



SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

---

---

**Inhibición de la cinasa DNA-PKCs  
en una línea celular AF-A:  
Evaluación Citogenética**

**TRABAJO DE FIN DE  
CURSO**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DEL  
CURSO AVANZADO EN**

**CITOGÉNÉTICA**

**P R E S E N T A:**

**Rebeca Rodríguez Soto**

**TUTOR:**

**M en C. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez**

**México, D.F.**

**Abril 2015**

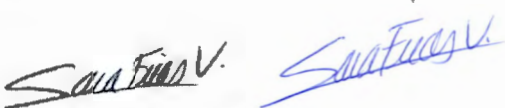
**“Inhibición de la cinasa DNA-PKCs en una línea celular AF-A:  
Evaluación Citogenética”**



**DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA**



**DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**DRA. SARA FRÍAS VAZQUEZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ALTA ESPECIALIDAD EN  
CITOGENÉTICA HUMANA**



**M. EN C. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ  
TUTOR DE TESIS**



## **Agradecimientos académicos**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la tutoría del M en C. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez y la asesoría de la Dra. Sara Frías Vázquez. Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IA 201713 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y el proyecto No. 043-12 de Fondos Federales, Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

## Índice

Abreviaturas	v
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
1. Introducción	1
1.1 Anemia de Fanconi	1
1.2 Características clínicas	3
1.3 Fenotipo celular en AF	5
1.4 Funcionamiento de la vía FA/BRCA	6
1.5 Vías alternas de reparación de enlaces covalentes cruzados	10
1.5.1 NHEJ	11
1.5.2 HR-alterna	13
1.5.3 A-EJ	14
1.6 Vía alterna de reparación de enlaces covalentes cruzados acoplada a transcripción	15
2. Antecedentes directos	15
3. Justificación	17
4. Objetivo	18
5. Hipótesis	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	19
6.2 Inhibición de la cinasa DNA- PKcs	19
6.3 Diseño experimental	20

6.3	Cosecha y obtención de metafases	21
6.4	Evaluación citogenética	22
6.5	Análisis estadístico	22
7.	Resultados	23
7.1	Análisis de sobrevivencia a concentraciones variables de NU7026	23
7.2	Análisis de aberraciones cromosómicas a concentraciones variables de NU7026	24
7.3	Ensayo de sobrevivencia al uso de NU7026 a 6, 30 y 54 horas posterior al tratamiento con MMC	25
7.4	Análisis de aberraciones cromosómicas a 24, 48 y 72 horas	26
7.5	Evaluación citogenética del uso de NU7026 50 $\mu$ M, 30 horas posteriores al tratamiento con MMC	28
8.	Discusión	29
8.1	La inhibición química de la proteína DNA-PKcs tiene un efecto doble negativo	32
8.2	La inhibición química de DNA-PKcs aumenta la sensibilidad de las células normales al efecto clastogénico de los ICL's	34
8.3	La inhibición química de DNA-PKcs no disminuye la frecuencia de rupturas reunidas en las células AF	36
9.	Conclusiones	38
10.	Bibliografía	39

## Abreviaturas

<b>AA</b>	Anemia aplasiaca
<b>ADD</b>	Aducto
<b>AC</b>	Aberraciones cromosómicas
<b>AF</b>	Anemia de Fanconi
<b>DEB</b>	Diepoxibutano
<b>DNA-PKCs</b>	DNA-dependent protein kinase
<b>DSB</b>	Ruptura de doble hebra (de inglés <i>Double Strand Break</i> )
<b>FA/BRCA</b>	Vía de anemia de Fanconi y Cáncer de mama
<b>FAcore</b>	Complejo central AF
<b>HR</b>	Recombinación homóloga (de inglés <i>Homologous Recombination</i> )
<b>HRR</b>	Reparación por recombinación homóloga (de inglés <i>Homologous Recombination Repair</i> )
<b>ICL</b>	Enlace covalente cruzado (de inglés <i>Interstrand Cross-Links</i> )
<b>ICH</b>	Intercambio de cromátides hermanas
<b>MMC</b>	Mitomicina C
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos (de inglés <i>Nucleotide Excision Repair</i> )
<b>NER-TCR</b>	Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a transcripción
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos (de inglés <i>Non-Homologous End-Joining</i> )
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SsDNA</b>	DNA de hebra sencilla (de inglés <i>Single Strand DNA</i> )
<b>TLS</b>	Síntesis translesion

## Índice de figuras

Figura 1 Aberraciones cromosómicas e ICH's en células AF	5
Figura 2 Subcomplejos y modificaciones postraduccionales de las proteínas FA	7
Figura 3 Modelo especulativo para el uso coordinado de múltiples vías de reparación para la reparación de enlaces covalentes cruzados	8
Figura 4 Esquema de la reparación por recombinación homóloga	9
Figura 5 Vías alternas de reparación de DSB en las células AF	12
Figura 6 Diseño experimental para determinar la concentración de trabajo del inhibidor NU7026	20
Figura 7 Diseño experimental para la inhibición de la cinasa DNA-PKCs	21
Figura 8 Cosecha de las líneas celulares linfoblastoides para la obtención de metafases	21
Figura 9 Ejemplos de aberraciones cromosómicas observadas en el análisis de rompimientos cromosómicos inducidos por MMC en células AF	22
Figura 10 Porcentaje de sobrevivencia a concentraciones variables de NU7026 y al tratamiento conjunto MMC + NU7026	23
Figura 11 Frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula a concentraciones variables de NU7026	25
Figura 12 Porcentaje de sobrevivencia a NU7026 50 $\mu$ M + MMC a tiempos de cosecha variables	26
Figura 13 Frecuencia de aberraciones por célula al uso de NU7026 50 $\mu$ M a tiempos de cosecha variables	27

## Índice de tablas

Tabla 1. Genes que se han detectado mutados en pacientes con AF	2
Tabla 2. Malformaciones congénitas más frecuentes en la AF.	3
Tabla 3 Genes AF <sup>1</sup> que confieren susceptibilidad a cáncer	4
Tabla 4 Resultados del efecto de la inhibición de la vía de reparación NHEJ en células AF	16



# 1. Introducción

## 1.1 Anemia de Fanconi

La anemia de Fanconi (AF) es un síndrome de inestabilidad cromosómica con un modo de herencia recesiva que puede ser autosómica o ligada al cromosoma X. Se caracteriza por la presencia de múltiples malformaciones congénitas, falla progresiva de médula ósea, aberraciones cromosómicas (AC) espontáneas y predisposición a cáncer. Se presenta con una incidencia de 1 a 5 casos por cada millón de personas y se estima que la frecuencia de portadores es de 1 en 300 individuos (Oostra et al. 2012; Kim & D'Andrea 2012).

La AF es una enfermedad compleja, con una amplia heterogeneidad genética, hasta el momento se han descrito 15 distintas variantes genéticas o "grupos de complementación" (Tabla 1), causadas por mutaciones en genes que son parte de una vía de reparación del DNA la cual se denomina vía de anemia de Fanconi y Cáncer de mama (FA/BRCA).

La vía FA/BRCA es una vía especializada en la reparación de un tipo específico de lesión que une covalentemente a ambas cadenas de la doble hélice (ICL's por sus siglas en inglés interstrand cross-links) y esencial en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Por lo tanto las células derivadas de pacientes con AF son hipersensibles a agentes inductores de ICL's, como la mitomicina C (MMC) o el diepoxibutano (DEB) (Mladenov & Iliakis 2011; Kaddar & Carreau 2012). La exposición a estos agentes confiere a las células AF un fenotipo particular caracterizado por el incremento de rompimientos cromosómicos, y la formación de figuras de intercambio radial, por lo que el estudio citogenético de aberraciones cromosómicas, es una herramienta útil en el diagnóstico e investigación de la anemia de Fanconi (Grompe & Andrea 2001).

Tabla 1. Genes que se han detectado mutados en pacientes con AF

Grupo de complementación y gen mutado	Frecuencia de la mutación	Locus	Función molecular
FANCA	~66%	16q24.3	Complejo FA core
FANCB	~2%	Xp22.2	Complejo FA core
FANCC	~10%	9q22.32	Complejo FA core
FANCD1/BRCA2	~2%	13q13.1	Recombinación homologa
FANCD2	~3%	3q25.3	Sustrato del complejo FA core, Actividad exonucleasa
FANCE	~2%	6p21.31	Interactúa con FANCD2
FANCF	~2%	11p14.3	Complejo FA core
FANCG/XRCC9	~10%	9p13.13	Complejo FA core
FANCI	<2%	15q26.1	Sustrato del complejo FA core
FANCI/ BRIP1/BACH1	<2%	17q23.2	Resolución de estructuras G cuádruplex
FANCL	Raro	2p16.1	Complejo FA core/ Ligasa E3 de ubiquitinas
FANCN PALB2	Raro	16p12.2	Recombinación homologa
FANCM	Raro	14q21.2	Complejo FA core Helicasa/Translocasa
FANCO/RAD51C	Raro	17q22	Recombinación homóloga/ parólogo de RAD51
FANCP/SLX4	Raro	16p13.3	Resolvasa de intermediarios de Holliday.

Modificada desde: (Kee & Andrea 2010; D'Andrea 2010)

## 1.2 Características clínicas

La AF fue descrita por primera vez por el pediatra suizo Guido Fanconi en 1927. Es una enfermedad con manifestaciones clínicas muy variables y aun que se asocia a la presencia de malformaciones congénitas múltiples (Tabla 2), se estima que del 25% al 40% de los pacientes con AF son fenotípicamente normales (Kottemann & Smogorzewska 2013). Los pacientes con AF frecuentemente tienen alteraciones en parametros de crecimiento, con estatura, peso o perimetro cefalico por debajo de la percentila 5, y aproximadamente el 73% de ellos sufren deficiencias endócrinas entre las que se pueden incluir: hipofuncion de la pituitaria, hipogonadismo, deficiencias en la hormona del crecimiento, disfuncion tiroidea e hipoinsulinemia o resistecia a la insulina con intolerancia a la glucosa (Kottemann & Smogorzewska 2013; Kee & D'Andrea 2012).

Tabla 2. Malformaciones congénitas más frecuentes en la AF.

Órgano o sistema	Malformaciones congénitas
<b>Piel</b>	Hiperpigmentación generalizada; manchas café con leche
<b>Extremidades</b>	<b>Pulgares</b> : Ausentes o hipoplasicos , bifidos, trifalangicos
	<b>Superiores</b> <b>Radios</b> : Ausentes o hipoplasicos <b>Manos</b> : Primer metacarpo ausente <b>Cubito</b> : Displastico
	<b>Inferiores</b> <b>Pies</b> : Sindáctila, dedos anormales <b>Piernas</b> : Dislocación congénita de cadera
	<b>Hombres</b> Hipogenitalismo, criptorquidia, hipospadias, microfalosomia
<b>Gónadas</b>	<b>Mujeres</b> Hipogenitalismo, útero dividido
<b>Esqueleto</b>	<b>Cabeza</b> Microcefalia, micrognatia, trigonocefalia <b>Espina dorsal</b> Espina bifida, costillas anormales
<b>Renales</b>	Ectópicos o pélvicos, de herradura, hipoplasicos o displasicos, ausentes, hidronefrosis o hidroureter
<b>Tracto gastrointestinal</b>	Atresia, ano impeforado, fistula traqueo-esofágica
<b>Cardiopulmonar</b>	Diferentes defectos estructurales

La relación entre la AF y la predisposición a cáncer ha sido bien establecida (Tabla 3), y se estima que hasta el 25% de los pacientes con AF desarrollarán tumores malignos especialmente leucemia mieloide aguda (LMA), o carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) (Auerbach 2010). Las alteraciones hematológicas son la manifestación patológica más prevalente en la AF y se estima que entre el 75-90% de los individuos con AF desarrollarán falla medular durante la primera década de su vida (Kee & D'Andrea 2012).

Tabla 3 Genes AF que confieren susceptibilidad a cáncer

Gen mutado	Tipo de cancer
FANCA,FANCB, FANCC,FANCD2, FANCE,FANCF, FANCG,FANCI, FANCL,FANCM	AML, HNSCC, cánceres de esófago,ginecológicos e hígado
FANCD1/BRCA2	AML,ALL,Meduloblastoma, neuroblastoma, tumor de Wilms. <i>Cancer de mama, ovario y prostata</i>
FANCI/BRIP1	AML,HNSCC. <i>Cancer de mama y ovario</i>
FANCN/PALB2	AML, Meduloblastoma,Neuroblastoma, Tumor de Wilms, Hemangioendotelioma
FANCO/RAD51C	<i>Cancer de mama y ovario</i>
FANCP/SLX4	HNSCC

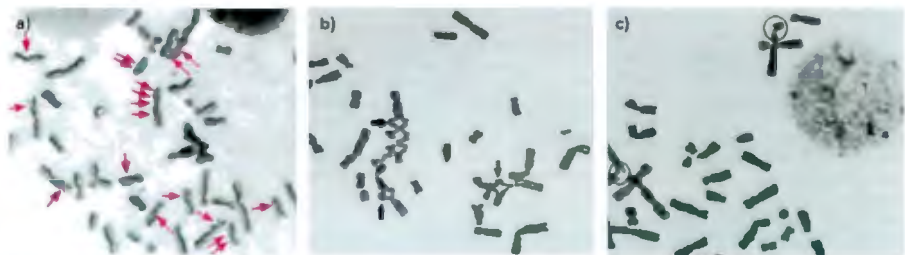
*Itálicas: Suceptibilidad a cancer en portadores. Abreviaturas: ALL-Leucemia linfoblástica Aguda, AML-Leucemia Mieloide Aguda, HNSCC- Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Auerbach 2010)*

### 1.3 Fenotipo celular en AF

La hipersensibilidad a agentes inductores de ICL's en células derivadas de pacientes con AF está asociada a un incremento moderado en el número de intercambios de cromátides hermanas (ICH's)(Thompson & Hinz 2009), un incremento marcado en la frecuencia de rompimientos cromatídicos y a la presencia de figuras radiales de intercambio cromosómico (Figura 1) (Oostra et al. 2012; Kim & D'Andrea 2012).

Los puntos de monitoreo de la integridad del DNA, incluyendo la vía p53, son funcionalmente activos (8), por lo que las células AF muestran un arresto prolongado en la fase G2/S tardía, como consecuencia de la presencia de daño pos-replicativo no reparado, y presentan un fenotipo celular pro-apotótico con disminución en la supervivencia y tasa de proliferación celular (D'Andrea 2010; Moldovan & D'Andrea 2009; Hanlon et al. 2008).

Las células AF, además, muestran un acortamiento acelerado de telómeros e hipersensibilidad a especies reactivas de oxígeno (ROS)(Thompson & Hinz 2009).



**Figura 1** Aberraciones cromosómicas e ICH's en células AF. a) Intercambio de cromátides hermanas (ICH's) en líneas celulares AF tratadas con MMC (10ng/ml), señaladas con flechas violetas b) figuras de intercambio radial, señaladas con flechas negras, c) Rupturas cromatídicas (Imagen modificada de Auerbach, 1993).

Actualmente se sugiere que la intolerancia de las células hematopoyéticas AF de lidiar con el estrés oxidativo aunado a la expresión excesiva de citocinas mielosupresoras como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) o el interferón gama ( $INF\gamma$ ), podrían estar involucrados en el desarrollo de la falla progresiva de medula ósea en los pacientes con AF (Nalepa & Clapp 2014).

#### 1.4 Funcionamiento de la vía FA/BRCA

La vía FA/BRCA es una red de señalización compleja encargada de coordinar diferentes vías clásicas de reparación (NER, TLS y HR), para la eliminación eficiente de ICL's (Figura 3)(Moldovan & D'Andrea 2009; Kim & D'Andrea 2012). La presencia de un ICL durante la fase S obliga al arresto de la horquilla de replicación, y conduce a la activación de una cascada de eventos de señalización necesarios para la reparación del daño (Kottemann & Smogorzewska 2013; Kaddar & Carreau 2012).

La activación de la vía FA/BRCA depende del reconocimiento del ICL y de la activación del *checkpoint* ATR-CHK1, por el complejo FANCM-FAAP24. La actividad translocasa de FANCM estabiliza las horquillas de replicación arrestadas y facilita el reclutamiento del complejo central de AF (FAcore), que a su vez monoubiquitina al heterodímero FANCD2-FANCI (Complejo ID) (Nalepa & Clapp 2014).

La activación del *checkpoint* ATR-CHK1 evita la progresión del ciclo celular a través de la degradación de CDC25A e inhibición de CDK2, y media la fosforilación de numerosos componentes de la vía FA/BRCA (Figura 2). Estas modificaciones postraduccionales son esenciales para la monoubiquitinización de complejo ID y a su vez promueven el ensamblaje del complejo FAcore (Kee & Andrea 2010; Moldovan & D'Andrea 2009).

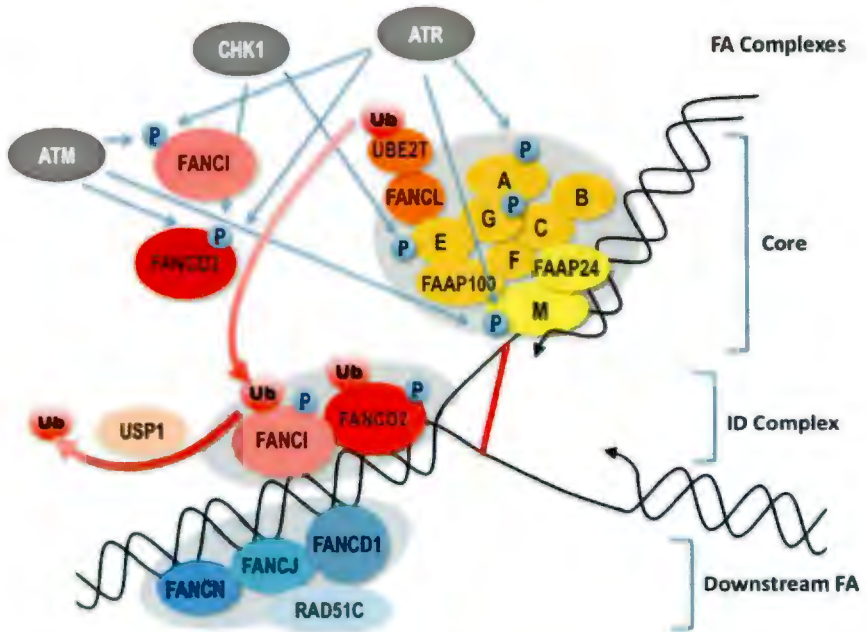


Figura 2. La vía FA/BRCA. Subcomplejos y modificaciones postraduccionales de las proteínas FANCI en respuesta a los ICLs (Imagen tomada de Wang & Gautier, 2011).

El complejo ID ubiquitinizado sirve como señal para el reclutamiento y regulación de múltiples endonucleasas (XPF-ERCC1, MUS81-EME1, SLX1 y FAN1) que cortan una misma hebra del DNA en ambos lados del ICL (Figura 3D) generando dos intermediarios de reparación: un DSB y un ADD.

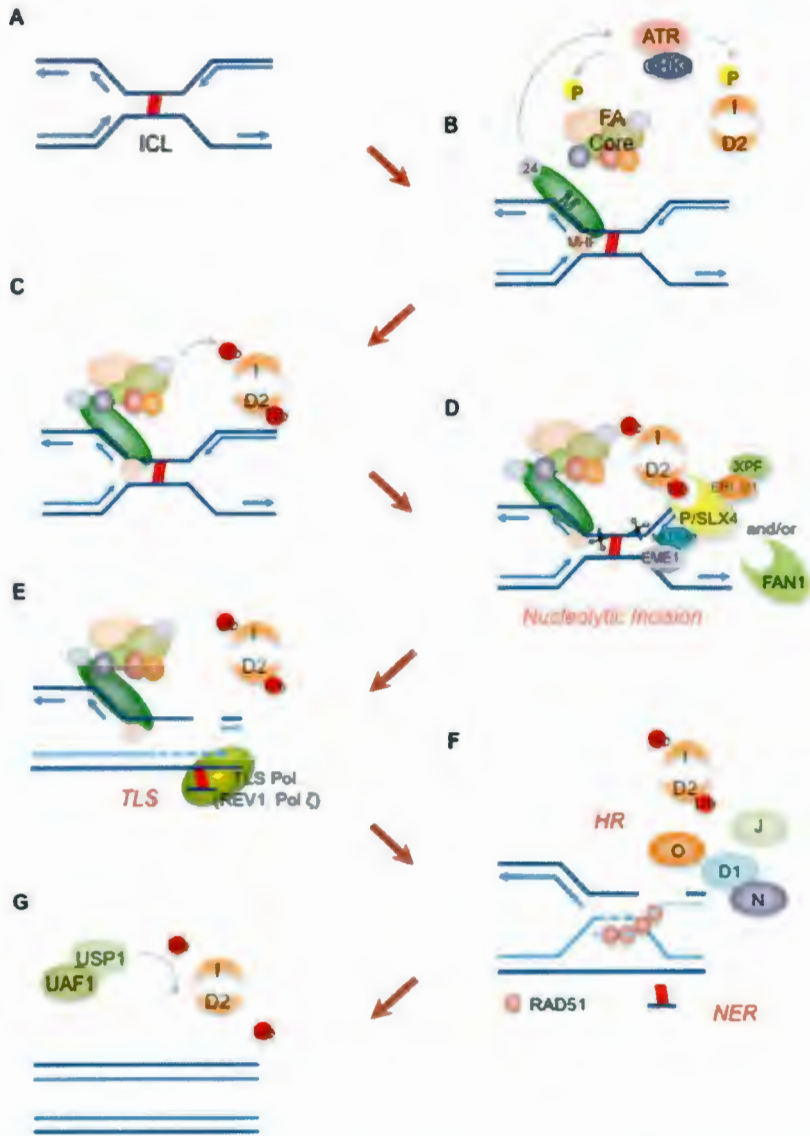
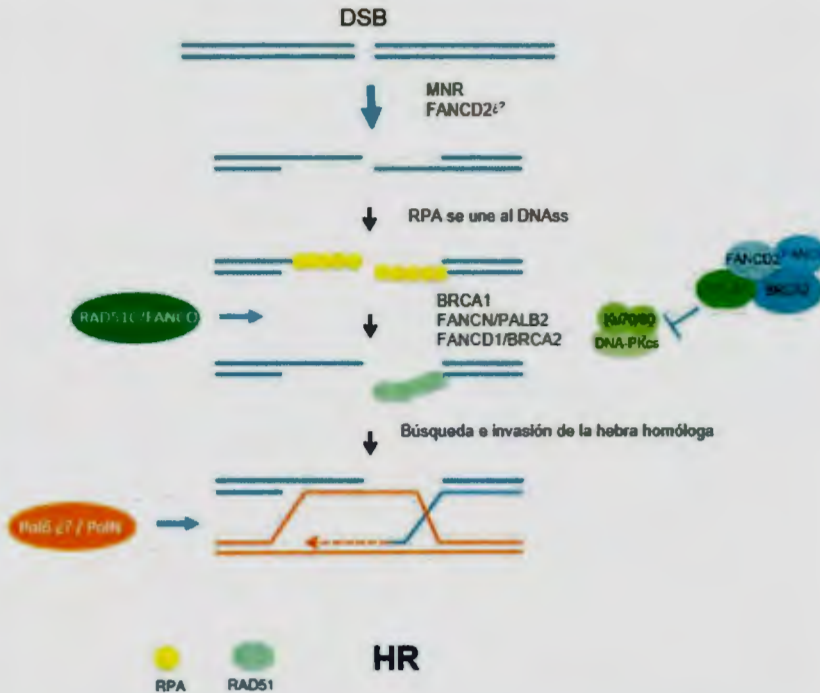


Figura 3. La vía FA/BRCA. Modelo especulativo para el uso coordinado de las múltiples vías de reparación utilizadas en el procesamiento de los ICLs (Imagen tomada de Kim & D'Andrea, 2012)





**Figura 4. La reparación por recombinación homóloga.** El complejo ID monoubiquitinizado media el reclutamiento de factores de reparación involucrados en la HR. La reparación del DSB inicia con la resección de los extremos en dirección 5' 3' para generar dos DNAs a los cuales se une la proteína RPA quien favorece su estabilización y los protege de la degradación. La proteína FANCD1 interactúa con BRCA1 y su actividad 5' 3' helicasa facilita el reclutamiento de BRCA1. FANCN, FANCD1 y FANCO quienes median el intercambio de RPA por RAD51. RAD51 permite que el ssDNA busque e invada la hebra recién sintetizada por la polimerasa de TLS que sirve como templado para la síntesis del DNA. El último paso en la reparación del DSB libre de error es la resolución de los intermediarios de recombinación por el complejo FANCP/FANCO/SLX4 (Imagen modificada de Kee & Andrea, 2010)

La resección del ICL permite que el replisoma sobrepase el ADD por medio de una polimerasa de síntesis translesión (TLS) asegurando así la replicación completa del DNA (Figura 3E). Esta hebra recién sintetizada es utilizada posteriormente en la reparación del DSB por un mecanismo conocido como reparación por recombinación homóloga (RRH) (Figura 4), mientras que, el ADD, es reparado por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Figura 3F) (Kim & D'Andrea 2012).

Finalmente y una vez que el ICL ha sido reparado, el complejo ID es desubiquitinizado por la proteína USP1 (Figura 3G) (Kim & D'Andrea 2012; Cohn & D'Andrea 2013) y el proceso conocido como *checkpoint recovery* permite la progresión del ciclo celular (Rodríguez et al. 2012).

Se ha propuesto que la vía FA/BRCA mantiene la estabilidad genómica facilitando la reparación mediada por HR, sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados siguen siendo poco claros. La evidencia sugiere que la monoubiquitinización del complejo ID es el evento regulatorio crítico en la reparación del DSB, dado que media el reclutamiento de factores de reparación involucrados en la HR como BRCA1, FANCN/PALB2, FANCD1, FANCI/BRIP1, y el complejo RAD51 en el sitio del daño (Kee & Andrea 2010). Por otro lado, se ha observado que FANCD2 posee actividad de exonucleasa en dirección 5'-3' y que podría modificar directamente los extremos del DSB y bloquear de manera directa mecanismos alternos de reparación (Pace 2010).

## **1.5 Vías alternas de reparación de enlaces covalentes cruzados**

Aunque las células AF no son eficientes en la reparación de DSBs, tal parece que sí lo son en el procesamiento inicial de los ICLs, esto indica que pueden existir mecanismos alternos de procesamiento inicial de ICLs e incluso de DSBs por vías alternas de reparación.

Rothfuss y Grompe (2004) reportaron que las células AF-C son capaces de procesar de manera inicial los ICL's, y se ha sugerido que la generación de un DSB durante la reparación de un ICL se asegura mediante la actividad de endonucleasas alternas a la vía FA/BRCA (Rodríguez et al. 2012).

La generación de un DSB como intermediario en la reparación permitiría a la célula AF reconocer el daño y activar una cascada de eventos de señalización para su reparación. El reconocimiento del DSB depende del complejo MNR (MRE11/Rad50/NBS1), el cual promueve el reclutamiento y activación de la proteína ATM (Cohn & D'Andrea 2013).

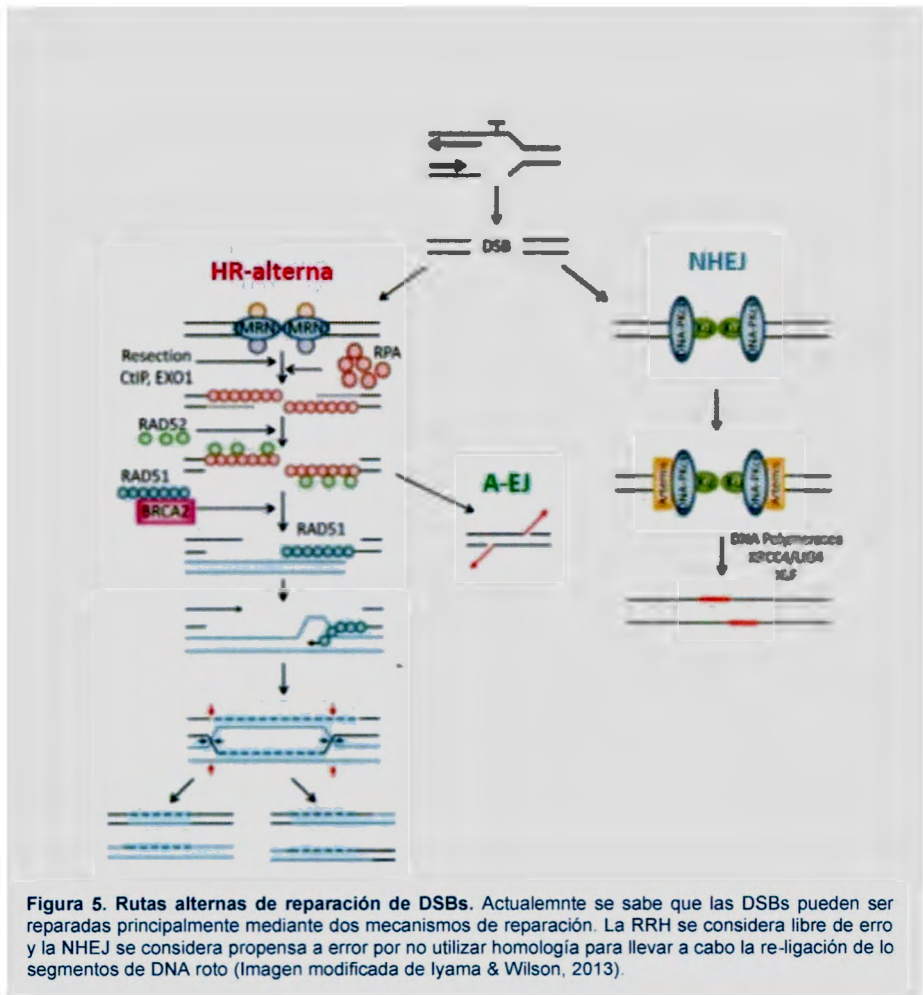
ATM media la fosforilación de una amplia red de proteínas incluyendo CHK1, CHK2, p53, BRCA1, RAD50 y RAD51 evitando la progresión del ciclo celular y favoreciendo la reparación del DNA.

En ausencia de una vía FA/BRCA funcional, como es el caso de las células AF, las DSBs generadas por el procesamiento inicial de los ICL's podrían ser reparadas por tres vías distintas: a) unión de extremos no homólogos (NHEJ), b) la recombinación homóloga alterna (HR-alterna) o c) la unión de extremos alternativa (A-EJ).

### **1.5.1 Unión de extremos no homólogos NHEJ**

NHEJ es un mecanismo de reparación propenso a error en el que se lleva a cabo la ligación directa de dos extremos de DNA sin necesidad de recombinación u homología (Lai et al. 2013; Iyama & Wilson 2013).

La reparación de un DSB por NHEJ inicia con el reconocimiento de los extremos de DNA por el heterodímero KU70/KU80, esto sirve de señal para el reclutamiento de la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs) (Bennardo et al. 2008). DNA-PKcs se une a KU70/KU80 y regula la actividad de múltiples proteínas entre ellas Artemisa, PNK y la transferasa TTD involucradas en el procesamiento pre-ligación, que permite el alineamiento de los dos extremos de DNA para la ligación de los mismos por el complejo Ligasa/XRCC4/XLF (Bunting & Nussenzweig 2013).



Datos recientes han demostrado que la reparación por HR en las células AF está sustancialmente comprometida (Kim & D'Andrea 2012) y que las células AF usan preferencialmente la NHEJ para reparar el daño en el DNA (Nalepa & Clapp 2014), por lo que las células AF exhiben altas tasas de microdeleciones e inserciones consistentes con un estado de hiperactivación de este mecanismo de reparación propenso a error (Moldovan & D'Andrea 2009). Por lo tanto se ha sugerido que la pérdida de la vía FA/BRCA no solo evita el reclutamiento de

factores supresores de la NHEJ como PARP-1 y RAD18 sino que además permite el reclutamiento de factores de reparación de la NHEJ, como DNA-PKcs en los sitios de daño (Kee & Andrea 2010; Pace 2010).

Se ha especulado que esta hiperactivación de la reparación por NHEJ en ausencia de una vía FA/BRCA funcional podría ser la causa subyacente a las aberraciones cromosómicas de tipo de intercambio observadas en las células AF, sin embargo existe evidencia contradictoria al respecto ya que no se sabe si la formación de las figuras radiales podría ser dependiente de mecanismos de reparación por HR no alélica (Hanlon et al. 2008; Kottemann 2013).

### **1.5.2 Recombinación homóloga HR-alterna**

Se ha demostrado que las células AF con mutaciones en los componentes río arriba de la vía FA/BRCA, muestran un incremento moderado en el número de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) después de ser tratadas con MMC (a excepción de las células deficientes en FANCC) (Thompson & Hinz 2009), estos resultados sugieren que las células AF tienen la capacidad de mediar el reclutamiento de factores de reparación involucrados en la HR de manera independiente de la presencia de complejo ID monoubiquitinizado es decir de manera alterna a la vía FA/BRCA .

Se ha propuesto, que la HRR independiente de la vía FA/BRCA está regulada por el complejo MRN (Rodríguez et al. 2012), que en presencia de la proteína CtIP media la resección inicial de los extremos del DSB (Iyama & Wilson 2013). La resección nucleotídica en dirección 5'- 3' crea un extremo de ssDNA 3' libre, el cual es estabilizado por la unión de la proteína de replicación A (RPA). RAD52 promueve el remplazamiento de RPA por RAD51 de manera dependiente de BRCA2 para dar lugar al complejo ssDNA-Rad 51, el cual permite que el ssDNA reconozca e invada una hebra homóloga intacta, dando como resultado la formación de un D-loop, que tras la síntesis y resolución de los intermediarios

de la recombinación permite mantener la fidelidad de la replicación tras la reparación del DSB (Iyama & Wilson 2013).

Evidentemente las células con mutaciones en los componentes río abajo de la vía FA/BRCA (RAD51 y FANCD1/BRCA2) no son capaces de generar ICHs, debido a que en ellas se encuentran mutados elementos centrales para la HRR, por lo que mecanismos propensos a error como la vía de reparación por NHEJ (canónica y alterna) podrían ser los únicos mecanismos celulares con los que cuenta la célula para la reparación de las DSBs. Probablemente relacionado con esto, los pacientes AF con mutaciones en los componentes río abajo de la vía FA/BRCA evidencian fenotipos más graves con una mayor prevalencia de cáncer (Kottemann & Smogorzewska 2013). Esto sugiere que la activación de esta vía alterna de HRR, podría ser esencial en el mantenimiento de la estabilidad genómica en las células AF.

### **1.5.3 Unión de extremos alternativa A-EJ**

La unión de extremos alternativa (A-EJ) es un mecanismo mediado por microhomología independiente de DNA-PKcs, en el cual el procesamiento preligación involucra la resección de los extremos del DNA por el complejo MRN/CtIP hasta localizar secuencias de microhomología (4-6 nucleótidos) en ambos extremos de la ruptura, para posteriormente ser ligados por el complejo PARP1/Ligasa I/Ligasa III (Bunting & Nussenzweig 2013; Lieber 2010). Recientemente se ha demostrado que no existe una disminución en la reparación por A-EJ después de la inhibición de MRE11 o CtIP y que la presencia de KU70 es capaz de suprimir esta vía de reparación (Bunting & Nussenzweig 2010). Por lo que se ha sugerido que la A-EJ es un mecanismo de respaldo en ausencia de la reparación por NHEJ, y que juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

## **1.6 Vía alterna de reparación de enlaces covalentes cruzados acoplada a transcripción**

Se ha demostrado que el reconocimiento y reparación de los ICL's se realiza principalmente durante la fase S del ciclo celular (Thompson & Hinz 2009), sin embargo se ha descrito la existencia de una vía secundaria de reparación de ICLs independiente de la replicación (Moldovan & D'Andrea 2009) La activación de esta vía, depende del reconocimiento del ICL por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos acoplado a transcripción (NER-TCR). Este mecanismo alternativo de reparación de ICL's involucra la acción de una endonucleasa alterna a la de la vía FA/BRCA (probablemente SNM1) que corta en una hebra del DNA en ambos lados del ICL generando un ADD, el cual es sobrepasado por medio de una polimerasa de TLS para la reparación de una de las hebras, mientras que la reparación de la hebra complementaria se lleva a cabo posteriormente cuando el ADD es eliminado mediante una segunda ronda de incisión y síntesis. Se ha sugerido que esta vía alterna de reparación dependiente de la transcripción podría ser un mecanismo importante de tolerancia al daño en las células AF (Moldovan & D'Andrea 2009; Thompson & Hinz 2009)

## **2. Antecedentes directos**

Pace et al. (2010), y Bunting et al. (2010) demostraron de manera independiente que la inhibición de la proteína KU70 suprime la hipersensibilidad de las células AF (células de pollo con fenotipo FANCC) a agentes inductores de ICL's. Estos datos sugieren que la vía de reparación por NHEJ tiene un efecto nocivo en ausencia de una vía FA/BRCA funcional y que los defectos en la reparación de ICL's en las células AF podrían ser consecuencia de la inhibición de mecanismos de HRR por la unión de KU70 al DSB. Estos resultados son

consistentes con el hecho de que la inhibición de proteínas río abajo de KU70 en la NHEJ no restauran el fenotipo normal de las células AF. Sin embargo se han demostrado resultados contradictorios al respecto (Tabla 4).

Adamo y colaboradores probaron que células humanas deficientes de DNA-PKcs con fenotipo AF-D2-*like* exhiben niveles de sobrevida similares a las células *wild type* (células no deficientes en DNAPKcs ni FANCD2) posterior al tratamiento con MMC. Adamo et al. validaron estos resultados haciendo uso de NU7026 un inhibidor específico de la cinasa DNA-PKcs en fibroblastos derivados de ratones *Knockout* FANCA<sup>-/-</sup> y FANCC<sup>-/-</sup>, y concluyeron que la inhibición de DNA-PKcs suprime sustancialmente los defectos en la reparación de ICL's en las células AF.

Bunting et al. señaló que las discordancias en estos resultados podrían ser consecuencia de diferencias entre las células humanas y las células de pollo, sin embargo no existen reportes posteriores que demuestren que la inhibición de la proteína DNAPKcs es capaz de restablecer el fenotipo de células AF a un fenotipo normal.

Tabla 4. Consecuencias de la inhibición de la NHEJ en células AF.

Mutación/ depleción	NHEJ inhibido	Restaura el fenotipo		Referencia
		Si	No	
BRCA1	53BP1	X <sup>a</sup>		(Bunting et al. 2012)
	Ligasa IV		X <sup>b</sup>	
FANCD2	Ligasa IV	X <sup>a</sup>		(Adamo et al. 2010)
FANCD2 <i>like</i>	DNA-PKcs	X <sup>a</sup>		
	Ku80	X <sup>a</sup>		
FANCA <i>like</i>	DNA- PKcs	X <sup>a</sup>		
FANCC <i>like</i>	KU70	X <sup>a</sup>		(Pace 2010)
	DNA-PKcs		X <sup>b/ac</sup>	
	Ligasa IV		X <sup>b/ac</sup>	
FANCC	KU70	X <sup>b/ac</sup>		(Bunting & Nussenzweig 2010)
	DNA- PKC		X <sup>b/ac</sup>	
	Ligasa IV		X <sup>b/ac</sup>	

X<sup>a</sup>: Porcentajes de sobrevida similares a las células WT. X<sup>b/ac</sup> porcentajes de sobrevida similares a las células WT y una disminución en la frecuencia de AC.



### 3. Justificación

La AF ha ganado relevancia como un modelo para investigar los mecanismos de reparación del DNA por medio de los cuales una célula puede enfrentar el daño generado por los ICLs.

Una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo de trabajo es determinar cómo es que las células con deficiencias en la vía FA/BRCA hacen uso de vías alternas de reparación de ICL's. Actualmente existen datos que sugieren que la inhibición de la reparación por NHEJ es capaz de rescatar el fenotipo de las células AF, sin embargo, no existen estudios que muestren si la inhibición de proteínas río abajo de KU70, como DNA-PKcs es capaz de restaurar el fenotipo reparador en las células AF. Determinar el efecto que tiene en las células AF la inhibición de la cinasa DNA-PKcs, nos permitirá establecer conceptos básicos sobre la relación entre la NHEJ y la vía FA/BRCA en la reparación de ICL's.

#### **4. Hipótesis**

Si las células AF-A son dependientes de la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) para reparar ICL's, entonces la inhibición química de la cinasa DNA-PKcs modificará los patrones de reparación del DNA en células AF expuestas a MMC se encontrara un numero menor de aberraciones cromosomicas.

#### **5. Objetivo**

Evaluar el efecto citogenético del inhibidor específico de la cinasa DNA-PKcs NU7026 en células AF-A.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Se emplearon las líneas celulares linfoblastoides de linaje B: FA-A (VU817) y normal 53 (NL-53). Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con: 10% v/v de suero fetal bovino inactivado y 1% v/v de: piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y L-Glutamina 200 mM; y 0.5% v/v de gentamicina (10ng/ml) y se mantuvieron a 37 °C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **6.2 Inhibición de la cinasa DNA- PKcs**

En este estudio, se utilizó NU7026 (SIGMA® CAS: 154447-35-5), como inhibidor ATP-competitivo de la proteína DNA-PKcs.

Para determinar la concentración de trabajo se comparó la frecuencia de AC y el porcentaje de sobrevivida de las líneas celulares VU817 y NL53 después de ser sometidas a las siguientes condiciones experimentales (Figura 6):

- a) Células tratadas durante 18 horas a concentraciones variables de NU7026 [10 μM], [20μM], [50μM] y [100μM]
- b) Células tratadas durante 24 horas con MMC [10 ng/ml] y 18 horas a concentraciones variables de NU7026 [10 μM], [20μM], [50μM] y [100μM]
- c) Células tratadas durante 24 horas con MMC [10 ng/ml] y 18 horas con NU7026, 24, 48 y 72hrs antes de la cosecha.

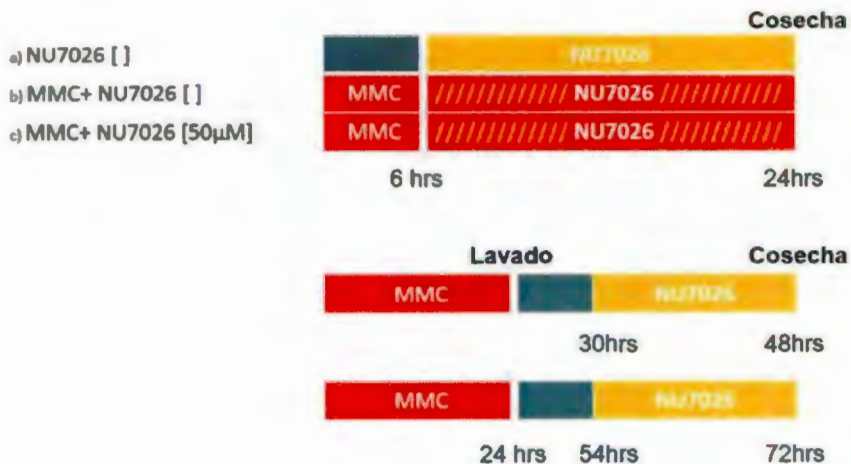


Figura 6. Diseño experimental. Para determinar la concentración de trabajo del inhibidor NU7026

### 6.3 Diseño experimental

Los experimentos se realizaron por triplicado en cultivos celulares con una densidad de 300,000 células por mL y una viabilidad celular igual o mayor al 95%. El inhibidor NU7026 se utilizó a una concentración final de 50µM y se empleó MMC como agente inductor de ICL's, a una concentración final de 10 ng/ml.

En cada ensayo se estableció un cultivo control sin tratamiento, y un cultivo experimental con MMC. Los tratamientos experimentales se realizaron de acuerdo a la figura 7 donde:

- Células tratadas durante 24 horas con MMC y durante 18 horas con NU7026.
- Células tratadas durante 18 horas con NU7026.
- Células tratadas durante 24 horas solo con MMC

d) Células sin tratamiento

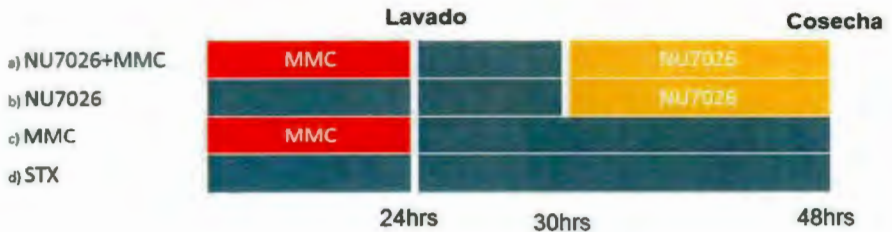


Figura 7 Diseño experimental para la inhibición de la cinasa DNA-PKCs

### 6.3 Cosecha y obtención de metafases

48 horas después de la siembra, se adicionó a los cultivos, colchicina a una concentración final de 0.2  $\mu\text{M}$ , el botón se incubó en solución hipotónica (KCl 0.075 M) y las células fueron fijadas con solución de Carnoy (metanol/ácido acético 3:1).

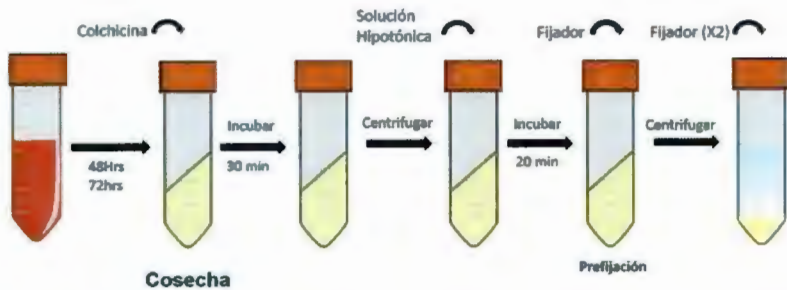


Figura 8. Obtención de células en metafase. Cosecha de las líneas celulares linfoblastoides para la obtención de metafases

## 6.4 Evaluación citogenética

El botón obtenido tras la cosecha se empleó para la elaboración de preparaciones cromosómicas que fueron teñidas con los colorantes de Wrigth y Giemsa. Se analizaron 25 metafases por cultivo celular y se realizó el análisis cuantitativo y cualitativo de las AC que fueron clasificadas como: gaps, rompimientos cromatídicos, rompimientos cromosómicos, fragmentos céntricos, fragmentos acéntricos, trirradios, tetrarradios y otras figuras entre las que se incluyeron anillos y cromosomas dicéntricos.



**Figura 9. Aberraciones cromosómicas típicas de la AF.** Ejemplos de aberraciones cromosómicas observadas en el análisis de rompimientos cromosómicos inducidos por MMC en células AF. a) gap, b) ruptura cromatídica, c) trirradio, d) tetrarradio, e) otras figuras de intercambio radial (Imagen tomada de Oostra et al. 2012).

## 6.5 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se realizó un análisis de varianza ANOVA y se determinó si existía una diferencia significativa si  $p > 0.05$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Análisis de sobrevivida a concentraciones variables de NU7026

Haciendo uso de un método de tinción por exclusión, se realizó el conteo de viabilidad celular con azul de tripano en las líneas celulares normal y AF, siendo las condiciones experimentales las siguientes: células sin tratamiento, células tratadas con MMC, células tratadas con NU7026 a cuatro diferentes concentraciones: 10, 20, 50 y 100 $\mu$ M y células con el tratamiento conjunto MMC y NU7026.

En la figura 10a podemos observar que en ambas líneas celulares el porcentaje de sobrevivencia disminuye conforme aumenta la concentración del inhibidor NU7026, y a partir de una concentración de 50 $\mu$ M observamos que la sobrevivencia de las células AF se afecta mas en comparación con las células normales.

En el tratamiento conjunto de MMC (10ng/ml por 24hrs) y NU7026 a 10, 20, 50 y 100 $\mu$ M (Figura 10b), se observa que la viabilidad en las células AF disminuye, sin embargo, en la concentración más elevada de NU7026 el efecto se invierte y las células AF recuperan viabilidad, contrario a lo observado en las células normales.

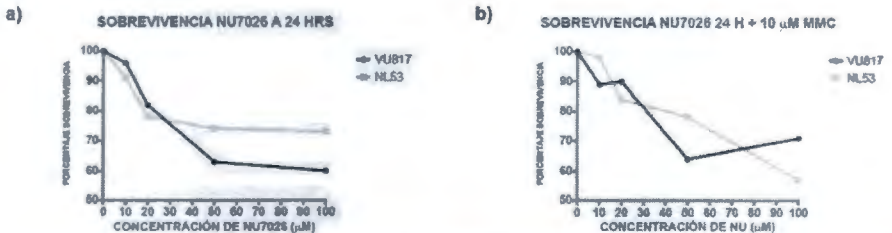


Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia a concentraciones variables de NU7026 y al tratamiento conjunto MMC + NU7026

## **7.2 Análisis de aberraciones cromosómicas a concentraciones variables de NU7026**

Posterior a las cosecha de 24 horas se analizaron 25 metafases por cultivo experimental y se realizó el análisis cuantitativo y cualitativo de las AC. En la figura 11 se puede observar el número de AC por célula en el tratamiento con NU7026 a concentraciones variables (10, 20 y 50 $\mu$ M) y en el tratamiento conjunto con MMC.

A pesar de que en las células AF se observó una recuperación en la viabilidad celular tras el uso del inhibidor NU7026 a una concentración de 100  $\mu$ M en el tratamiento conjunto con MMC (ver figura10), no se obtuvieron metafases en ninguna de las dos líneas celulares, impidiendo la realización del estudio citogenético.

En la línea celular normal el número de AC por célula aumenta en el tratamiento conjunto de MMC y NU7026 50 $\mu$ M en comparación al control tratado solo con MMC, mientras que en las células AF no existe diferencias importantes entre la frecuencia de AC en las células tratadas con NU7026 50 $\mu$ M y la frecuencia de AC en el control con MMC; además, la frecuencia de las AC por célula en tratamiento conjunto MMC + NU7026 50 $\mu$ M es mayor en comparación al control con MMC.



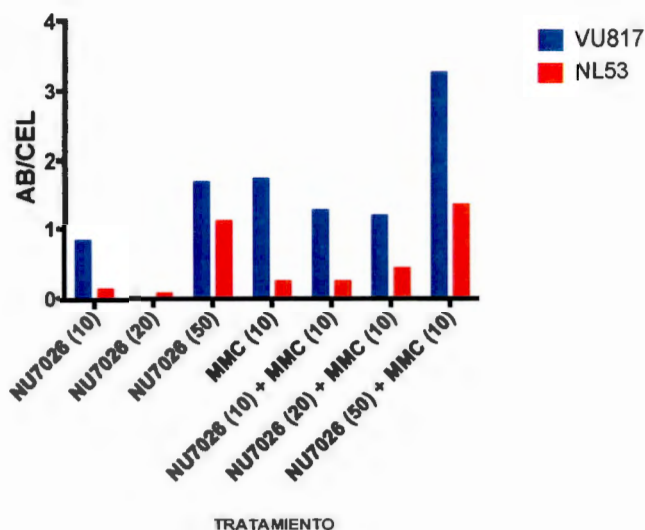


Figura 11. Frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula a concentraciones variables de NU7026, y en el doble tratamiento con MMC. Las concentraciones de NU7026 están indicadas entre paréntesis. La concentración usada de MMC fue de 10ng/ml.

### 7.3 Ensayo de sobrevivencia al uso de NU7026 a 6, 30 y 54 horas posterior al tratamiento con MMC

Experimentalmente se decidió hacer uso del inhibidor NU7026 18 horas antes de la cosecha, debido a que de esta manera la inhibición química de la proteína DNA-PKcs se realizaría principalmente durante las fases S y G2 del ciclo celular. Sin embargo, la siguiente etapa experimental consistió en determinar si existía una diferencia en tratar a las células con NU7026 a 6, 30 o 54 horas posteriores al tratamiento con MMC, es decir a cosechas de 24, 48 y 72 horas respectivamente.

En la línea celular AF el menor porcentaje de sobrevivencia se observa tras el uso de NU7026, 54 horas posteriores al tratamiento por 24 horas con MMC, mientras que en las células normales hay un incremento en la sobrevivencia (Figura 12).

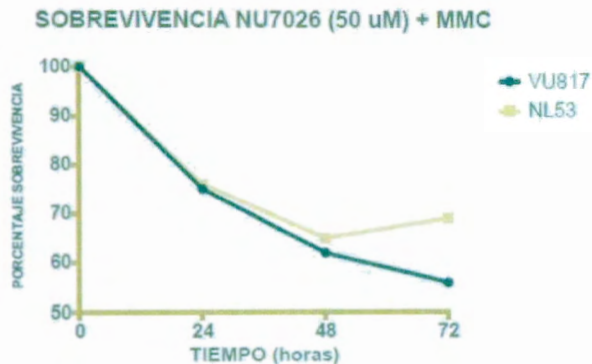


Figura 12. Porcentaje de sobrevivencia con 50 $\mu$ M NU7026 + 10ng/ml MMC a tiempos de cosecha variables

#### 7.4 Análisis de aberraciones cromosómicas a 24, 48 y 72 horas

En la figura 13 se puede observar que la estabilidad genómica es esencial en el mantenimiento de la sobrevivencia por lo que número de aberraciones por célula aumenta conforme la sobrevivencia disminuye.

En las células normales el uso de NU7026, 54 horas posteriores al tratamiento con MMC, es decir, a cosechas de 72 horas, se observa una disminución en la frecuencia de AC por célula que es consistente con el aumento en la sobrevivencia observado anteriormente, mientras que en la línea celular AF se observa el efecto contrario (Figura 13).

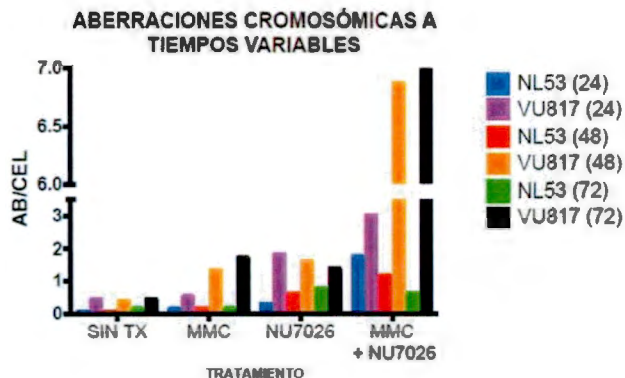


Figura 13 Frecuencia de aberraciones por célula con tratamiento de NU7026 50 $\mu$ M a tiempos de cosecha variables

En la figura 13, se puede observar que en las células normales responden al tratamiento con el inhibidor NU7026, con un incremento en la frecuencia de AC por célula, que es inclusive mayor al del control positivo tratado solo con MMC. La línea celular AF presenta una frecuencia de AC similar al del tratamiento con MMC.

Por otro lado, en las células normales, la frecuencia de AC en el tratamiento conjunto NU7026 y MMC es menor conforme aumenta el tiempo entre el tratamiento con MMC y el uso del inhibidor NU7026, mientras que en la línea celular AF hay un incremento en la frecuencia de AC en el tratamiento CON NU7026 a 30 y 54 horas posteriores al tratamiento con MMC (cosechas de 48 y 72 horas).

## **7.5 Evaluación citogenética del uso de NU7026 50 $\mu$ M, 30 horas posteriores al tratamiento con MMC**

Con base a los resultados anteriores, se decidió realizar por triplicado la evaluación citogenética del uso de NU7026, 30 horas posteriores al tratamiento con MMC es decir en cosechas de 48hrs, a una concentración final de 50 $\mu$ M. El análisis citogenético reveló que las células normales expuestas a NU7026 muestran una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula (Figura 14a) y un mayor porcentaje de células multiaberrantes (Figura 14b) en comparación a las células sin tratamiento o expuestas a MMC, y que el número de células multiaberrantes en el tratamiento conjunto MMC y NU7026 en la línea celular normal es mayor al porcentaje de células multiaberrantes observadas en cualquier otra condición experimental (sin tratamiento, MMC o NU7026). Sin embargo a pesar del incremento en el porcentaje de AC, no se observaron figuras de intercambio radial en las células normales cuando fueron tratadas con MMC y NU7026 (Figura 14c) por lo que el aumento en la frecuencia de AC ocurre a expensas de un aumento en la frecuencia de las rupturas cromatídicas, que representan DSBs sin reparar ya sea por HR o NHEJ.

Las figuras 14a y 14b muestran que las células AF presentan un incremento marcado en la frecuencia AC y un aumento en el número de células multiaberrantes tras la exposición a MMC, también podemos observar que no existen diferencias importantes en el número de figuras radiales en el tratamiento conjunto de MMC + NU7026 en comparación al control tratado solo con MMC (Figura 14c), por lo que de manera similar a lo observado en las células normales el aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas observado en las células AF ocurre a expensas de un aumento en la frecuencia de rupturas cromatídicas, lo que sugiere que el mecanismo de formación de figuras radiales no se afecta por la inhibición química de la actividad cinasa de la proteína DNA-PKcs.

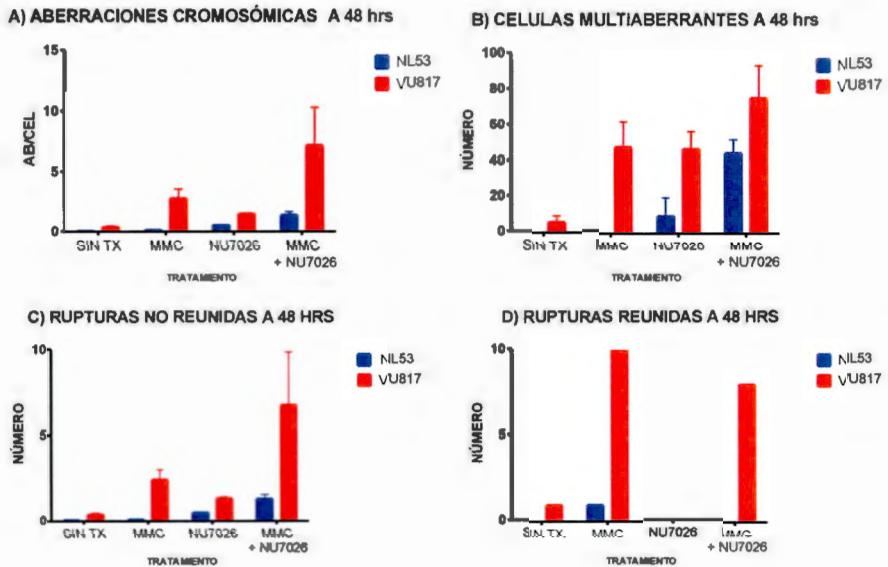


Figura 14 Frecuencia de aberraciones cromosómicas.

## 8. Discusión

La AF es un síndrome de inestabilidad cromosómica causado por mutaciones bialélicas en genes que forman parte de la vía FA/BRCA, la cual está especializada en la reparación de los ICLs presentes en el DNA. Una gran proporción de células AF muere en cultivo cuando son expuestas a agentes inductores de ICLs, como la MMC, sin embargo, algunas de ellas sobreviven con una gran cantidad de rupturas cromatídicas no reparadas y figuras de intercambio radial (Ostra et al. 2012; Kim & D'Andrea 2012) que se acompañan de un aumento moderado en el número de ICHs (Thompson & Hinz 2009), por lo tanto, si asumimos que las figuras de intercambio radial son resultado de la reparación

de al menos dos rupturas en dos cromosomas no homólogos o regiones no homologas y que los ICHs representan la reparación de un DSB por HR, entonces las células AF poseen mecanismos alternos a la vía FA/BRCA para reparar las DSBs generadas a partir de un ICL, sin embargo, estas vías de reparación parecen ser poco eficientes y propensas a error.

Se ha reportado que las células AF reparan los DSBs preferencialmente por la vía de NHEJ (Nalepa & Clapp 2014) y estudios recientes han demostrado que la inhibición de las proteínas KU70, KU80 o 53BP1 restablece el fenotipo reparador de ICLs en las células AF (Pace 2010; Bunting et al. 2012). Pace y colaboradores demostraron que los porcentajes de supervivencia de las células FANCC<sup>-/-</sup> KU70<sup>-/-</sup> después del tratamiento con cisplatino son similares a los de las células *wild type* y que, en comparación a las células con fenotipo AF-C, las células dobles mutantes presentan ICHs y una disminución en el número de rompimientos cromosómicos tras la exposición a MMC. Por lo que se propuso que la hipersensibilidad de las células AF a agentes inductores de ICLs es consecuencia de la hiperactivación de la reparación por NHEJ y que el fenotipo de reparación eficiente puede restablecerse en las células AF si se facilita el reclutamiento de factores involucrados en la HRR independientemente de la presencia del complejo ID monoubiquitinizado (ID-Ub).

Estos datos sugieren que existe una competencia directa entre la vía FA/BRCA y la NHEJ por la reparación de los DSBs y se ha propuesto que la vía FA/BRCA mantiene la estabilidad genómica promoviendo la reparación por RH a través de mecanismos capaces de inhibir de manera directa e indirecta vías alternas de reparación propensas a error. Al respecto se ha sugerido que FANCD2 posee actividad exonucleasa, la cual podría modificar los extremos del DSB y bloquear de manera directa la unión de KU70, inhibiendo así la reparación por NHEJ (Pace 2010). Del mismo modo, el complejo ID-ub y KU70 podrían inhibir al complejo MRN (Rodríguez et al. 2012), el cual en presencia de la

proteína CtIP media la resección inicial del dsDNA para la reparación del DSB por HR-alterna.

Dado lo anterior, en las células AF los mecanismos de reparación por HR están sustancialmente comprometidos, debido a que la ausencia del complejo ID-ub no solo reduce a resección nucleotídica y la TLS, los cuales son mecanismos necesarios para la reparación eficiente de la hebra homóloga que sería empleada como molde para la reparación correcta del DSB (Kim & D'Andrea 2012), sino que también en ausencia del complejo ID-ub se permite que los extremos del DSB sean ocupados por KU70 y se active la reparación por NHEJ, la cual bloquea de manera directa la reparación del DSB por HR-alterna.

Por otro lado, una vía FA/BRCA funcional recluta factores supresores de la NHEJ, por lo que su pérdida permite el reclutamiento inapropiado de factores de reparación como DNA-PKcs a los sitios de daño (Kee & Andrea 2010; Pace 2010), suprimiendo la reparación del DSB por HRR y favoreciendo la NHEJ (Bunting & Nussenzweig 2013). Bunting et al. (2010) y Pace et al. (2010) reportaron que en las células AF-C la inhibición de DNA-PKcs (DNA-PKcs<sup>-/-</sup>), restablece el fenotipo celular normal, contrario a evidencia adicional que sugiere que la ausencia de la proteína DNA-PKcs compromete la reparación por NHEJ y favorece la reparación por HR (Mladenov & Iliakis 2011).

De manera contradictoria, Adamo y colaboradores (2010) reportaron que células humanas deficientes en DNA-PKcs con fenotipo AF-D2-like, exhiben niveles de sobrevivencia similares a las células *wild type* después de ser tratadas con MMC. Adamo et al. validaron sus resultados haciendo uso de NU7026, y concluyeron que la inhibición química de la actividad cinasa de la proteína DNA-PKcs suprime los defectos en la reparación de ICLs en fibroblastos derivados de ratones *Knockout* FANCA<sup>-/-</sup> y FANCC<sup>-/-</sup>. Sin embargo, de manera consistente con

lo reportado por Bunting et al. (2010) y Pace et. al. (2010) nuestros resultados demuestran que el fenotipo de las células AF no se restablece tras la inhibición de la proteína DNA-PKcs, y que el uso del inhibidor NU7026 incrementa el porcentaje de AC no reunidas después del tratamiento con MMC, esto sugiere que la NHEJ es indispensable en el mantenimiento de la estabilidad genómica y que la relación entre la NHEJ y la vía FA/BRCA en la reparación de los ICLs, podría ser más compleja de lo que inicialmente se consideró.

### **8.1 La inhibición química de la proteína DNA-PKcs inhibe la reparación del DSB por NHEJ y compromete su reparación por HR**

El complejo proteico KU70/KU80 favorece el reclutamiento de la cinasa DNA-PKcs al sitio del DSB y se sabe que la interacción entre el complejo KU70/KU80, DNA-PKcs y el dsDNA resulta en la translocación del heterodímero KU70/KU80 dentro del dsDNA y estimula la actividad cinasa de serina/treonina de la proteína DNA-PKcs, lo cual es esencial para que la NHEJ lleve a cabo exitosamente la reparación del DSB.

Se ha demostrado que DNA-PKcs es capaz de fosforilar a cada uno de los factores de reparación implicados en la NHEJ: KU70/80, XRCC4, Ligasa IV, Artemisa, PNKP y XLF (Davis et al. 2014), sin embargo ninguna de estas fosforilaciones es indispensable para la reparación del DSB y también la fosforilación de algunos de estos factores (Artemisa, PNKP, XRCC4 y XLF) podría llevarse a cabo por otros miembros de la familia PIKK como ATM (Jette & Lees-miller 2015). Por lo tanto, se ha sugerido que la autofosforilación de DNA-PKcs en respuesta al DNA dañado podría ser el evento regulatorio crítico para la reparación del DSB por la NHEJ, e incluso recientemente se ha propuesto que el status de fosforilación de DNA-PKcs podría afectar la elección de la vía de reparación del DSB (Cui et al. 2005).



Al respecto, se ha sugerido que la competencia entre el heterodímero KU70/KU80 y Rad52 (involucrado en la HRR) podría conducir a la reparación del DSB por una u otra vía (Delacote et al. 2002), sin embargo actualmente se ha demostrado que la inhibición de la autofosforilación de DNA-PKcs en el *clúster* ABCDE (residuos T2609, S2612, T2620, S2624, T2638 y T2646), suprime los mecanismos de HRR, debido a que hay una disminución en la accesibilidad y resección de los extremos del DSB así como una disminución en el número de *foci* de RAD51 (Jette & Lees-Miller, 2015). La autofosforilación de DNA-PKcs en los residuos T946, S1004 y T3950 es indispensable para la inactivación de la reparación por NHEJ y el favorecimiento de la HR (Bunting & Nussenzweig, 2010) mientras que la fosforilación del *Clúster* PQR parece favorecer la reparación por NHEJ inhibiendo el acceso de enzimas de restricción a los sitios de daño (Deriano & Roth 2013). Por lo que el uso de NU7026 el cual es un inhibidor ATP competitivo específico de la proteína DNA-PKcs, no solo desfavorecería la fosforilación de factores de reparación río abajo de DNA-PKcs sino que además compromete la autofosforilación de dicha cinasa.

Estudios *in vitro* han demostrado que la autofosforilación de la proteína DNA-PKcs resulta en una serie de cambios conformacionales que modifican la constante de disociación entre el dsDNA y el complejo KU70/KU80 y la cinasa DNA-PKcs, por lo que se sugirió que la autofosforilación eficiente de la proteína DNA-PKcs es indispensable para permitir la disociación del complejo KU70/KU80 del sitio de daño.

Estos hallazgos explicarían el hecho de que encontremos que la inhibición química de la proteína DNA-PKcs no restablezca el fenotipo reparador de ICLs en las células AF-A, y que la reparación de los DSBs sea incluso más ineficiente, debido a que la ausencia del complejo ID-ub permite que el heterodímero

KU70/KU80 se une al dsDNA, mientras que la inhibición química de la actividad cinasa de la proteína DNA-PKcs, no solo compromete la reparación del DSB por NHEJ sino que además evita la disociación del complejo KU70/KU80 del DSB. De este modo la célula AF no puede optar por mecanismos de reparación por HR ya que de manera adicional a la pérdida de la vía FA/BRCA, el uso de NU7026 favorecería de manera indirecta la inhibición competitiva por parte del heterodímero KU70/KU80 hacia el complejo MNR/CtIP que bloquea la reparación del DSB por HR-alterna.

## **8.2 La inhibición química de DNA-PKcs aumenta la sensibilidad de las células normales al efecto clastogénico de los ICLs**

Nuestros resultados demuestran que el uso del inhibidor NU7026 disminuye los porcentajes de sobrevida en las células normales, y que además aumenta la frecuencia de AC por célula y el número de células multiaberrantes en el tratamiento conjunto de MMC y NU7026, a niveles incluso parecidos a lo que se observa en las células con fenotipo AF-A después del tratamiento con MMC.

Nuestros experimentos fueron diseñados con el objetivo de inducir ICLs en el DNA e inhibir químicamente la actividad cinasa de la proteína DNA-PKcs primordialmente durante la fase S del ciclo celular, por lo que si todos los ICLs inducidos por la MMC fueran reconocidos y reparados exclusivamente por la vía FA/BRCA, teóricamente el uso de NU7026 no debería tener un efecto en las células normales, por lo que la frecuencia de AC y células multiaberrantes tendría que ser similar al del tratamiento con NU7026, no obstante el incremento observado en la frecuencia de aberraciones cromosómicas sugiere que el mantenimiento de la estabilidad genómica en las células normales ante ICLs no

solo depende de la vía FA/BRCA, sino de mecanismos alternos de reparación como la NHEJ.

Al respecto Hanlon y colaboradores (2008) demostraron que en células KU70<sup>-/-</sup> o Ligasa IV<sup>-/-</sup> con una vía FA/BRCA funcional, hay una disminución en la sobrevivencia celular y un incremento en la formación de figuras radiales después del tratamiento con MMC, por lo que la inhibición de esta vía de reparación aumenta la sensibilidad de las células normales al efecto clastogénico de los ICL's.

Numerosos estudios han demostrado que la NHEJ es el principal mecanismo de reparación de DSBs (Mladenov & Iliakis 2011) y de manera interesante Jong-Soo y colaboradores (2005) observaron que MRE11 y el heterodímero KU70/KU80 son reclutados de manera independiente al sitio de daño. Sus resultados demuestran que el complejo KU70/KU80 se une a dsDNA de manera transitoria y que su unión precede a la de factores de HRR aún en la fase S del ciclo celular, por lo que se ha sugerido que, la unión del heterodímero KU70/KU80 protege la estabilidad genómica sin importar la fase del ciclo celular o la vía de reparación por la que el DSB será reparado. Esta hipótesis ha sido respaldada por el hecho de que células deficientes en KU70 o KU80 presentan una inestabilidad cromosómica severa después de la inducción de DSBs durante la fase S del ciclo celular (Davis et al. 2014).

Nosotros sugerimos que la exposición a la MMC sobrepasa la capacidad de la vía FA/BRCA funcional para la reparación de los ICL's, esto obligaría a la célula a hacer uso de mecanismos de reparación alternos. Así los DSBs que resulten del procesamiento inicial de los ICLs serían inicialmente ocupados por KU70/KU80, el cual a su vez reclutaría a la cinasa DNA-PKcs y promovería la reparación del DSB por HR. Por lo tanto, aun en las células normales el uso del inhibidor NU7026 tiene un efecto sensibilizador ante agentes inductores de ICLs.

### **8.3 La inhibición química de DNA-PKcs no disminuye la frecuencia de rupturas reunidas en las células AF**

Las figuras radiales son el resultado de una reparación anómala de los DSBs, sin embargo, el mecanismo molecular que da origen a las figuras de intercambio radial continua siendo poco claro. Se sabe que las figuras radiales se forman entre cromosomas homólogos, cromosomas no homólogos o regiones no homologas (Hanlon et al. 2004), por lo que se ha sugerido que podrían ser resultado de eventos de recombinación homóloga no alélica (NAHR) (Bunting & Nussenzweig 2013) o de mecanismos de reparación mediados por NHEJ.

De manera interesante nuestros resultados muestran que la inhibición química de la cinasa DNA-PKcs no modifica la frecuencia de figuras de intercambio radial en las células AF. Si el uso del inhibidor NU7026 compromete a la NHEJ y a la HR-alterna como mecanismos reparadores del DSB, entonces el mecanismo molecular involucrado en la formación de figuras de intercambio radial en las células AF es independiente a estos dos mecanismos.

Hanlon y colaboradores (2008) demostraron que la inhibición de RAD52, MRE11, KU70 o Ligasa IV, promueve la formación de figuras radiales después del tratamiento con MMC y que la inhibición de RAD51 induce la formación espontánea de figuras radiales, por lo que sugirieron que la reparación por NHEJ y la HR están involucrados en la prevención o resolución de las figuras radiales que son resultado del procesamiento de los ICLs (Hanlon et al. 2008). Sin embargo, no existe evidencia que demuestre de manera consistente que la formación de figuras radiales es parte de la respuesta celular normal en la reparación de ICLs (Hanlon et al. 2004).

Nosotros sugerimos que la formación de figuras radiales podría ser resultado de la A-EJ, el cual es un mecanismo de reparación propenso a error en el que se lleva a cabo la ligación de dos extremos de DNA mediado por

microhomología de manera independiente de KU70/KU80 y DNA-PKcs. Se ha sugerido que la A-EJ es un mecanismo de respaldo en ausencia de la reparación por NHEJ, por lo que en células deficientes en KU70 o Ligasa IV, hay una sobre-activación de la A-EJ (Mladenov & Iliakis 2011), lo que justificaría el aumento en la frecuencia de figuras de intercambio radial en células KU70<sup>-/-</sup> o Ligasa IV<sup>-/-</sup> después de la exposición a MMC (Hanlon et al. 2008).

Estudios *in vitro* han demostrado que la unión de Ku70 es capaz de inhibir la reparación por A-EJ, sin embargo este mecanismo alternativo de reparación es capaz de operar aun en células deficientes en NHEJ (Deriano & Roth 2013). Nuestros resultados demuestran que en las células AF el tratamiento conjunto de MMC y NU7026 no modifica la frecuencia de figuras de intercambio radial a pesar de que el número de rupturas cromatídicas aumenta considerablemente, lo cual es consistente con el hecho de que la A-EJ es el principal mecanismo implicado en la formación de figuras radiales,

Si el heterodímero KU70/KU80 se encuentra unido al dsDNA esto inhibiría la reparación del DSB por NHEJ y/o la HR-alterna, evitando así la hiperactivación de la A-EJ, por lo que es posible que la formación de figuras radiales sí sea parte de la respuesta celular normal en la reparación de ICLs (Hanlon et al. 2004). Interesantemente, las células normales no presentan figuras de intercambio radial a pesar de que la A-EJ está funcionalmente activa, aunque se ha sugerido que a diferencia de las células AF la presencia de figuras de intercambio radial en las células normales conduce a la apoptosis antes de que las células lleguen a la fase M del ciclo celular.

## 9. Conclusiones

Las células AF son hipersensibles a los agentes inductores de ICLs. Aunque los ICLs son muy dañinos, las metafases derivadas de células AF muestran evidencia de activación de vías alterna de reparación, como la NHEJ, las cuales sin embargo son propensas a error y pueden conducir a la formación de figuras de intercambio radial y translocaciones. En este trabajo se exploró si la cinasa DNA-PKcs, una proteína canónica de la NHEJ es crucial para la reparación del DNA en las células AF.

Observamos que la inhibición de la cinasa DNA-PKcs tuvo un efecto en la reparación de ICLs en las células normales y en las células AF. En las células NL-53 aumentó la frecuencia basal de rupturas cromatídicas y las sensibilizó a la MMC, demostrando que las células normales requieren de la cinasa DNA-PKcs funcional para reparar la presencia masiva de ICLs. En el caso de las células AF-A hubo un incremento significativo en la frecuencia de rupturas cromatídicas pero, contrario a lo que se esperaba, no se disminuyó la frecuencia de figuras de intercambio radial. El aumento en el número de rupturas cromatídicas indica que las células AF efectivamente requieren de la NHEJ, mediada por DNA-PKcs, como una vía compensatoria de reparación cuando la vía FA/BRCA no es funcional. Contrario a lo que se cree, esta vía podría no ser la responsable de generar las figuras de intercambio radial, pues estas no disminuyeron, por lo tanto, otra vía paralela de reparación podría ser la responsable de la generación de dichas aberraciones cromosómicas.

Por lo tanto, la inhibición de la cinasa DNA-PKcs desarticula a la vía de reparación NHEJ y sensibiliza a las células normales y AF al daño inducido por agentes inductores de ICLs, como la MMC. Los datos sugieren que, efectivamente, las células AF utilizan a la NHEJ como una vía alterna de reparación, pero DNA-PKcs podría no estar implicada en la generación de figuras de intercambio radial.

## 10. Bibliografia

- Adamo, A. et al., 2010. Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia. *Molecular Cell*, 5(Colaia 2002), pp.25–35.
- Auerbach, A.D., 2010. FA and its diagnosis. *Mutation Research*, 668, pp.4–10.
- Bunting, S.F. et al., 2012. 53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, 141(2), pp.243–254.
- Bunting, S.F. & Nussenzweig, A., 2010. Dangerous Liaisons : Fanconi Anemia and Toxic Nonhomologous End Joining in DNA Crosslink Repair. *Cell Press*, 39, pp.2009–2011.
- Bunting, S.F. & Nussenzweig, A., 2013. End-joining, translocations and cancer. *Nature*, 13, pp.443–454. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3537>.
- Cohn, M. & D'Andrea, A., 2013. Chromatin Recruitment of DNA repair proteins: Lessons from the Fanconi Anemia and Doble Strand Break Repair Pathways. *Molecular Cell*, 32(3), pp.306–312.
- Cui, X. et al., 2005. Autophosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Regulates DNA End Processing and May Also Alter Double-Strand Break Repair Pathway Choice Autophosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Regulates DNA End Processing and May Also Alter Double-Strand. *Molecular and Celular Biology*, 25(24), pp.10842–10852.
- D'Andrea, 2010. The Fanconi Anemia and Breast Cancer Suceptibility Pathway. *Nature*, 362(20), pp.1909–1919.
- Davis, A.J., Chen, B.P.C. & Chen, D.J., 2014. DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair*, 17, pp.21–29.
- Delacote, F. et al., 2002. An xrcc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specially induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 30(15), pp.3454–3463.
- Deriano, L. & Roth, D.B., 2013. Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire : Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annual Review of Genetics*.

- Grompe, M. & Andrea, A.D., 2001. Fanconi anemia and DNA repair. *Human Molecular Genetics*, 10(20), pp.2253–2260.
- Hanlon, A. et al., 2008. Loss of Homologous Recombination or Non-homologous End-joining Leads to Radial Formation Following DNA Interstrand Crosslink Damage. *Cytogenet Genome*, 121, pp.174–180.
- Hanlon, A.E. et al., 2004. Interstrand crosslink-induced radials form between non-homologous chromosomes, but are absent in sex chromosomes. *DNA Repair*, 3, pp.535–542.
- Iyama, T. & Wilson, D.M., 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), pp.620–636. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>.
- Jette, N. & Lees-miller, S.P., 2015. The DNA-dependent protein kinase : A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, (January), pp.1–12.
- Kaddar, T. & Carreau, M., 2012. Fanconi anemia proteins and their interacting partners: A molecular puzzle. *Anemia*, 2012.
- Kee, Y. & Andrea, A.D.D., 2010. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & Development*, 24, pp.1680–1694.
- Kee, Y. & D'Andrea, A., 2012. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), pp.3799–3806. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/58321>.
- Kim, H. & D'Andrea, A., 2012. pathway Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia / BRCA pathway. *Genes & Development*, (1d), pp.1393–1408.
- Kottemann, M. & Smogorzewska, A., 2013. Fanconi anemia and the repair of Watson and Crick crosslinks. *Nature*, 493, pp.356–363.
- Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79(D), pp.181–211.



- Mladenov, E. & Iliakis, G., 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Elseviers*, 711(1-2), pp.61–72.
- Moldovan, G. & D'Andrea, A., 2009. How the Fanconi Anemia pathway guards the genome. *Annual Review of Genetics*, 43, pp.223–249.
- Nalepa, G. & Clapp, D.W., 2014. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy. *F1000prime reports*, 6(April), p.23.
- Oostra, A.B. et al., 2012. Diagnosis of fanconi anemia: Chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012.
- Pace, P., 2010. Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway Paul Pace,. *Science*, 329(219).
- Rodríguez, A. et al., 2012. A Boolean network model of the FA / BRCA pathway. *Bioinformatics*, 28(6), pp.858–866.
- Rothfuss, A. & Grompe, M., 2004. Repair Kinetics of Genomic Interstrand DNA Cross-Links : Evidence for DNA Double-Strand Break-Dependent Activation of the Fanconi Anemia / BRCA Pathway. *Molecular and Cell Biology*, 24(1), pp.123–134.
- Thompson, L. & Hinz, J., 2009. Cellular and molecular consequences of ddefective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. *Mutation Research*, 668(1), pp.54–72.
- Wang, L. & Gautier, J., 2011. The Fanconi anemia and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(5), pp.424–439.