proteínas colocan, sino que lo hacen en unas estructuras llamadas focos en MEF no dañados durante las fases S y G2. Como ya se ha comentado en la Introducción, existen varios tipos de focos, no todos asociados a los DSB. Brca1 es capaz de formar ambos tipos de focos, tanto los asociados a DSB como no asociados, algo que ya se había descrito hace tiempo aunque no se comprendía bien (Scully et al., 1997). Respecto a los primeros, Brca1 puede relocalizarse a los focos inducidos por daño, como la irradiación, promoviendo la reparación del DSB mediante recombinación homóloga. En este caso, Brca1 colocan con otras proteínas que se encuentran en las rupturas de doble cadena (como  $\gamma$ H2AX y 53BP1). Respecto a los focos no asociados a DSB, se sabe que no colocan con  $\gamma$ H2AX y 53BP1. De hecho, a penas se conocen proteínas que colocan con estos focos “endógenos”. Se conoce muy poco de estos focos endógenos, aunque se cree que su desregulación es la que produce tumores y su ausencia letalidad embrionaria preimplantacional. En esta tesis se demuestra que Mms21 colocan con Brca1 en estos focos no asociados a DSB, y que ambas proteínas forman una estructura particular en la que Mms21 parece rodear a Brca1.

## 2. 3. Mms21 protege de la inestabilidad genómica a nivel celular

### 2. 3. 1. Estudios realizados en células humanas

Para comenzar nuestros estudios, desarrollamos un anticuerpo monoclonal contra la forma humana de Mms21. Con esta herramienta, así como utilizando siRNA contra Mms21 hemos descubierto que las células con bajos niveles de Mms21 presentan un fenotipo similar al que presentan las levaduras hipomorfas para los miembros del complejo Smc5/6. Este fenotipo incluye un incremento en la población G2/M del cultivo celular asociado a una alta incidencia de mitosis aberrantes, incluyendo puentes anafásicos, que conducen a una incorrecta segregación de los cromosomas. Por otro lado, las células con bajos niveles de Mms21 también presentan defectos en la cohesión de las cromátidas, algo ya ha sido confirmado recientemente (Behlke-Steinert et al., 2009). Nuestros resultados demuestran que las células con bajos niveles de Mms21 son capaces de detectar, señalar y reparar el daño en el DNA. Hemos observado mediante *western blot* que la DDR se activa en las mismas condiciones en que lo hacen las células silvestres. En este sentido, se ha

descrito que levaduras sin Smc6 funcional establecen un *checkpoint* de forma normal pero no son capaces de mantenerlo, y progresan a una mitosis defectuosa sin haber terminado de reparar su DNA (Harvey et al., 2004) y se considera la causa de la letalidad presentada por estos mutantes. Por otro lado, también hemos observado que las células con bajos niveles de Mms21 tienen una cinética de reparación similar a las silvestres. La diferencia entre ambas poblaciones surge cuando las células se exponen a tratamiento con MMS: las células con bajos niveles de Mms21 presentan una supervivencia reducida frente a las silvestres. En este punto surge una pregunta: si no es un problema de detección ni de reparación, ¿cuál es el problema? Para dar respuesta a esta pregunta desarrollamos los modelos murinos Mms21 KO y Mms21 KI.

### 2. 3. 2. Estudios realizados en células murinas

A partir de los modelos Mms21 KO y Mms21 extrajimos MEF con un 50% de los niveles de Mms21 o con una versión catalíticamente inactiva de Mms21. Estas células proliferan de forma similar a las silvestres pero son hipersensibles al MMS y al iPARP. La consecuencia de estos tratamientos es la acumulación de focos de Mms21 y de Brca1. Hemos observado un incremento en el número de focos en general, pero destaca el incremento de células que tienen muchos focos de Mms21 y de Brca1. En este aspecto los MEF Mms21 <sup>+/-</sup> y Mms21 <sup>SD/SD</sup> no se comportan de la misma manera. Ante el tratamiento con drogas, los primeros acumulan más focos de Brca1, probablemente a causa del escaso nivel de Mms21, que se traduce una baja tasa de focos. Sin embargo, los MEF Mms21 <sup>SD/SD</sup> acumulan más focos tanto de Mms21 como de Brca1. Esto se puede explicar aduciendo que Mms21 SD es una proteína inactiva, y que su acumulación no conduce a la resolución del foco como haría la versión silvestre de Mms21. Por esta razón también se acumulan tantos focos de Brca1, porque la ruta de Mms21 está inactiva. La consecuencia de estos tratamientos es análoga a la observada en células humanas tratadas con siRNA contra Mms21 e iPARP. Sólo la lectura es diferente (puentes anafásicos en las células humanas y micronúcleos en las murinas) ya que los segundos son una consecuencia de los primeros. La razón por la que cuantificamos micronúcleos es que las células primarias presentan bajos niveles de anafases, y mucho menores en presencia de agentes genotóxicos. En este experimento observamos que los MEF <sup>SD/SD</sup> presentan un incremento en el número de micronúcleos a las 24 horas de tratamiento y no a las 48 horas, como ocurre en los MEF Mms21 <sup>+/-</sup>. Esto podría deberse a que la presencia de Mms21 SD en lugar de un 50% de

Mms21 silvestre hace que las células sean incluso más sensibles a la acumulación de las estructuras intermediarias de la recombinación que aparecen como consecuencia del tratamiento con iPARP. Esta observación es consistente con el hecho de que los MEF<sup>SD/SD</sup> acumulen muchos focos de Brca1, ya que la ruta de Mms21 está inactiva.

El hecho de que los MEF con un solo alelo de Mms21 muestren un fenotipo diferente de los silvestres significa que Mms21 es un gen haploinsuficiente. Respecto a la actividad de Mms21 SD, dado este fenotipo que observamos y lo publicado acerca de las levaduras que portan las mutaciones homólogas (Andrews et al., 2005; Cost and Cozzarelli, 2006), postulamos que realmente es catalíticamente inactivo, pero estamos realizando experimentos encaminados a confirmarlo. Para ello estamos intentando evaluar el grado de SUMOilación de uno de los pocos sustratos conocidos de Mms21: Smc5.

Por otro lado, gracias a los estudios realizados en linfocitos B, hemos descrito que las células Mms21<sup>+/-</sup> presentan altos niveles de recombinación homóloga (medido mediante cuantificación de eventos de SCE). Esto es consistente con el hecho de que estas células tengan más focos de Brca1 y también con la observación de que células con bajos niveles de Smc5 tengan mayores niveles de SCE (A. Lehmann, comunicación personal). Este incremento se da en condiciones basales, de tal forma que los linfocitos B Mms21<sup>+/-</sup> tienen alrededor de un tercio más de intercambios entre cromátidas. Sin embargo, este incremento no se observa cuando las células se tratan con afidicolina. Una explicación a este hecho es que en condiciones basales, los bajos niveles de Mms21 promueven la acumulación de unas estructuras que se resuelven mediante HR, lo que genera eventos de SCE. Sin embargo, el tratamiento con afidicolina genera roturas que deben ser reparadas de una manera dependiente de Mms21, y los bajos niveles de Mms21 lo impiden. Esta alta tasa de recombinación es reminiscente de otros síndromes hiperrecombinogénicos (como el Síndrome de Bloom) y preconiza los tumores de los ratones Mms21<sup>+/-</sup> ya que altos niveles de HR conducen a la acumulación de mutaciones o pérdida de heterocigosidad (LOH).

## 2. 4. Mms21 protege de la inestabilidad genómica a nivel de organismo

Como se ha mencionado ya, la mayor parte de los estudios sobre Mms21 han sido realizados en levaduras. Dada la rapidez que presenta este modelo, ya conocemos bastante sobre el mecanismo y las rutas en las que Mms21 está implicada. Sin embargo, el desarrollo de modelos murinos nos ha permitido el estudio del papel de Mms21 a nivel de organismo

pluricelular, así como su implicación en la protección frente al desarrollo de tumores. Por ello hemos desarrollado sendos modelos murinos, Mms21 KO y Mms21 KI, para estudiar el papel de esta proteína y de la SUMOilación llevada a cabo por ella en el mantenimiento de la integridad genómica.

#### 2. 4. 1. Mms21 es un gen esencial

De forma similar a lo descrito en levaduras, la ausencia total de Mms21 es incompatible con la vida. Los embriones Mms21 <sup>-/-</sup> presentan letalidad preimplantacional, es decir, a estadio e3.5. Los blastómeros de estos embriones acumulan mitosis aberrantes, al igual que lo hacen las células humanas tratadas con siRNA contra Mms21. A pesar de la ausencia de Mms21, los embriones consiguen progresar hasta un estadio en el que ya han realizado unas 6 ó 7 divisiones. Por un lado puede que la contribución materna alivie el fenotipo de las primeras divisiones. Al irse diluyendo los niveles de Mms21 materna en las sucesivas divisiones, los blastómeros sufrirían mitosis más problemáticas. Por otro lado, se ha postulado que los efectos de la ausencia de Mms21 se perciben al cabo de varias divisiones realizadas con la reparación incompleta (Harvey et al., 2004). La letalidad de varios modelos murinos defectuosos para la DDR se alivia eliminando p53 al reducir los niveles de apoptosis. Por ello, quisimos rescatar total o parcialmente la letalidad de los embriones Mms21 <sup>-/-</sup> de esta manera, algo que no ocurrió ya que las células sin Mms21 no mueren por una activación del programa apoptótico, sino por catástrofe mitótica.

Respecto al modelo Mms21 KI o SD (*SUMO dead*, ya que la actividad catalítica ha sido inactivada con las mutaciones C195S y H197A) podemos decir que, al igual que lo descrito en levaduras, estos mutantes son viables. Dado el fenotipo de las levaduras, es esperable que estos ratones sean hipersensibles a daño en el DNA (como lo son los MEF Mms21 <sup>SD/SD</sup> y Mms21 <sup>+/-</sup>). No hemos observado tamaño reducido ni infertilidad, fenotipos bastante frecuentes en otros mutantes de la DDR (como el modelo H2AX KO descrito en (Celeste et al., 2002)).

#### 2. 4. 2. Mms21 es un gen haploinsuficiente (para la supresión tumoral)

A diferencia de los ratones Mms21 <sup>-/-</sup> los animales Mms21 <sup>+/-</sup> sí son viables, lo que nos ha permitido comprobar que dichos ratones Mms21 <sup>+/-</sup> desarrollan tumores con más frecuencia que los ratones silvestres (principalmente linfomas). Es decir, la pérdida de un alelo de Mms21 es protumoral, o lo que es lo mismo, Mms21 es un gen haploinsuficiente

para la supresión de tumores. Este fenotipo es más evidente al perder un alelo de p53, ya que en un fondo p53<sup>+/-</sup> aumenta la frecuencia y se adelanta la aparición de tumores. El análisis de estos tumores ha revelado que ninguno de ellos ha perdido el alelo silvestre de Mms21, por lo que concluimos que el desarrollo de tumores se debe a la hiperrecombinación de las células Mms21<sup>+/-</sup>, que induce la pérdida de otros genes que favorecen el desarrollo tumoral. Esta observación es consistente con el hecho de que estemos observando tumores muy variados en los animales Mms21<sup>+/-</sup>; p53<sup>+/-</sup>, algo que no observamos ni en animales Mms21<sup>+/-</sup> ni en ratones p53<sup>+/-</sup>.

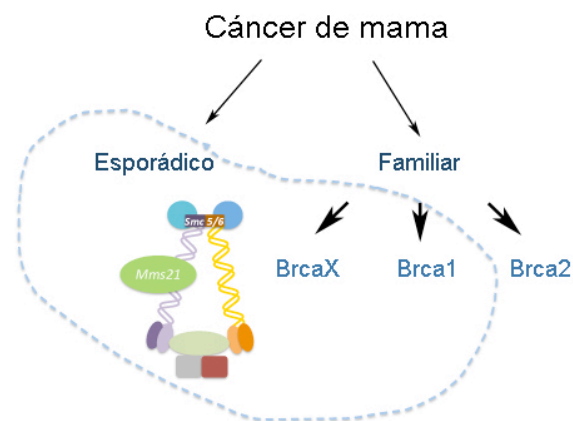
Este fenotipo hiperrecombinogénico es reminiscente del presentado por los pacientes con Síndrome de Bloom. Esta enfermedad es de carácter recesivo y es producida por mutaciones en el gen que codifica la helicasa BLM. Se caracteriza por el enanismo y al altísima incidencia de tumores infrecuentes que se desarrollan, de media, a partir de los 25 años. Uno de los tumores que se dan con alta frecuencia en estos pacientes es el cáncer de colon, y de hecho se han inducido con gran facilidad adenomas en el colon en un modelo BLM KO (Luo et al., 2000). Este protocolo, descrito en (Greten et al., 2004), se basa en la administración de un carcinógeno (azoxymetano) y un agente proinflamatorio (dextrán sulfato). Los ratones defectivos para BLM desarrollaron un elevado número de tumores en el colon, al igual que lo hacen las personas con Síndrome de Bloom. Dado que las células Mms21<sup>+/-</sup> tienen altos niveles de SCE, postulamos que los ratones Mms21<sup>+/-</sup> también desarrollarán más tumores de colon. Este experimento lo estamos realizando con animales Mms21<sup>+/-</sup> y ratones Mms21<sup>SD/SD</sup> en paralelo. Aunque no hayamos medido los niveles de SCE en las células Mms21<sup>SD/SD</sup> sí hemos observado que acumulan más focos de Brca1, por lo que esperamos que estos ratones también desarrollen más tumores que los silvestres. Cabe la posibilidad de que desarrollen incluso más tumores debido a que no tienen actividad de Mms21.

### 2. 4. 3. Mms21 en tumores humanos

Brca1 y Brca2 son dos genes supresores de tumores muy conocidos cuyas mutaciones predisponen a desarrollar tumores de mama. Los tumores de mama se pueden clasificar en espontáneos (el 80%) y familiares (el 20%). Los segundos se pueden clasificar, a su vez, en Brca1, Brca2 y BrcaX. Estos últimos representan la mitad de los casos de los tumores familiares. Están causados por mutaciones en genes no identificados, pero los pacientes no portan mutaciones ni en Brca1 ni en Brca2. Debido a que Mms21 colocaliza



con Brca1, decidimos investigar el estado de Mms21 en estos pacientes BrcaX. Como se describe en el apartado correspondiente en la sección de Resultados, en colaboración con el Grupo de Genética Humana hemos identificado 2 familias que portan, en heterocigosis, mutaciones en el locus de Mms21. En ambos casos, la delección de la T346 producía un codón de terminación 54 bp aguas abajo, de tal manera que la proteína resultante se trunca en la L133 y no contiene el dominio SP RING. Esta mutación también se ha encontrado en una muestra control, lo que puede interpretarse como que Mms21 no es un gen BrcaX. En cualquier caso, y visto lo que ocurre en los ratones Mms21<sup>+/-</sup>, es posible que esta delección comprometa la integridad genómica en humanos. Además, se han descrito mutaciones en Smc6 y Mms21 en tumores espontáneos de mama en la misma frecuencia que se han descrito para Brca1 y Brca2 (4% y 2% respectivamente). Por otro lado, también en colaboración con el Grupo de Genética Humana, hemos encontrado un subgrupo de tumores que expresan KI67 (y que, por tanto, proliferan) que no expresan Mms21, a diferencia del tejido mamario sano y de muchos tumores mamarios. Este subgrupo incluye un 4% de tumores esporádicos (**figura 54**).



**Figura 54. Mms21 y el cáncer de mama.** Se ha descrito la ausencia de Mms21 en tumores Brca1 y BrcaX y esporádicos.

Esta observación no sólo es interesante por el hecho de que vincula Mms21 con los tumores de mama sino por el mero hecho de la ausencia de expresión de esta proteína en un tejido que prolifera cuando la ausencia de Mms21 es letal para células sanas. Es decir, sólo las células tumorales toleran la ausencia de Mms21. Esta situación también se da para mutaciones en Brca1, hecho que se conoce como la Paradoja Brca1. Este modelo explica esta tolerancia aduciendo que la heterocigosis de Brca1 facilita la acumulación de otras

mutaciones (mediante LOH ya que existe HR defectuosa) que, a su vez, permiten tolerancia a la pérdida de Brca1. Esto correlaciona con la malignidad de la célula tumoral, de tal manera que este proceso sufre una selección positiva. Además, en humanos que portan un sólo alelo silvestre de Brca1 tienden a perder rápidamente el otro, lo cual acelera este proceso de malignización. Sin embargo, los tumores Mms21<sup>+/-</sup> que hemos analizado no han perdido el otro alelo de Mms21. Esto puede deberse a la total incompetencia de la ausencia de Mms21 con la vida, aún en un escenario con múltiples mutaciones, como un tumor. Es decir, es posible que no exista una Paradoja Mms21, y la hemicigosis de Mms21 sea suficiente para causar tumores.

La muerte por cáncer de mama supone una de las primeras causas de muerte entre las mujeres del mundo desarrollado. Muchas terapias antitumorales que se están utilizando actualmente, como la irradiación y la quimioterapia, se basan en la generación de una gran cantidad de daño en el DNA que activan la DDR y provocan la muerte celular por apoptosis. Pero también se están empezando a emplear estrategias más específicas que atacan selectivamente células tumorales con defectos específicos. El concepto que subyace a estos nuevos tratamientos es la letalidad sintética. Este es el proceso por el cual un tratamiento aplicado a unas células con determinada mutación es capaz de matarlas mientras que no mata las células sanas. En este sentido, una de las aproximaciones más prometedoras es el uso de inhibidores de PARP (iPARP) para el tratamiento de tumores de mama deficientes en Brca1 o Brca2 (Lord and Ashworth, 2008; Lord et al., 2008). Estos inhibidores bloquean una ruta de reparación que no es esencial para las células sanas, pero que sí lo es para células mutantes para Brca1 o Brca2 ya que las roturas de cadena sencilla generadas por la inhibición de PARP deben ser reparadas mediante HR dependiente de Brca1/Brca2.

Como se demuestra en esta tesis, las células Mms21<sup>+/-</sup>, Mms21<sup>SD/SD</sup> y especialmente la células humanas tratadas con siRNA contra Mms21 son hipersensibles a los tratamientos con iPARP. Por un lado, esta observación acerca mecanísticamente aún más a Mms21 y Brca1. Por otro lado, si en el futuro se descubren pacientes de cáncer con mutaciones en Mms21, quizá el tratamiento con Olaparib (iPARP) sea de utilidad para ellos también. Por nuestra parte, nuestro laboratorio está desarrollando un modelo murino condicional de Mms21 para eliminar esta proteína en el tejido mamario y estudiar el desarrollo de tumores en este tejido. La estrategia a seguir es similar a la que se ha seguido para estudiar los

tumores de tejido mamario en varios modelos murinos para Brca1 (Evers and Jonkers, 2006) ya que, a diferencia de lo que ocurre en mujeres con un solo alelo de Brca1, las hembras de ratón Brca1<sup>+/-</sup> nunca pierden el otro alelo ni desarrollan tumores de mama. La razón de esta diferencia entre humanos y ratones no se comprende muy bien. Por un lado, puede que se deba a diferencias inherentes a la especie (como la estructura de los loci Brca1/Brca2) pero por otro puede que se deba a la diferencia en el tiempo de vida de ambas especies. Por ello, la estrategia seguida para desarrollar tumores mamarios en hembras de ratón incluye la delección de Brca1/Brca2 (en nuestro caso Mms21) y p53 en tejido mamario.

Brca1 no es el único supresor tumoral con el que se relaciona Mms21. El otro es BLM. En este caso no hemos descrito una interacción entre ambas proteínas, pero células mutantes para ambos genes presentan fenotipos similares: son hiperrecombinogénicas. A pesar de las diferencias en los niveles de SCE (las células BS presentan un incremento en los niveles de SCE de 10 veces debido a una mutación en BLM, mientras que las células Mms21<sup>+/-</sup> sólo del doble debido a la hemicigosis) a nivel de organismo, la consecuencia de la ausencia de BLM y de la carencia de Mms21 es similar. Esta gran diferencia quizá pueda deberse, en parte, al hecho de que se están comparando los niveles de SCE de células sin BLM con los niveles de SCE de células con la mitad de Mms21. Tanto las personas con Síndrome de Bloom como los ratones Mms21<sup>+/-</sup>; p53<sup>+/-</sup> desarrollan muchos tumores con un espectro muy variado. El desarrollo de un amplio espectro de tumores no es común en los síndromes y tumores causados por mutaciones en genes de la respuesta y reparación del daño en el DNA. Por poner dos ejemplos de los que se habla en esta tesis, mutaciones en Brca1 predisponen a desarrollar cáncer de mama y ovario, y mutaciones en ATM predisponen a desarrollar linfomas tímicos.

Otros datos apuntan al papel de complejo Smc5/6 en el mantenimiento de la integridad genómica y su consecuencia a nivel de organismo. Se ha implicado la amplificación de la región que contiene el locus de Smc6 con el desarrollo de neuroblastomas (MYCN) (Storlazzi et al., 2010; Weber et al., 2004). También se ha relacionado mutaciones en Smc5 con el desarrollo de un raro síndrome que cursa con anomalías congénitas y retraso mental: el Síndrome Kabuki (Kuniba et al., 2009).

#### 2. 4. 4. Mms21 y la recombinación

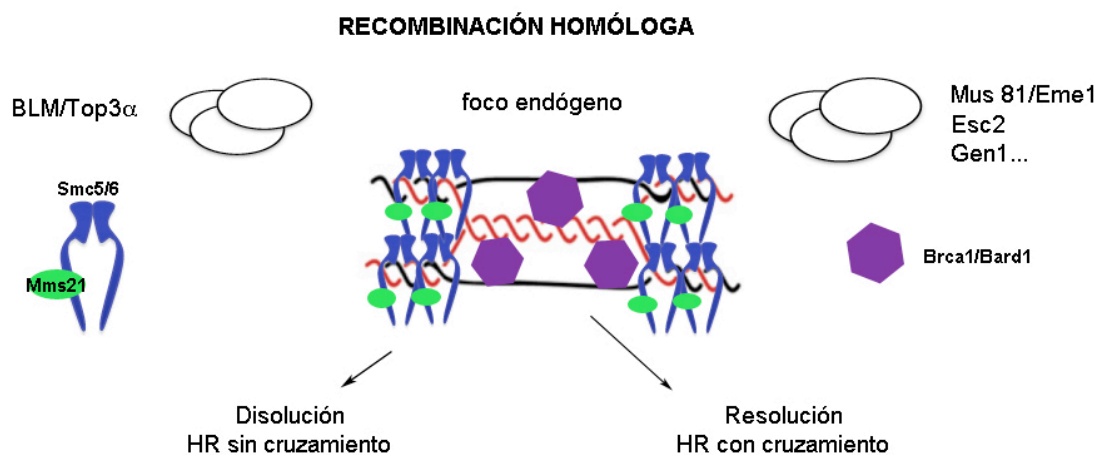
Son muchas las evidencias que implican a Mms21 en el proceso de recombinación homóloga. Hasta el comienzo de esta tesis, el mecanismo de acción de Smc5/6 y Mms21 seguía siendo un misterio, pero sí existían evidencias de su papel en la HR. Estas evidencias incluían desde varios defectos en el metabolismo del DNA hasta que este fenotipo dependía de Rad52, incluyendo la capacidad de establecer correctamente una respuesta al daño existente. Durante este tiempo, mucho se ha dicho del papel de Mms21 en la HR, gracias principalmente a los avances realizados en levaduras.

Nuestros resultados sugieren que Mms21 no es reclutado a DSB ya que al irradiar no se inducen los focos de Mms21 ni los focos existentes colocalizan con otros factores que sí colocalizan con los IRIF, como 53BP1. Es más, hemos observado que Mms21 no se recluta a las lesiones creadas mediante la microirradiación con láser (no se muestra), técnica que genera una ingente cantidad de DSB en una zona concreta del DNA, a diferencia de otros factores que sí son reclutados a DSB. En cambio, hemos observado que Mms21 colocaliza, con baja frecuencia, con  $\gamma$ H2AX. Esta marca no es exclusiva de DSB, también aparece en regiones de ssDNA, lo cual activa a ATR. De cualquier manera, tanto los DSB pueden desembocar en ssDNA como el ssDNA en DSB. En el primer caso se debe a que los DSB pueden ser reparados mediante HR durante las fases S y G2 mediante la resección de los extremos del DNA, que genera ssDNA. En este sentido, se ha descrito que el complejo Smc5/6 es reclutado a DSB, suprimiendo graves aberraciones cromosómicas que pueden surgir como consecuencia de los mismos (De Piccoli et al., 2006). En el segundo caso, en una horquilla detenida aparece ssDNA, y tanto el colapso de la horquilla como algunos procesos de reparación pueden desembocar en DSB. El complejo Smc5/6 se ha implicado en la reparación de las lesiones que surgen de las horquillas colapsadas (Ampatzidou et al., 2006).

Nosotros hemos descrito que Mms21 y Brca1 colocalizan sin solaparse en la misma estructura y que la reducción de los niveles de Mms21 conlleva una subida en los focos de Brca1, cuya consecuencia es un incremento en los niveles de SCE. En consonancia con nuestros resultados referentes a Mms21 y Brca1, se ha publicado que la sobreexpresión de Brca1 rescata la hipersensibilidad a luz UV e irradiación de los mutantes Rad18 (Smc6). Brca1 es proteína con 6 dominios BRCT cuya ausencia confiere sensibilidad a agentes que impiden la replicación. De manera notoria, la sobreexpresión de Brca1 rescata el fenotipo de

los mutantes Smc6 actuando junto con las nucleasas Slx1 y Mus81 (Lee et al., 2007; Sheedy et al., 2005). Estos resultados colocan a Mms21 y Brca1/Brca1 en dos rutas diferentes. Esta predicción es consistente con el hecho de que ambos mutantes, Mms21 y Brca1, muestren fenotipos opuestos: mientras que los mutantes Mms21 son hiperrecombinogénicos, mutaciones en Brca1 eliminan la HR. Por otro lado, se ha descrito que Brca1 se SUMOila de una manera no dependiente de Mms21, sino de Pias1/Pias4 (Morris et al., 2009). Esta SUMOilación llevada a cabo por Pias1/Pias4 es necesaria para el reclutamiento de Brca1 a los DSB. Resultados preliminares de nuestro laboratorio apuntan a que la bajada en los niveles de Pias 1 y de Pias 4 no afectan a la relación entre Mms21 y Brca1, que siguen colocándose en los focos endógenos. Por tanto, parece que la SUMOilación de Brca1 por Pias1/Pias4 parece estar relacionada con la localización de Brca1 al tipo de foco al que no se recluta Mms21.

A pesar de la colocalización entre Mms21 y Brca1, el espectro tumoral de los ratones Mms21<sup>+/-</sup>, p53<sup>+/-</sup> sugieren alguna relación entre Mms21 y BLM. De hecho, se ha demostrado que Mms21 y Sgs1 (el homólogo de BLM en levaduras) cooperan para reparar las estructuras cruciformes que aparecen durante la replicación (Branzei et al., 2006). Es más, se ha sugerido que Mms21 regula la actividad de Sgs1 mediante SUMOilación (Sollier et al., 2009). Estas evidencias de que Mms21 y BLM son consistentes con los mayores niveles de focos de Brca1 y de SCE en los MEF Mms21<sup>+/-</sup>. De esta manera, podemos proponer que Mms21 colaboran en la disolución de ciertas estructuras recombinogénicas, como uniones de Holliday, horquillas revertidas (patas de gallo) y hemicatenados, y que Brca1 colocaliza con Mms21 porque interviene en la resolución de las mismas estructuras mediante un mecanismo diferente (**figura 55**). Dado que Brca1 es reclutado a DSB, una hipótesis plausible es que Mms21 y Brca1 reconozcan la misma estructura, que puede disolverse mediante la ruta BLM/Mms21 o puede convertirse en un DSB, en cuyo caso sería resuelto por Brca1.



**Figura 55. Los focos endógenos de Mms21 y Brca1.** Mms21 y Brca1 se localizan en la misma estructura, sin embargo participan en 2 rutas diferentes de la HR.

Una implicación de este modelo es que combinar los bajos niveles de Mms21 con la ausencia de otras proteínas implicadas en la ruta de resolución de HR producirá un fenotipo más severo, probablemente acelerando el desarrollo de tumores. En este sentido, en nuestro laboratorio estamos trabajando en un modelo Mms21<sup>+/-</sup>; Mus81<sup>-/-</sup>. Esta proteína es una de las endonucleasas que resuelven las uniones de Holliday que se generan durante la reparación mediante HR (**figura 7**). Puesto que estamos inactivando otra ruta de reparación, es plausible que este modelo tenga un fenotipo más severo que los ratones Mms21<sup>+/-</sup>. De forma similar, los bajos niveles de Mms21 en un fondo nulo para la ruta de disolución no debería afectar al fenotipo observado. Otra implicación de este modelo es que aquellas mutaciones que rescaten los fenotipos asociados a Brca1 no lo harán con los fenotipos de Mms21. Este es el caso del modelo murino Brca1<sup>Δ11/Δ11</sup>; 53BP1<sup>-/-</sup> (**Bunting et al., 2010**) y de las células BS (sin BLM) repletadas de 53BP1 (**Tripathi et al., 2007**). En el primer caso, la eliminación de 53BP1 reduce la acumulación de estructuras radiales en las células Brca1<sup>Δ11/Δ11</sup> al reducir los niveles de NHEJ. Sin embargo, en el segundo caso, la eliminación de 53BP1 conduce a la acumulación de focos de Rad51, y al incremento de aberraciones cromosómicas. Es probable que la eliminación de 53BP1 en un fondo Mms21<sup>+/-</sup> resulte en un fenotipo similar al de las células BS.

Sin embargo, no todo apunta a que Mms21 y BLM presenten los mismos fenotipos. Se ha descrito que la helicasa Mph1 rescata la letalidad de los mutantes Mms21, pero no la de los mutantes Sgs1 (**Chen et al., 2009**). En este trabajo se propone que el complejo

Smc5/6 interviene en la reparación de las estructuras intermediarias de la recombinación creadas por Mph1 de una manera independiente de Sgs1. De forma interesante, se ha descrito un homólogo de Mph1 en humanos, FAAP250/FancM (Meetei et al., 2005). Es por esto que en nuestro laboratorio vamos a explorar la relación entre Mms21 y FancM. Como ya se ha comentado anteriormente, FancM está relacionada con la activación del eje ATR/Chk1 ante lesiones de tipo ICL (Collis et al., 2008).

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. La inserción de una tercera copia del locus completo de Chk1 produce un incremento en los niveles de Chk1 de una manera regulada.
2. Las células primarias de los animales Chk1<sup>Súper/+</sup> presentan una activación de los *checkpoints* más sensible que la de los ratones control. Sin embargo, en ausencia de daño, las células Chk1<sup>Súper/+</sup> proliferan con normalidad.
3. A nivel de organismo, en ausencia de estrés los animales Chk1<sup>Súper/+</sup> presentan una apariencia normal. Sin embargo, el incremento en los niveles de Chk1 es capaz de rescatar parcialmente los fenotipos asociados a alto estrés replicativo (envejecimiento y malformaciones craneales) presentes en animales ATR<sup>Seckel/Seckel</sup>. Por el contrario, niveles incrementados de Chk1 no afectan los fenotipos asociados a la acumulación de DSB en el modelo ATM *knockout*.
4. Mms21 se expresa en tejidos proliferativos y durante la espermatogénesis, sugiriendo un papel diferencial del complejo durante la meiosis. Durante la meiosis, Mms21 reconoce zonas de asinapsis que también son reconocidas por Brca1, pero no se acumula en los DSB.
5. En células somáticas, Mms21 forma *foci* que colocalizan con Brca1, y que son inducidos por condiciones que promueven la parada persistente de las horquillas de replicación, pero no por agentes que inducen DSB. La localización de Mms21 en un foco tiende a rodear la señal de Brca1, pero sin llegar a solaparse, sugiriendo que ambas proteínas reconocen zonas diferentes de una misma estructura.
6. Niveles disminuidos de Mms21 conllevan una acumulación de focos de Brca1 y una mayor tasa de recombinación. La depleción de Mms21 en células humanas deriva en la acumulación de puentes anafásicos, cuya presencia se ve exacerbada en presencia de inhibidores de PARP.
7. Asimismo, la ausencia de Mms21 produce letalidad embrionaria preimplantacional debido a la acumulación de puentes anafásicos, mitosis aberrantes y catástrofe mitótica en las primeras divisiones embrionarias.
8. Las células heterocigotas para Mms21 acumulan micronúcleos, particularmente en respuesta a MMS, cuyo origen podría ser la presencia de puentes anafásicos.

9. Mms21 es haploinsuficiente para la protección contra el desarrollo de tumores, lo que está en consonancia con la mayor tasa recombinogénica de las células Mms21<sup>+/-</sup>.
10. Estudios preliminares sugieren que existen casos de tumores de mama asociados a niveles reducidos de Mms21. Se ha encontrado una mutación de Mms21 que inactiva la proteína en 2 familias *BRCAX*, y también en una familia control. La relevancia de esta heterocigosidad en humanos es aún desconocida.
11. Una mutación que inactiva la actividad catalítica de Mms21 es compatible con la vida en ratón, aunque a nivel celular el fenotipo es similar al presentado por las células Mms21<sup>+/-</sup>.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* *15*, 2177-2196.
- Adams, K.E., Medhurst, a.L., Dart, D.a., and Lakin, N.D. (2006). Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* *25*, 3894-3904.
- Alderton, G.K., Galbiati, L., Griffith, E., Surinya, K.H., Neitzel, H., Jackson, A.P., Jeggo, P.A., and O'Driscoll, M. (2006). Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. *Nat Cell Biol* *8*, 725-733.
- Ampatzidou, E., Irmisch, A., O'Connell, M.J., and Murray, J.M. (2006). Smc5/6 is required for repair at collapsed replication forks. *Mol Cell Biol* *26*, 9387-9401.
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D., and Taniguchi, T. (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & development* *18*, 1958-1963.
- Andrews, E.A., Palecek, J., Sergeant, J., Taylor, E., Lehmann, A.R., and Watts, F.Z. (2005). Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol Cell Biol* *25*, 185-196.
- Attikum, H.V., and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology* *2*, 207-217.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499-506.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2004). Phosphatases join kinases in DNA-damage response pathways. *Trends Cell Biol* *14*, 339-341.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* *26*, 7773-7779.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 792-804.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell* *3*, 421-429.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* *434*, 864-870.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633-637.
- Behlke-Steinert, S., Touat-Todeschini, L., Skoufias, D.A., and Margolis, R.L. (2009). SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression. *Cell Cycle* *8*, 2211-2218.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J* *13*, 5764-5771.
- Bermudez, V.P., Lindsey-Boltz, L.A., Cesare, A.J., Maniwa, Y., Griffith, J.D., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1633-1638.

- Biedermann, K.A., Sun, J.R., Giaccia, A.J., Tosto, L.M., and Brown, J.M. (1991). scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 1394-1397.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* *6*, 611-622.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., and Peters, A.H.F.M. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* *436*.
- Branzei, D., Sollier, J., Liberi, G., Zhao, X., Maeda, D., Seki, M., Enomoto, T., Ohta, K., and Foiani, M. (2006). Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* *127*, 509-522.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* *14*, 397-402.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* *141*, 243-254.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* *19*, 1040-1052.
- Bzymek, M., Thayer, N.H., Oh, S.D., Kleckner, N., and Hunter, N. (2010). Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature* *464*, 937-941.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* *281*, 1677-1679.
- Carrassa, L., Broggin, M., Vikhanskaya, F., and Damia, G. (2003). Characterization of the 5'flanking region of the human Chk1 gene: identification of E2F1 functional sites. *Cell Cycle* *2*, 604-609.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* *5*, 675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.a., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science (New York, NY)* *296*, 922-927.
- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* *11*, 319-330.
- Chen, Y.H., Choi, K., Szakal, B., Arenz, J., Duan, X., Ye, H., Branzei, D., and Zhao, X. (2009). Interplay between the Smc5/6 complex and the Mph1 helicase in recombinational repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 21252-21257.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.a., Niki, M., Koutcher, J.a., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* *436*, 725-730.
- Chini, C.C., and Chen, J. (2003). Human claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem* *278*, 30057-30062.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 616-627.

- Cimprich, K.A., Shin, T.B., Keith, C.T., and Schreiber, S.L. (1996). cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 2850-2855.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* *436*, 642.
- Collis, S.J., Ciccia, A., Deans, A.J., Horejsi, Z., Martin, J.S., Maslen, S.L., Skehel, J.M., Elledge, S.J., West, S.C., and Boulton, S.J. (2008). FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol Cell* *32*, 313-324.
- Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A., and Parker, A.R. (2004). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* *24*, 949-961.
- Cortes-Ledesma, F., de Piccoli, G., Haber, J.E., Aragon, L., and Aguilera, A. (2007). SMC proteins, new players in the maintenance of genomic stability. *Cell Cycle* *6*, 914-918.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science (New York, NY)* *294*, 1713-1716.
- Cost, G.J., and Cozzarelli, N.R. (2006). Smc5p promotes faithful chromosome transmission and DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *172*, 2185-2200.
- Cuadrado, M., Martinez-pastor, B., Murga, M., Toledo, L.I., Gutierrezmartinez, P., Lopez, E., and Fernandez-capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J Exp Med* *203*, 297-303.
- D'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194-198.
- D'Arpa, P., Beardmore, C., and Liu, L.F. (1990). Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* *50*, 6919-6924.
- De Bont, R. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* *19*, 169-185.
- De Piccoli, G., Cortes-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., Hwang, J.Y., Machin, F., Ceschia, A., McAleenan, A., *et al.* (2006). Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat Cell Biol* *8*, 1032-1034.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638-642.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., *et al.* (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* *136*, 435-446.
- Dominguez, O., and Lopez-Larrea, C. (1994). Gene walking by unpredictably primed PCR. *Nucleic Acids Res* *22*, 3247-3248.
- Donzelli, M., and Draetta, G.F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports* *4*, 671-677.
- Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A.J., and Hupp, T.R. (2003). The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* *23*, 8846-8861.
- Dronkert, M.L., and Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* *486*, 217-247.

- Duan, X., Sarangi, P., Liu, X., Rangi, G.K., Zhao, X., and Ye, H. (2009). Structural and functional insights into the roles of the Mms21 subunit of the Smc5/6 complex. *Mol Cell* 35, 657-668.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86, 43-112.
- Dumaz, N., and Meek, D.W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *The EMBO journal* 18, 7002-7010.
- Efeyan, A., Murga, M., Martinez-Pastor, B., Ortega-Molina, A., Soria, R., Collado, M., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2009). Limited role of murine ATM in oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression. *PloS one* 4, e5475-e5475.
- Evers, B., and Jonkers, J. (2006). Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects. *Oncogene* 25, 5885-5897.
- Fang, Y., Tsao, C.-C., Goodman, B.K., Furumai, R., Tirado, C.A., Abraham, R.T., and Wang, X.-F. (2004). ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background. *EMBO J* 23, 3164-3174.
- Fernandez-Capetillo, O. (2010). Intrauterine programming of ageing. *EMBO Rep* 11, 32-36.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N., *et al.* (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 4, 993-997.
- Fernandez-Capetillo, O., and Nussenzweig, A. (2008). ATM breaks into heterochromatin. *Mol Cell* 31, 303-304.
- Frank, K.M., Sharpless, N.E., Gao, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., Zhu, C., Manis, J.P., Horner, J., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol Cell* 5, 993-1002.
- Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21, 6225-6235.
- Garinis, G.A., van der Horst, G.T., Vijg, J., and Hoeijmakers, J.H. (2008). DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* 10, 1241-1247.
- Ge, X.Q., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* 21, 3331-3341.
- Goodarzi, A.a., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., L'brich, M., and Jeggo, P.a. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular cell* 31, 167-177.
- Gorgoulis, V.G. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907-913.
- Gossen, J.A., de Leeuw, W.J., Tan, C.H., Zwarthoff, E.C., Berends, F., Lohman, P.H., Knook, D.L., and Vijg, J. (1989). Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7971-7975.
- Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72, 131-142.

- Gowen, L.C., Johnson, B.L., Latour, A.M., Sulik, K.K., and Koller, B.H. (1996). Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* *12*, 191-194.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* *118*, 285-296.
- Griffith, E., Walker, S., Martin, C.-A., Vagnarelli, P., Stiff, T., Vernay, B., Al Sanna, N., Saggar, A., Hamel, B., Earnshaw, W.C., *et al.* (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nature genetics* *40*, 232-236.
- Gurley, K.E., and Kemp, C.J. (2001). Synthetic lethality between mutation in Atm and DNA-PK(cs) during murine embryogenesis. *Curr Biol* *11*, 191-194.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO journal* *27*, 589-605.
- Hakem, R., de la Pompa, J.L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., *et al.* (1996). The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* *85*, 1009-1023.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science (New York, NY)* *319*, 1352-1355.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* *11*, 124-136.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* *28*, 739-745.
- Harvey, S.H., Sheedy, D.M., Cuddihy, A.R., and O'Connell, M.J. (2004). Coordination of DNA damage responses via the Smc5/Smc6 complex. *Mol Cell Biol* *24*, 662-674.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* *18*, 1-12.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* *37*, 614-636.
- Hefferin, M.L., and Tomkinson, A.E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* *4*, 639-648.
- Helleday, T. (2010). Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* *31*, 955-960.
- Hiom, K. (2000). Homologous recombination. *Curr Biol* *10*, R359-361.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* *287*, 1824-1827.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* *411*, 366-374.
- Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* *112*, 389-397.
- Huang, T.T., and D'Andrea, A.D. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 323-334.
- Huen, M.S. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* *131*, 901-914.
- Inomata, K., Aoto, T., Binh, N.T., Okamoto, N., Tanimura, S., Wakayama, T., Iseki, S., Hara, E., Masunaga, T., Shimizu, H., *et al.* (2009). Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell* *137*, 1088-1099.



- Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Ohtani, K. (2006). Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene* *25*, 1786-1798.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *8*, 37-45.
- Jiang, Y., Rabbi, M., Kim, M., Ke, C., Lee, W., Clark, R.L., Mieczkowski, P.A., and Marszalek, P.E. (2009). UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophys J* *96*, 1151-1158.
- Kuhne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P.a., and L'brich, M. (2004). A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer research* *64*, 500-508.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.
- Kim, Y.C., Gerlitz, G., Furusawa, T., Catez, F., Nussenzweig, A., Oh, K.S., Kraemer, K.H., Shiloh, Y., and Bustin, M. (2009). Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat Cell Biol* *11*, 92-96.
- Kitagawa, R., Bakkenist, C.J., McKinnon, P.J., and Kastan, M.B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* *18*, 1423-1438.
- Koniaras, K., Cuddihy, A.R., Christopoulos, H., Hogg, A., and O'Connell, M.J. (2001). Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells. *Oncogene* *20*, 7453-7463.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006a). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* *172*, 823-834.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2006b). Spatio-temporal dynamics of chromatin containing DNA breaks. *Cell Cycle* *5*, 1910-1912.
- Kuehn, M.R. (2005). Mouse Ubc9 knockout: many path(way)s to ruin. *Dev Cell* *9*, 727-728.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* *124*, 943-955.
- Kuniba, H., Yoshiura, K., Kondoh, T., Ohashi, H., Kurosawa, K., Tonoki, H., Nagai, T., Okamoto, N., Kato, M., Fukushima, Y., *et al.* (2009). Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* *54*, 304-309.
- Lam, M.H., Liu, Q., Elledge, S.J., and Rosen, J.M. (2004). Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* *6*, 45-59.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science (New York, NY)* *304*, 93-96.
- Lee, K.M., Nizza, S., Hayes, T., Bass, K.L., Irmisch, A., Murray, J.M., and O'Connell, M.J. (2007). Brc1-mediated rescue of Smc5/6 deficiency: requirement for multiple nucleases and a novel Rad18 function. *Genetics* *175*, 1585-1595.
- Lin, S.Y., Rai, R., Li, K., Xu, Z.X., and Elledge, S.J. (2005). BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15105-15109.
- Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *65*, 127-133.

- Lindroos, H.B., Strom, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K., and Sjogren, C. (2006). Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Mol Cell* 22, 755-767.
- Liu, C.Y., Flesken-Nikitin, A., Li, S., Zeng, Y., and Lee, W.H. (1996). Inactivation of the mouse Brca1 gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes Dev* 10, 1835-1843.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuo, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-rivera, S., Demayo, F., and Bradley, A. (2000a). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
- Liu, S., Bekker-jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* 26, 6056-6064.
- Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., and Alt, F.W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120, 497-512.
- Lord, C.J., and Ashworth, A. (2008). Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 8, 363-369.
- Lord, C.J., McDonald, S., Swift, S., Turner, N.C., and Ashworth, A. (2008). A high-throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity. *DNA Repair (Amst)* 7, 2010-2019.
- Losada, A., and Hirano, T. (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* 19, 1269-1287.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.a., Celeste, A., Manis, J.P., Van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., *et al.* (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell* 21, 187-200.
- Lovejoy, C.a., and Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA repair*.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology* 5, 255-260.
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., Jackson, S.P., Bartek, J., and Lukas, J. (2004a). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 23, 2674-2683.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004b). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amsterdam)* 3, 997-1007.
- Luo, G., Santoro, I.M., McDaniel, L.D., Nishijima, I., Mills, M., Youssoufian, H., Vogel, H., Schultz, R.A., and Bradley, A. (2000). Cancer predisposition caused by elevated mitotic recombination in Bloom mice. *Nat Genet* 26, 424-429.
- Mahaney, B.L., Meek, K., and Lees-Miller, S.P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417, 639-650.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell* 23, 307-318.

- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7, 2902-2906.
- Martens, U.M., Chavez, E.A., Poon, S.S., Schmoor, C., and Lansdorp, P.M. (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* 256, 291-299.
- Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., and Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18, 2736-2746.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., III, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897.
- McDonald, W.H., Pavlova, Y., Yates, J.R., 3rd, and Boddy, M.N. (2003). Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex. *J Biol Chem* 278, 45460-45467.
- Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C.G., *et al.* (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 37, 958-963.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770-774.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci* 34, 264-272.
- Miyashita, T., Kitada, S., Krajewski, S., Horne, W.A., Delia, D., and Reed, J.C. (1995). Overexpression of the Bcl-2 protein increases the half-life of p21Bax. *J Biol Chem* 270, 26049-26052.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 43, 223-249.
- Montelone, B.A., and Koelliker, K.J. (1995). Interactions among mutations affecting spontaneous mutation, mitotic recombination, and DNA repair in yeast. *Curr Genet* 27, 102-109.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Morikawa, H., Morishita, T., Kawane, S., Iwasaki, H., Carr, A.M., and Shinagawa, H. (2004). Rad62 protein functionally and physically associates with the smc5/smc6 protein complex and is required for chromosome integrity and recombination repair in fission yeast. *Mol Cell Biol* 24, 9401-9413.
- Morris, J.R. (2010). SUMO in the mammalian response to DNA damage. *Biochem Soc Trans* 38, 92-97.
- Morris, J.R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., Butler, L., Galanty, Y., Pagon, L., Kiuchi, T., *et al.* (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462, 886-890.
- Murga, M., Bunting, S., Montana, M.F., Soria, R., Mulero, F., Canamero, M., Lee, Y., McKinnon, P.J., Nussenzweig, A., and Fernandez-Capetillo, O. (2009a). A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet* 41, 891-898.

- Myers, J.S., and Cortez, D. (2006). Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem* *281*, 9346-9350.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* *9*, 769-779.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* *7*, 683-694.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* *391*, 407-410.
- Niedernhofer, L.J., Garinis, G.A., Raams, A., Lalai, A.S., Robinson, A.R., Appeldoorn, E., Odijk, H., Oostendorp, R., Ahmad, A., van Leeuwen, W., *et al.* (2006). A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* *444*, 1038-1043.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* *33*, 497-501.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053-1058.
- Osborn, A.J., Elledge, S.J., and Zou, L. (2002). Checking on the fork: The DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* *12*, 509-516.
- Pandita, T.K., Lieberman, H.B., Lim, D.S., Dhar, S., Zheng, W., Taya, Y., and Kastan, M.B. (2000). Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* *19*, 1386-1391.
- Parrinello, S. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biol* *5*, 741-747.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.a. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA repair* *6*, 953-966.
- Pebernard, S., McDonald, W.H., Pavlova, Y., Yates, J.R., 3rd, and Boddy, M.N. (2004). Nse1, Nse2, and a novel subunit of the Smc5-Smc6 complex, Nse3, play a crucial role in meiosis. *Mol Biol Cell* *15*, 4866-4876.
- Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* *443*, 222-225.
- Petrini, J.H., and Stracker, T.H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* *13*, 458-462.
- Poele, R.H.T., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., Joel, S.P., and Dna (2002). damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer Res* *62*, 1876-1883.
- Potts, P.R., Porteus, M.H., and Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* *25*, 3377-3388.
- Potts, P.R., and Yu, H. (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol* *25*, 7021-7032.
- Potts, P.R., and Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 581-590.

- Prakash, S., and Prakash, L. (1977). Increased spontaneous mitotic segregation in MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 87, 229-236.
- Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A.J., Smith, G.C.M., Recio, M.J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., *et al.* (2004). pathway of double strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis and proteins locating to g-H2AX foci. *Mol Cell*, 715-724.
- Richardson, C., and Jasin, M. (2000a). Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20, 9068-9075.
- Richardson, C., and Jasin, M. (2000b). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 405, 697-700.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725-729.
- Ruzankina, Y., Asare, A., and Brown, E.J. (2008). Replicative stress, stem cells and aging. *Mechanisms of ageing and development* 129, 460-466.
- Ruzankina, Y., Pinzon-guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., Zediak, V.P., Velez, M., Bhandoola, A., and Brown, E.J. (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1, 113-126.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., *et al.* (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-1753.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D.M. (1997). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425-435.
- Sedelnikova, O.a., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature cell biology* 6, 168-170.
- Sergeant, J., Taylor, E., Palecek, J., Fousteri, M., Andrews, E.A., Sweeney, S., Shinagawa, H., Watts, F.Z., and Lehmann, A.R. (2005). Composition and architecture of the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18 (Smc5-6) complex. *Mol Cell Biol* 25, 172-184.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593±602-593±602.
- Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-713.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* 6, 648-655.
- Sheedy, D.M., Dimitrova, D., Rankin, J.K., Bass, K.L., Lee, K.M., Tapia-Alveal, C., Harvey, S.H., Murray, J.M., and O'Connell, M.J. (2005). Brc1-mediated DNA repair and damage tolerance. *Genetics* 171, 457-468.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G 1 -phase progression. *Genes Dev* 13, 1501±1512-1501±1512.

- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* 3, 155-168.
- Shiloh, Y., and Kastan, M.B. (2001). ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res* 83, 209-254.
- Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Molecular cell* 33, 547-558.
- Smith, G.C.M., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes & Dev* 13, 916-934.
- Smits, V.a.J., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Current biology : CB* 16, 150-159.
- Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297, 599-602.
- Sollier, J., Driscoll, R., Castellucci, F., Foiani, M., Jackson, S.P., and Branzei, D. (2009). The *Saccharomyces cerevisiae* Esc2 and Smc5-6 proteins promote sister chromatid junction-mediated intra-S repair. *Mol Biol Cell* 20, 1671-1682.
- Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuasen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 7, 195-201.
- Stamatoyannopoulos, J.A., Adzhubei, I., Thurman, R.E., Kryukov, G.V., Mirkin, S.M., and Sunyaev, S.R. (2009a). Human mutation rate associated with DNA replication timing. *Nat Genet* 41, 393-395.
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H., and Taylor, A.M. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577-587.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64, 2390-2396.
- Stiff, T., Reis, C., Alderton, G.K., Woodbine, L., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2005). Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *EMBO J* 24, 199-208.
- Storlazzi, C.T., Lonoce, A., Guastadisegni, M.C., Trombetta, D., D'Addabbo, P., Daniele, G., L'Abbate, A., Macchia, G., Surace, C., Kok, K., *et al.* (2010). Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: Origin and structure. *Genome Res.*
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.
- Tao, Z.F., and Lin, N.H. (2006). Chk1 inhibitors for novel cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem* 6, 377-388.
- Taylor, E.M., Moghraby, J.S., Lees, J.H., Smit, B., Moens, P.B., and Lehmann, A.R. (2001). Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 complex. *Mol Biol Cell* 12, 1583-1594.

- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 412, 553-557.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13, 152-157.
- Tibelius, A., Marhold, J., Zentgraf, H., Heilig, C.E., Neitzel, H., Ducommun, B., Rauch, A., Ho, A.D., Bartek, J., and Kramer, A. (2009). Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. *J Cell Biol* 185, 1149-1157.
- Todaró, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.
- Toledo, L.I., Murga, M., Gutierrez-Martinez, P., Soria, R., and Fernandez-Capetillo, O. (2008). ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes & development* 22, 297-302.
- Torres-Rosell, J., De Piccoli, G., Cordon-Preciado, V., Farmer, S., Jarmuz, A., Machin, F., Pasero, P., Lisby, M., Haber, J.E., and Aragon, L. (2007). Anaphase onset before complete DNA replication with intact checkpoint responses. *Science* 315, 1411-1415.
- Torres-Rosell, J., Machin, F., and Aragon, L. (2005a). Smc5-Smc6 complex preserves nucleolar integrity in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* 4, 868-872.
- Torres-Rosell, J., Machin, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J.Z., and Aragon, L. (2005b). SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol* 7, 412-419.
- Tripathi, V., Nagarjuna, T., and Sengupta, S. (2007). BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J Cell Biol* 178, 9-14.
- Turner, N.C., Lord, C.J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A.N., and Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J* 27, 1368-1377.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22, 5612-5621.
- Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* 5, 617-627.
- Weber, A., Imisch, P., Bergmann, E., and Christiansen, H. (2004). Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 22, 2681-2690.
- Welsh, P.L., Owens, K.N., and King, M.C. (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 16, 69-74.
- West, S.C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 435-445.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.
- Xu, X., Lee, J., and Stern, D.F. (2004). Microcephalin is a DNA damage response protein involved in regulation of CHK1 and BRCA1. *J Biol Chem* 279, 34091-34094.

- Xu, X., Qiao, W., Linke, S.P., Cao, L., Li, W.M., Furth, P.A., Harris, C.C., and Deng, C.X. (2001). Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat Genet* 28, 266-271.
- Yamauchi, M., Oka, Y., Yamamoto, M., Niimura, K., Uchida, M., Kodama, S., Watanabe, M., Sekine, I., Yamashita, S., and Suzuki, K. (2008). Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA repair* 7, 405-417.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25, 5363-5379.
- Zhao, H., and Piwnica-worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 21, 4129-4139.
- Zhao, X., and Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4777-4782.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134, 981-994.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32, 619-697.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.
- Zou, L., Liu, D., and Elledge, S.J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13827-13832.