



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Noves estratègies terapèutiques contra la resposta a l'estrès replicatiu en el càncer colorectal

Fernando Unzueta Payeras



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Noves estratègies terapèutiques contra la resposta a l'estrès replicatiu en el càncer colorectal

Tesi doctoral presentada per

Fernando Unzueta Payeras

Per a l'obtenció del títol de Doctor en Biomedicina
per la Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Aquesta tesi s'ha realitzat en el Departament de Biomedicina a la Facultat de
Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona, sota la
supervisió de la Dra Neus Agell Jané.

Neus Agell Jané

Barcelona, Maig 2023

Fernando Unzueta
Payeras

ABREVIATURES	19
INTRODUCCIÓ	27
1. EL CICLE CEL·LULAR	29
2. REPLICACIÓ DEL DNA	49
3. ESTRÈS REPLICATIU	57
4. ESTRÈS REPLICATIU I CÀNCER	77
OBJECTIUS	83
RESULTATS	87
CAPÍTOL 1 OZF MANTÉ LA VELOCITAT DE PROGRESSIÓ DE LA FORQUETA DE REPLICACIÓ EN CONDICIONS D'ESTRÈS REPLICATIU	89
1.1. INTRODUCCIÓ.....	91
1.2. RESULTATS PREVIS	94
1.3. OBJECTIUS	98
1.4. RESULTATS.....	98
CAPÍTOL 2 RAD51 MANTÉ LA PROGRESSIÓ DE LA REPLICACIÓ EN RESPOSTA A L'ESTRÈS REPLICATIU	109
2.1. INTRODUCCIÓ.....	111
2.2. RESULTATS PREVIS	115
2.3. OBJECTIU	118
2.4. RESULTATS.....	118
CAPÍTOL 3 LA INHIBICIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE NOUS ORÍGENS DE REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATU SEVER FRENA LA RECUPERACIÓ EN CÈL·LULES HCT116	133
3.1. RESULTATS PREVIS	135
3.2. OBJECTIUS	141
3.3. RESULTATS.....	141
CAPÍTOL 4 LA RECUPERACIÓ D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER ALTERA LA DINÀMICA DELS DOMINIS DE REPLICACIÓ I L'ACCESSIBILITAT DE LA CROMATINA EN CÈL·LULES HCT116	189
4.1. INTRODUCCIÓ.....	191

4.2.	RESULTATS PREVIS	197
4.3.	OBJECTIUS	197
4.4.	RESULTATS.....	197
	DISCUSSIÓ	219
1.	OZF MANTÉ LA VELOCITAT DE PROGRESSIÓ DE LA FORQUETA EN CONDICIONS D'ESTRÈS REPLICATIU	223
2.	RAD51 MANTÉ LA PROGRESSIÓ DE LA REPLICACIÓ EN RESPOSTA A L'ESTRÈS REPLICATIU.....	227
3.	LA INHIBICIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE NOUS ORÍGENS DE REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATU SEVER FRENA LA RECUPERACIÓ EN CÈL·LULES HCT116.....	233
4.	LA INHIBICIÓ CONJUNTA DE CDK2 I RAD51 DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATU INCREMENTA LA MORTALITAT EN CÈL·LULES HCT116.....	241
5.	LA RECUPERACIÓ D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER ALTERA LA DINÀMICA DELS DOMINIS DE REPLICACIÓ I L'ACCESSIBILITAT DE LA CROMATINA EN CÈL·LULES HCT116	245
6.	MODEL FINAL	253
	CONCLUSIONS	255
	MATERIALS I MÈTODES	261
1.	CULTIUS CEL·LULARS	263
2.	ASSAJOS DE VIABILITAT I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.....	267
3.	WESTERN BLOT (WB)	270
4.	CITOMETRIA DE FLUX.....	283
5.	DNA FIBER ASSAY	286
6.	IMMUNOFLUORESCÈNCIA (IF)	291
7.	RT-qPCR.....	298
8.	ATAC-seq	302
9.	ANÀLISI DELS RESULTATS	306
	BIBLIOGRAFIA	307

ABREVIATURES

APS: ammonium persulfate (persulfat amònic).

Apc: anaphase promotor complex subunit (subunitat del complex promotor d'anafase).

APC/C: anaphase-promoting complex/cyclosome (Ciclosoma/complex promotor de l'anafase).

ASK: Apoptosis signal-regulating kinase (quinasa reguladora del senyal d'apoptosi).

ATAC-seq: assay for transposase-accessible chromatin with sequencing (assaig d'accessibilitat de cromatina a transposasa i seqüenciació).

ATCC: american Type Culture Collection (banc de cèl·lules americà).

ATM: ataxia-telangiectasia mutated (ataxia-telangeectàsia mutada).

ATP: Adenosine 5'-triphosphate (adenosina-5'-trifosfat).

ATR: ATM and Rad3-related (proteïna relacionada amb ATM i Rad3).

ATRIP: ATR-interacting protein (proteïna que interacciona amb ATR).

BIR: break-induced replication (replicació induïda per trencament).

bp: base pairs (parells de bases).

BRCA1/BRCA2: breast cancer type 1/ breast cancer type 2 (Cancer de mama tipus 1/2).

BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina.

BSA: bovine serum albumin (albúmina de sèrum boví).

Bub3: budding uninhibited by benzimidazole 3 (gemmació no inhibida per benzimidazol 3).

BubR1: budding uninhibited by benzimidazole-related 1 (proteïna relacionada amb bub 1).

CAK: CDK-activating kinase (quinasa activadora de CDK).

Cdc: cell division cycle (cicle de divisió cel·lular).

CDK: cyclin-dependent kinase (quinasa dependent de ciclina).

Cdt1: Cdc10-dependent transcript 1 (Transcrit 1 dependent de Cdc10).

CFS: common fragile site (Llocs fràgils comuns).

Chk1/Chk2: checkpoint kinase 1/ checkpoint kinase 2 (Quinasa del checkpoint 1/2).

ABREVIATURES

Cip/Kip: CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein (proteïna que interacciona amb CDK/proteïna quinasa inhibidora).

CKI: CDK inhibitory subunit (subunitat inhibidora de CDK).

CKs: Cdc kinase subunit (subunitat cdc quinasa).

CK1 γ 1: casein kinase 1 gamma 1 (caseïna quinasa 1 gamma 1).

CK: Keratin, type I cytoskeletal (queratina citoesquelètica de tipus I).

CldU: 5-cloro-2'-desoxiuridina.

CMG: Cdc45 MCM GINS.

CRL: cullin RING ligase (Ligasa culling RING).

CTCF: CCCTC-binding factor (factor d'unió a CCCTC).

CtIP: CtBP-interacting protein (Proteïna que interacciona amb CtBP).

CTR: constant timing regions (regions amb timing constant).

DDK: Dbf4-dependent kinase (Quinasa dependent de Dbf4).

DDR: DNA damage response (Resposta al dany al DNA).

D-loop: displacement loop (Llaç de desplaçament).

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase (Proteïna quinasa dependent de DNA).

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium (medi d'Eagle modificat per Dulbecco).

DNA: deoxyribonucleic acid (àcid desoxiribonucleic).

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase (proteïna quinasa dependent de DNA).

DNA2: DNA replication helicase/nuclease 2 (helicasa/nucleasa 2 de la replicació del DNA).

dNTP: deoxyribonucleoside triphosphate (trifosfat de desoxiribonucleòsid).

DUE-B: DNA unwinding element binding protein (proteïna que s'uneix a l'element de desenrotllament del DNA).

DSB: double-strand break (Trencament de doble cadena).

dsDNA: double-stranded DNA (DNA de doble cadena).

DTT: dithiothreitol (Ditiotreitòl).

- DUB:** deubiquitylating enzyme (deubiquitinasa).
- DUE-B:** DNA unwinding element (element que desenrotlla el DNA).
- EdU:** 5-etinil-2'-desoxiuridina.
- Emi1:** early mitotic inhibitor (inhibidor de la mitosi prematura).
- ERFS:** Early replication fragile site (lloc fràgil amb replicació primerenca).
- ETAA1:** Ewing tumour-associated antigen 1 (Antigen 1 associat al tumor d'Ewing).
- EXO1:** exonuclease 1 (exonucleasa 1).
- FA:** Fanconi anemia (anemia de Fanconi).
- FANCM:** FA complementation group M (proteïna M del grup de complementació de la FA).
- FANCD2:** FA complementation group D2 (proteïna D2 del grup de complementació de la FA).
- FBS:** foetal bovine serum (Sèrum boví fetal).
- FBH1:** F-box DNA helicase 1 (DNA helicasa amb domini F-box).
- FBW7:** F-box and WD repeat domain-containing 7 (Proteïna 7 amb dominis F-box i repetició WD).
- FEN1:** flap endonuclease 1 (endonucleasa flap 1).
- G1/G2:** gap 1/gap2 (interval 1/2).
- GC:** Guanina Citosina.
- GEM:** gemcitabina.
- GEMC1:** geminin coiled-coil domain containing protein 1 (proteïna 1 de la família geminina que conté el domini coiled coil).
- GIN5:** go ichi ni san (5 1 2 3).
- GSK3 β :** Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (quinasa 3 de la glicogen sintasa).
- h:** hora/hores.
- HLTF:** Helicase-like transcription factor (factor de transcripció semblant a helicasa).
- HR:** homologous recombination (Recombinació homòloga).
- HU:** hidroxidurea.

ABREVIATURES

H2AX: Histone 2A X (histona 2A variant X).

ICL: interstrand crosslink (entrecreuament entre cadenes).

IdU: 5-iodo-2'-desoxiuridina.

INK4: inhibitors of CDK4 (inhibidors de CDK4).

iPOND: isolation of proteins on nascent DNA (aïllament de proteïnes del DNA naixent).

Kb: kilobase.

Kd: constant de dissociació.

KDa: kilodalton.

LINE1: long interspersed nuclear element (Element nuclear llarg intercalat 1).

LADs: lamina-associated domains (dominis associats a la làmina).

Mad: Mitotic spindle assembly checkpoint protein (proteïna del checkpoint de l'ensamblatge del fus mitòtic).

Mat1: ménage à trois 1 (trio 1).

Mb: megabase.

MCC: mitòtic checkpoint complex (complex del checkpoint mitòtic).

MDa: Megadalton.

MDC1: mediator of DNA damage checkpoint 1 (mediador 1 del checkpoint de dany al DNA).

MCM: minichromosome maintenance protein complex (complex proteic de manteniment de minicromosoma.)

Min: minut/minuts.

MRN: Mre11-Rad50-Nbs1.

Myt1: Myelin Transcription Factor 1 (factor de transcripció 1 de la mielina).

NADs: nucleolus-associated domains (dominis associats al nuclèol).

NHEJ: non-homologous end-joining (unió d'extremes no homòlegs).

ORC: origin-recognition complex (complex de reconeixement de l'origen).

ORF1p: open reading frame 1 protein (proteïna del marc obert de lectura 1).

OZF: only zinc-finger (només dits de zinc [dominis dits de zinc]).

- PARP1:** poly(ADP-ribose) polymerase 1 (polimerasa poli[ribosa-ADP] 1).
- PBS:** phosphate buffered saline (tampó fosfat salí).
- PBS-T:** phosphate buffered saline Tween 20 (tampó fosfat salí amb Tween 20).
- PCA:** principal component analysis (anàlisi de components principals).
- PCNA:** proliferating cell nuclear antigen (antigen nuclear de cèl·lula proliferant).
- PCR:** polymerase chain reaction (reacció en cadena de la polimerasa).
- PI:** propidium iodide (iodur de propidi).
- PLK1:** polo-like kinase 1 (quinasa 1 semblant a polo [gen de Drosophila]).
- PMSF:** phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluorur de fenilmetilsulfonyl).
- PP1:** protein phosphatase 1 (proteïna fosfatasa 1).
- PP2A:** protein phosphatase 2A (proteïna fosfatasa 2A).
- Rb:** Retinoblastoma.
- RBX1:** ring-box 1.
- rcf:** Relative centrifugal force (força centrífuga relativa).
- RhoBTB3:** Rho related BTB domain containing 3 (proteïna 3 amb domini familiar a Rho i domini BTB).
- Rif1:** Replication Timing Regulatory Factor 1 (Factor regulador 1 del timing de replicació).
- RNF:** Ring finger protein (proteïna amb domini ring).
- RING:** really interesting new gene (nou gen realment interessant).
- ROS:** reactive oxygen species (espècies reactives d'oxigen).
- RPA:** replication protein A (proteïna de replicació A).
- RRM2:** ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (subunitat reguladora M2 de la ribonucleòtid reductasa).
- RT-qPCR:** reverse transcription-quantitative PCR (transcripció reversa-PCR quantitativa).
- SCF:** Skp1 Cul1 F-box-protein (skp1 Cul1 proteïna amb F-box).
- SDS:** sodium dodecil sulphate (Dodecilsulfat sòdic).

ABREVIATURES

Skp1: S-phase kinase associated protein 1 (proteïna 1 associada a quinasa de fase S).

SMARCAL1: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a like 1.

SMC: structural maintenance chromosomes protein (proteïna del manteniment estructural dels cromosomes).

SN: Sobrenadant.

SSB: single-strand break (trencament en una cadena).

ssDNA: single-stranded DNA (DNA monocatenari).

TA: Temperatura ambient.

TAD: topologically associating domain (domini topològicament associat).

TBS: tris buffered saline (tampó tris salí).

TBS-T: tris buffered saline Tween 20 (tampó tris salí amb Tween 20).

TDP: Timing decision point (punt de decisió del timing).

TEMED: tetrametiletilendiamine (Tetrametiletilendiamina).

TLS: translesion synthesis (Síntesi de translesió).

TopBP1: topoisomerase-binding protein 1 (proteïna 1 d'unió a la topoisomerasa).

TPR: tetratricopeptide repeat.

TTR: timing transition regions (regió de transició en el timing).

Tyr: Tirosina.

UBC: ubiquitin conjugating enzyme (enzim conjugador d'ubiquitina).

WB: Western blot.

ZRANB3: Zinc finger RANBP2-type containing 3.

53BP1: p53-binding protein 1 (proteïna 1 que s'uneix a p53).

INTRODUCCIÓ

1. EL CICLE CEL·LULAR

El mateix any que es va presentar al món l'estructura del DNA, Howard i Pelc van postular el que seria el naixement del concepte de cicle cel·lular tal com el coneixem. Varen incubar plantes amb fòsfor radioactiu i monitorar la seva incorporació al DNA. Així varen demostrar com el fòsfor radioactiu només s'incorporava durant 6 hores, 8 hores després les cèl·lules entraven en mitosis i 12 hores després tornaven a incorporar-lo, i per tant, replicar el DNA ^{1,2}.

Fins al moment, gràcies al treball de Flemming, el cicle cel·lular només s'havia dividit en: **interfase**, on no es marcaven els cromosomes, i **mitosi**, on els cromosomes es marcaven i es podia seguir la seva distribució entre les cèl·lules filles ³.

El **cicle cel·lular** es defineix com el conjunt de processos que deriven en la duplicació d'una cèl·lula ⁴. Com hem pogut veure, durant el desenvolupament d'aquest concepte el DNA ha tingut un paper fonamental, ja que el cicle cel·lular es divideix i s'organitza en fases segons la replicació del DNA, la condensació en cromosomes i la posterior segregació dels cromosomes ^{4,5}.

Durant la **fase S**, la cèl·lula replica el DNA. Les dues fases que es troben abans i després d'ella s'anomenen **G1** (*Gap 1*) i **G2** (*Gap 2*) respectivament. Durant la G1 la cèl·lula es prepara per a la duplicació del DNA i durant la G2 es controla que la replicació del DNA s'hagi completat de manera satisfactòria, i la cèl·lula es prepara per a la mitosi. En aquests dos *gaps*, la cèl·lula sintetitza les estructures necessàries per a la duplicació i la distribució del genoma entre les dues cèl·lules filles. Aquestes són les 3 fases en les quals, ja l'any 1953, Howard i Pelc van dividir la interfase ^{1,2,4,5}.

Després de la fase G2 la cèl·lula entra en la **fase M**, que es pot separar en **mitosi**, on es produeix la divisió del nucli, i **citocinesi**, on es produeix la divisió del citoplasma i es finalitza el cicle cel·lular. Com a resum, durant la interfase, la cèl·lula duplica totes les estructures necessàries i

es prepara per a distribuir-les entre les cèl·lules filles durant la fase M ⁴⁻⁶.

No totes les cèl·lules es troben en el cicle cel·lular. La majoria de les cèl·lules d'un organisme pluricel·lular adult es troben fora d'aquest, ja que estan en un estat on no proliferen. Aquest estat es coneix com a **G0**. Les cèl·lules poden mantenir-se irreversiblement dintre d'aquest estat, com és el cas de les cèl·lules **senescents** o les completament **diferenciades**. En canvi, les cèl·lules **quiescents**, poden tornar a entrar dintre del cicle. Aquestes reben senyals contínuament per mantenir-se fora del cicle, però quan reben els estímuls necessaris poden tornar a entrar per dividir-se ⁷⁻⁹.

Així doncs, la correcta regulació del cicle cel·lular és fonamental per tal que es pugui mantenir l'homeòstasi de teixits.

1.1. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

Tant la progressió entre una fase i una altra com l'entrada en el cicle cel·lular estan controlades pels **complexos CDK-ciclina**. Les quinases dependents de ciclina (CDK) són serina-treonina quinases que necessiten d'una subunitat reguladora anomenada ciclina ¹⁰. En *Saccharomyces cerevisiae* hi ha 6 CDK i 15 ciclins ¹¹. Les CDK es poden dividir en les que es poden unir a més d'una ciclina i regulen el cicle, i les que només es poden unir a una ciclina i regulen la transcripció. Les CDK d'aquest segon grup s'uneixen a ciclins que no estan regulades de manera depenent del cicle cel·lular. El fet que les CDK que regulen el cicle es puguin unir a diverses ciclins confereix una regulació més dinàmica, i fa que es puguin fosforilar diversos substrats ¹⁰.

En humans podem trobar 20 CDK i fins a 29 ciclins diferents. Durant l'evolució s'ha incrementat el nombre de CDK i hi ha hagut un augment notable de les CDK relacionades amb el cicle cel·lular. En humans les CDK es poden agrupar en 8 subfamílies, de les quals només la subfamília CDK1/2/3, la CDK4/6 i la CDK5 estan relacionades amb el cicle cel·lular ^{10,11}. No obstant això, la CDK5 es considera una quinasa

específica de teixit neuronal, tot i que actualment també es relaciona amb altres teixits ¹². Per altra banda les ciclines que controlen el cicle s'agrupen en quatre tipus amb les seves isoformes corresponents: les D (D1, D2 i D3), les E (E1 i E2), les A (A1, i A2) i les B (B1, B2 i B3) ^{10,11}.

La regulació del cicle per part dels complexos CDK-ciclina i els nivells de ciclines que hi ha a cada fase es troben resumits a la **figura 1**. Al costat de cada complex hi trobam el seu inhibidor, que descriurem més endavant.

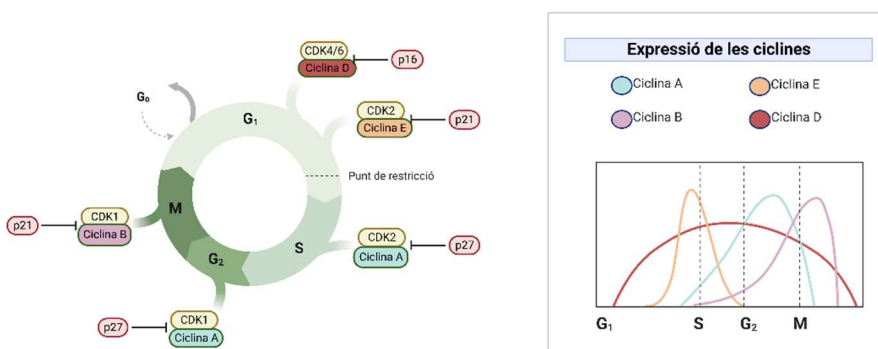


Figura 1. Cicle cel·lular. Adaptat de *Cyclins: Cell Cycle Regulators* (BioRender.com).

Durant la G₁ és quan la cèl·lula ha de decidir entrar al cicle per dividir-se o sortir d'ell, podent entrar en quiescència, senescència o diferenciació cel·lular. La decisió d'entrada en el cicle està determinada al final de la G₁, per l'activació d'un programa de transcripció de gens regulat pels factors de transcripció E2F, que estan relacionats amb la duplicació del DNA i la progressió en el cicle ^{13,14}. Un cop s'activa la transcripció d'aquests gens la cèl·lula queda compromesa a dividir-se. Aquest moment del cicle cel·lular es coneix com a **punt de restricció**, i si la cèl·lula el supera està predestinada a continuar amb el cicle tot i que deixi de rebre mitògens.

En el model més acceptat, al principi de la fase G1, els complexos CDK4/6-ciclina D són els que controlen i promouen l'entrada en el cicle. Mentre que al final de la G1 és el complex CDK2-ciclina E el que promou el pas del punt de restricció i la progressió a la fase S, suposant l'entrada definitiva en el cicle ¹⁴⁻¹⁷. Més endavant aprofundirem més sobre el model més recolzat actualment de la progressió en la fase G1 i l'entrada en el cicle. Hi ha revisions com la de Rubin, Sage i Skotheim que integren i exploren altres models més alternatius ¹⁷.

Un cop en fase S la ciclina A substitueix la E, i el complex CDK2-ciclina A controlarà la progressió de la fase S ^{18,19}. Aquest complex es mantindrà fins al final de la G2 i la ciclina A gradualment s'unirà també a la CDK1 fins entrada la mitosi. Allà, la ciclina B substituirà la A, i el complex CDK1-Ciclina B serà el que controlarà la mitosi ²⁰.

No obstant això, tot i haver moltes CDK que intervenen en el cicle, en estudis on han eliminat les CDK de manera combinada, s'ha vist que de totes elles només CDK1 és imprescindible per a la progressió del cicle cel·lular. L'eliminació de les altres CDK no impedeix la progressió en el cicle, i per tant, es postula que CDK1 pot suplir a les altres ^{21,22}.

1.2. REGULACIÓ DE LES CDK-CICLINA

Els complexos CDK-Ciclina es regulen a diferents nivells:

1.2.3. NIVELLS DE CICLINES

Els nivells de les CDK es mantenen estables durant el cicle cel·lular, en canvi, el nivell de les diferents ciclins oscil·len al llarg del cicle. Els factors de transcripció que controlen la seva expressió l'activaran o no segons el moment del cicle cel·lular on estigui la cèl·lula. De manera que regulant l'expressió de les ciclins es pot activar la CDK corresponent només a la fase del cicle que el complex hi participa ²⁰.

A part de la seva transcripció, la seva degradació també es troba altament regulada. Les ciclins que controlen el cicle es degraden pel proteasoma i en el procés intervenen dos complexos E3 ubiquitina

ligasa: **SCF** (*Skp1/Cul1/F-box protein*) i **APC/C** (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*). SCF ubiquitinitza a la ciclina D i a la E, mentres que APC/C ubiquitinitza a la ciclina A i a la B ²³. Aquests complexos els analitzarem en detall posteriorment.

1.2.4. REGULACIÓ PER FOSFORILACIÓ I DESFOSFORILACIÓ

L'estructura de les CDK que regulen el cicle cel·lular és bilobulada, amb un lòbul petit a l'extrem amino-terminal, que conté lamines beta, i un lòbul més gran a la part carboxi-terminal format principalment per alfa hèlix. El centre catalític es troba a la part central entre els dos lòbuls. En funció de la ciclina i la CDK, aquestes es podran unir a un lòbul, a l'altre o als dos. El centre catalític es troba bloquejat per un *loop* (llaç) llarg i flexible anomenat *T-loop* o *loop* d'activació. Un cop la ciclina s'uneix a la CDK, es produeix una rotació que reestructura la proteïna fent el centre actiu accessible, i exposa una treonina del *T-loop* que queda disponible per a la seva fosforilació. La unió de la ciclina a la CDK només produeix una activació parcial, per tal que el complex CDK-Ciclina s'estabilitzi i s'activi completament, a més de la unió de la ciclina, s'ha de fosforilar la treonina exposada que hi ha al *T-loop* ^{4,10,24}.

El complex **CAK** és l'encarregat de fer aquesta fosforilació. Està compost per les proteïnes CDK7, Ciclina H i Mat1. Al contrari que l'expressió de les ciclines, l'activitat de CAK és elevada i no està regulada per cap via de control del cicle cel·lular. És important destacar que a més del seu paper a l'activació dels complexos CDK-Ciclina, el complex CAK també està involucrat amb la transcripció, ja que s'associa a TFIIF, un factor de transcripció general que s'uneix a la RNA polimerasa II ²⁵.

També hi ha fosforilacions que inhibeixen l'activitat dels complexos CDK-Ciclina. Es produeixen en dos residus conservats en les principals CDK: la treonina 14 i la tirosina 15. A diferència del complex CAK, que té sempre una activitat elevada, la fosforilació o desfosforilació d'aquests residus està controlada per diverses quinases i fosfatases

altament regulades durant el cicle cel·lular. Per una banda, **Wee1** fosforila a la Tyr15 i **Myt1** pot fosforilar els dos residus (Thr14 i Tyr15). Per altra banda, la família de fosfatases **Cdc25** (Cdc25 A, B i C) poden catalitzar la desfosforilació d'aquests residus i, per tant, activar els complexos CDK-Ciclina ^{4,10,24}. Aquestes 3 fosfatases es diferencien en l'extrem N terminal, que és el domini de regulació, mentre que el centre catalític es troba altament conservat ²⁶.

1.2.5. PROTEÏNES INHIBIDORES O ACTIVADORES DE L'ACTIVITAT DE LES CDK

CKI

Les **CKI** (*CDK inhibitor*) són proteïnes que s'uneixen als complexos CDK-Ciclina per a inhibir-los. La majoria d'organismes eucariotes tenen almenys una CKI potent que és capaç d'aturar el cicle i així permetre tenir una G1 estable o parar-lo quan hi ha algun problema, com per exemple, dany al DNA ^{4,5,27}.

Hi ha dues famílies d'inhibidors, segons els complexos CDK-Ciclina que afectin i el mecanisme d'acció. Podem distingir entre la família **INK4** i la **Cip/Kip**.

Dintre de la família INK4 podem trobar p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d}. Aquesta família d'inhibidors s'uneixen específicament a CDK4 i CDK6 en forma monomèrica i redueixen l'afinitat de la ciclina al distorsionar el seu lloc d'unió i el de l'ATP ²⁸⁻³¹.

A la família Cip/Kip hi trobem **p21**^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}. Aquestes proteïnes tenen dues regions claus, una més curta que interacciona amb la ciclina i una altra més llarga que ho fa amb la CDK. La unió distorsiona el centre catalític inhibint la CDK. Així es pot inhibir l'activitat de la CDK quan aquesta està unida a la ciclina ^{32,33}.

Tot i que inhibeixen la CDK2 i la CDK1 amb les seves ciclins corresponents, s'ha vist que els inhibidors de la família Cip/Kip tenen efectes activadors en complex CDK4-Ciclina D o CDK6-Ciclina D. Això

succeeix perquè, a diferència de les altres CDK, CDK4 i CDK6 no tenen una unió molt robusta amb la seva ciclina i requereixen d'altres proteïnes com les de la família Cip/Kip per mantenir la unió, ja que aquestes són capaces de interaccionar tant amb la CDK com amb la ciclina i no afectar el seu centre catalític ^{4,17}.

A la **figura 2** resumim l'activació i inhibició dels complexos CDK-ciclina. Aquests són els activadors i inhibidors més coneguts i *canònics*, però actualment s'han trobat algunes altres proteïnes que funcionen com activadors o inhibidors d'aquests complexos.

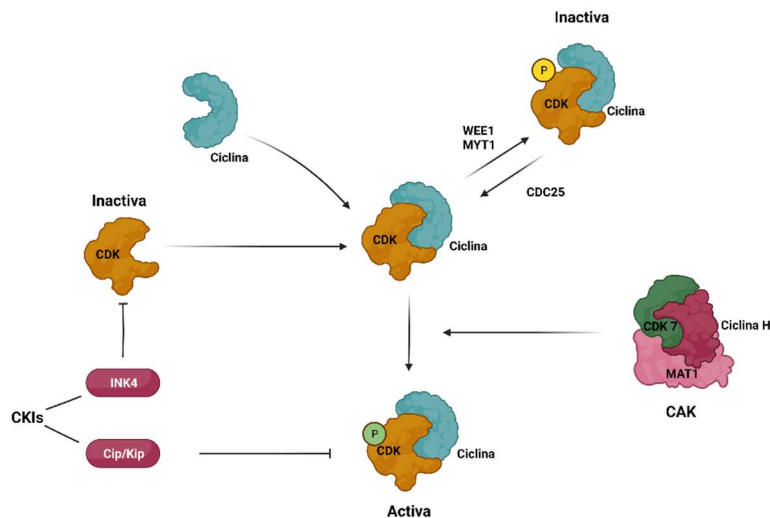


Figura 2. Regulació de les CDKs. Adaptada de "The Cell Cycle" ³⁴. Figura realitzada amb BioRender.com.

FAMÍLIA DE PROTEÏNES RINGO/SPEEDY

Les ciclines són les activadores universals de les CDK, no obstant això, s'ha vist com algunes proteïnes que no formen part de la família de ciclines també poden activar les CDK. En oòcits de *Xenopus* es va descriure com XRINGO, una proteïna de la família *RINGO/Speedy* era capaç d'activar la CDK1 i la CDK2 sense necessitat de la unió de la ciclina ³⁵. Posteriorment, s'han trobat homòlegs en humans: RingoA i

RingoC i RingoD ^{36,37}. L'activació de la CDK1 i la CDK2 que fan les proteïnes *RINGO/Speedy* no es veu afectada per l'activitat d'altres reguladors, ja que es produeix independentment de la fosforilació del *T-loop* que fa el complex CAK i de la inhibició per part de Myt1. També s'ha vist com les CDK activades per les proteïnes *RINGO/Speedy* són menys sensibles als inhibidors p21 ^{WAF1/Cip1} i p27 ^{Kip1} ³⁸. De manera que aquestes proteïnes poden actuar quan l'activitat de la CDK1 i la CDK2 unida a la ciclina és baixa ³⁷.

En oòcits de *Xenopus* tenen un paper important en la maduració d'aquests. Els seus homòlegs en mamífers són importants per a la meiosi, però no són necessaris en teixits somàtics. De fet, en ratolins, l'eliminació dels gens que codifiquen aquestes proteïnes produeix esterilitat, però no afecta la resta de l'organisme ^{37,39}.

Tot i això, s'ha vist com en algunes línies tumorals com les U2OS o HEK293 sí juguen un paper important en la progressió del cicle cel·lular. A més els seus nivells són oscil·lants i amb un patró molt semblant a la ciclina A. La seva sobreexpressió produeix una fase G1 més curta ^{37,40}.

CKs

Les Cks (*Cdc kinase subunit*) són petites proteïnes que estan evolutivament conservades des de llevats a mamífers, i que poden interactuar amb la CDK1 i la CDK2 per modular la seva activitat. En mamífers s'han identificat dues proteïnes Cks1 i Cks2 ⁴¹⁻⁴³. S'ha vist que són importants per a la progressió en el cicle i la seva sobreexpressió està relacionada amb el càncer ^{42,44}. També juguen un paper clau en la meiosi i el desenvolupament embrionari. La depleció del gen d'una d'aquestes proteïnes produeix esterilitat i l'eliminació dels gens de les dues Cks produeix la mort en estat embrionari ⁴².

PROTEASOMA

El proteasoma juga un paper important en la degradació de proteïnes relacionades amb el control del cicle cel·lular.

Per a què el proteasoma degradi les proteïnes, és necessari que aquestes es trobin marcades amb múltiples unitats d'una proteïna petita anomenada ubiquitina. Aquesta ubiquitinització es produeix en tres fases seqüencials i hi intervenen tres enzims diferents: E1, E2 i E3. Primer succeeix l'activació de la ubiquitina on de manera depenent d'ATP, aquesta s'uneix covalentment a l'enzim activador d'ubiquitina (E1). Després, E1 interacciona amb l'enzim conjugador d'ubiquitina (E2), que catalitzarà la transferència de la ubiquitina d'E1 a E2. Finalment, la **ubiquitina ligasa E3** és la que catalitza la transferència de la ubiquitina d'E2 a la proteïna diana. De manera que és E3 la que confereix especificitat i fa que s'ubiquitinitzi la proteïna en el residu adient. Aquest fet és fonamental ja que el residu en el que es produeixi la monoubiquitinització o poliubiquitinització pot indicar destins diferents per a la proteïna, des del reconeixement i degradació per part del proteasoma, a formar part de vies de senyalització com la de reparació del DNA i traducció. És a dir, no sempre implica degradació ²³.

Hi ha varies E3 ubiquitina ligases que són principals per a la regulació del cicle cel·lular: la família de les **CRL** (*Culling-RING ubiquitin ligase*) i **APC/C** (*anaphase-promoting complex/cyclosome*). Aquests enzims formen part de la mateixa família d'E3 ubiquitina ligases, caracteritzada perquè al centre actiu hi tenen una subunitat que conté un domini *RING finger*, que és el que uneix i orienta de manera adequada a E2 carregada amb la ubiquitina.

CRL

Aquesta família d'E3 ubiquitina ligasa inclou 8 complexos diferents i està implicada en l'ubiquitinització d'aproximadament el 20% de les proteïnes cel·lulars. Aquests complexos enzimàtics participen en diversos processos com: el control del cicle cel·lular, la replicació i reparació del DNA, i la remodelació de la cromatina. Hi ha 8 complexos CRL diferents, i el principal en el control del cicle és CRL1, també conegut com **SCF** (Skp1-Cullin 1-F box) ^{23,45}. Totes les CRL comparteixen la mateixa estructura (**figura 3**).

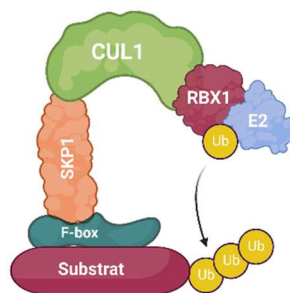


Figura 3. Components de la SCF. Adaptat de "Stat2 stability regulation: an intersection between immunity and carcinogenesis" ⁴⁷. Figura realitzada amb BioRender.com.

Aquesta estructura està formada per 4 subunitats:

- **Cullin**: Forma l'esquelet del complex, és una família evolutivament conservada i hi ha una subunitat *Cullin* diferent per cada CRL ^{23,45}.
- **Adaptador**: És una subunitat que es troba a l'extrem N terminal de *Cullin* i l'enllaça amb el receptor ^{23,45}.
- **Receptor**: És la subunitat que reconeix el substrat i l'uneix. Cada CRL té diversos receptors i són els encarregats d'aportar l'especificitat de l'enzim. Com n'hi ha més d'un, l'especificitat es pot regular per adaptar-la a les necessitats de la cèl·lula. Aquest fet és el que permet que regulant només el receptor, es degradin unes proteïnes o unes altres en funció del punt del cicle cel·lular on es trobi la cèl·lula ^{23,45}.

- **RING**: És la subunitat que s'uneix a l'extrem C-terminal de *Cullin* i l'acobla amb el complex E2 que té la ubiquitina conjugada. Gràcies a aquesta subunitat, s'enfronta la E2 amb el receptor, que és on estarà la proteïna diana ^{23,45}.

En el cas de SCF la subunitat *Cullin* és la *Cullin 1*, l'adaptador és Skp1, la subunitat RING és RBX1 i el receptor són les proteïnes F-box ^{23,45}. Actualment, s'han detectat fins a 69 adaptadors F-box, que en funció dels diferents dominis es classifiquen en 3 famílies ⁴⁶. Cal destacar que generalment les F-box reconeixen motius de degradació fosforilats (anomenats *phosphodegron*) i bona part d'aquesta fosforilació és dependent de CDK. Així, gràcies a aquest complex es pot establir una relació entre les CDK i la degradació de proteïnes ⁴⁶.

APC/C

APC/C també forma part de la família de les RING E3 ubiquitina ligasa. No obstant això, tot i també tenir una subunitat *Cullin* (*Apc2*) no forma part de la família de CRL. APC/C és un complex molt més gran i complex que les CRL, està format per 14 subunitats evolutivament conservades i mesura aproximadament 1.2 MDa, fet que ha complicat molt l'estudi de la seva estructura ⁴⁸.

A la **figura 4** es mostra la seva estructura i la posició que ocupa cada subunitat.

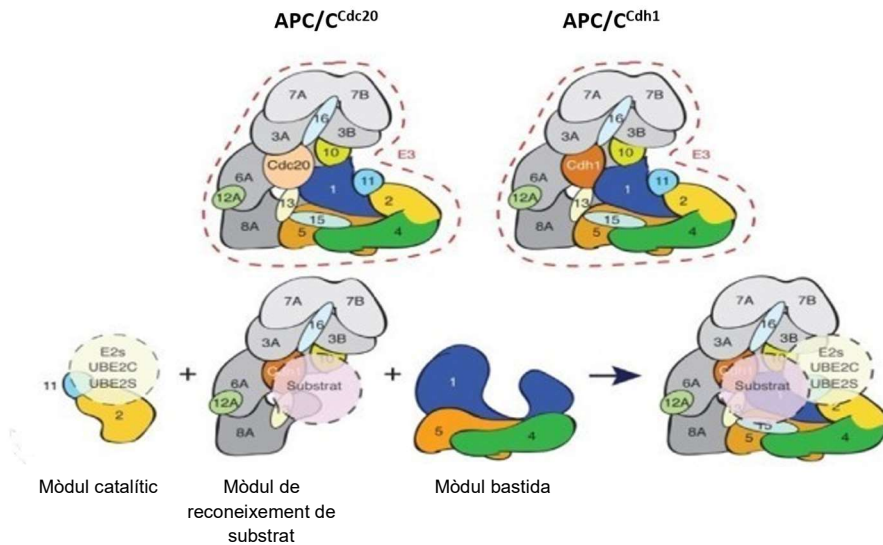


Figura 4. Components d'APC/C. Extreta i modificada de "APC/C: current understanding and future perspectives"⁴⁸.

Atès a la gran quantitat de subunitats, es divideix en 3 subcomplexos o mòduls diferents:

- **Mòdul catalític:** està format per la subunitat RING (Apc11) i la subunitat *Cullin* (Apc2). Aquest mòdul podria catalitzar per si sol la ubiquitinització dels substrats d'APC/C, però tindria una especificitat i possibilitats de regulació baixa. S'ha vist com el domini RING no només uneix la E2-ubiquitina, sinó que també participa en la ubiquitinització dels substrats a través dels dos ions de zinc que és capaç d'unir aquest domini^{48,49}.
- **Mòdul de reconeixement de substrat:** és el que uneix el substrat a APC/C. També es coneix com a com a lòbul TPR (*tetratricopeptide repeat*). El formen 4 subunitats TPR (Apc7, Apc3, Apc6 i Apc8) que formen un homodímer estabilitzat per Apc12, Apc13 i Apc16. Hi ha 2 subunitats que interaccionen amb l'homodímer: Apc10 i **Cdc20** o be Apc10 i **Cdh1**. El reconeixement del substrat es dona a través d'aquestes dues subunitats, que reconeixen diversos motius de degradació (degrons) com la *destruction box* (*D-box*), la KEN-box o el motiu

ABBA. La subunitat Apc15 també forma part d'aquest mòdul i està involucrada en l'intercanvi de Cdc20 per Cdh1, ja que només una d'aquestes dues proteïnes pot formar part d'APC/C. Cdh1 té una especificitat més àmplia que Cdc20, és a dir, reconeix un major nombre de proteïnes.

- Mòdul bastida (*scaffolding*): Aquest mòdul uneix el subcomplex catalític i el de reconeixement. Està format per Apc5, Apc4 i Apc1. També regula l'activació d'APC/C, ja que Apc1 es fosforila per tal d'activar-la.

El domini Apc2 juntament amb el RING, que uneix una E2 conjugada amb una ubiquitina, intervenen en la transferència de la ubiquitina a la proteïna diana. A més del domini RING, s'ha vist com Apc4 també és capaç d'unir una altra E2-ubiquitina de manera independent de RING. Aquesta altra E2-ubiquitina també interaccionarà amb Apc2 per la seva transferència. La primera ubiquitinització es produeix amb la E2-ubiquitina unida a RING i l'altra pot allargar la cadena d'ubiquitina o ubiquitinitzar altres residus de la proteïna, fet que produeix un millor reconeixement pel proteasoma i, per tant, una degradació més ràpida de la proteïna ^{48,50,51}.

Així, com en el cas de SCF, les proteïnes *F-box* són les encarregades de reconèixer i unir el substrat que s'ubiquitinitzarà, en APC/C Cdc20 i Cdh1 no només reconeixen la proteïna diana, sinó que al unir-se a APC/C també produeixen canvis conformationals en tot el complex que fan que estigui en una conformació òptima per a què es puguin carregar les E2-ubiquitina. Per això, Cdc20 i Cdh1 es consideren coactivadors d'APC/C. Aquests es troben inhibits per fosforilació i, per tant, per a què es puguin unir i activar a APC/C abans s'han de desfosforilar ^{48,50,52,53}.

Per a què puguin accedir els coactivadors APC/C s'ha de fosforilar en la subunitat Apc1. Aquest fet produeix un canvi conformational en la subunitat que permet l'entrada dels coactivadors. En mitosi la fosforilació és dependent de CDK1-ciclina B. Primer, la CDK1-ciclina B fosforila a Apc3 en múltiples residus d'un mateix *loop*. Les proteïnes CK reconeixen les fosforilacions produint la unió del complex CK-CDK1-

Ciclina B a APC/C. La unió estimula la fosforilació d'Apc1 que permet la entrada del coactivador Cdc20^{48,54}.

L'activitat d'APC/C també es pot inhibir gràcies a proteïnes com MCC (*mitotic checkpoint complex*), Mad2B i Emi1 (*Early mitòtic inhibitor*). El complex MCC (format per Mad2, BubR1, Bub3 i Cdc20) actua inhibint a APC/C quan es troba unit a Cdc20 (APC/C^{Cdc20}) i Mad2B quan està unit a Cdh1 (APC/C^{Cdh1}). Ambdós inhibidors eviten l'alliberament de la proteïna diana bloquejant així l'enzim. En canvi, Emi1 pot inhibir tant a APC/C^{Cdc20} com a APC/C^{Cdh1} al bloquejar l'activitat de l'enzim i així inhibir la ubiquitinació de les proteïnes diana^{48,55-57}.

1.3. PROGRESSIÓ EN EL CICLE CEL·LULAR

1.3.1. FASE G1

Al principi de la G1 l'activitat CDK-ciclina és baixa, això es deu a que APC/C^{Cdh1} està actiu i, per tant, degrada les ciclines A i B, que són les que tenen major activitat durant la G2 i la mitosi respectivament^{17,48}. Com s'ha esmentat anteriorment, la entrada i progressió en el cicle cel·lular està marcada per l'activació de gens regulats per la família de factors de transcripció E2F^{14-17,58}. Aquests gens al principi es troben fortament reprimits per la unió dels factors E2F amb proteïnes de la família Rb, també anomenades *pocket proteins* (pRB, p107 i p130). Aquestes proteïnes funcionen com a frens en la progressió en el cicle cel·lular, i fins que la cèl·lula no rebi els estímuls adients per a dividir-se, la mantindran fora d'aquest. La híper-fosforilació de les proteïnes Rb promou la separació completa dels complexos E2F-RB i indueix l'expressió dels gens regulats per E2F. Aquests gens estan relacionats amb la replicació del DNA i la progressió en el cicle cel·lular. La proteïna Rb conté fins a 15 residus fosforilables¹⁴⁻¹⁷.

Al principi els nivells de ciclina D són baixos, i quan la cèl·lula rep els estímuls extracel·lulars per a què es divideixi (mitògens), s'activen diverses vies de senyalització que provoquen, entre altres efectes, l'expressió de la ciclina D i la formació del complex amb la CDK4 o CDK6. A més a més, aquestes vies de senyalització activades per mitògens, també inhibeixen a GSK3 β , un enzim que té una elevada

activitat en cèl·lules quiescents. GSK3 β fosforila la ciclina D, i així l'expulsa del nucli al citoplasma, on una CRL E3 ubiquitina ligasa la ubiquitinitza per a què la degradi el proteasoma. Aquesta fosforilació la poden reconèixer diverses F-box de SCF (SKP2, FBXW8, FBXO4, FBXO25, FBXO31) i CRL7 (FBXW8), depèn de la F-box que estigui activa en aquell moment ^{23,59,60}.

A banda dels mitògens també hi ha antimitògens, que són molècules que activen vies de senyalització que actuen de manera oposada a les estimulades pels mitògens, derivant per exemple l'expressió de proteïnes com p15^{INK4b} que inhibeix els complexos CDK4/6-ciclina D. Per tant, per a què la cèl·lula entri en el cicle cel·lular i assolixi nivells elevats d'activitat CDK4/6-Ciclina D, els mitògens han de mantenir i crear unes condicions favorables per a la divisió cel·lular que contrarestin els efectes negatius dels antimitògens ^{4,61}.

CDK4/6-Ciclina D fosforila a Rb (monofosforilació), i l'inactiva parcialment, permetent l'expressió d'alguns dels gens controlats per E2F, entre ells el de la ciclina E ^{58,62}. Durant la G1, l'activitat del complex CDK2-ciclina E augmenta progressivament, fins que al final, produeix la hiperfosforilació de Rb i l'activació completa dels gens que promouran la replicació del DNA i la progressió en el cicle. Un cop activats aquests gens, la proporció de mitògens i antimitògens ja no és important, la cèl·lula queda compromesa a dividir-se, tot i que deixi de rebre estímuls per a la divisió cel·lular ^{17,63}.

Durant la G1 és fonamental l'activitat d'APC/C^{Cdh1}, que juntament amb Rb, mantenen aquesta fase del cicle. APC/C^{Cdh1} ubiquitinitza les ciclines A i B, importants en fases posteriors, i també a Cdc25A, que és la fosfatasa que activa a CDK2 i CDK1. APC/C^{Cdh1}, a més d'estar involucrat en la degradació de proteïnes importants per les fases següents, també està involucrat en esdeveniments propis de la G1, com la càrrega dels complexos de prereplicació, procés que tractarem en major profunditat en seccions posteriors. Per la transició a la fase S, a part de la inactivació completa de Rb també s'ha d'inactivar APC/C^{Cdh1}

64-66.

La transició a la fase S requereix una elevada activitat de CDK2-ciclina E, i aquesta no arriba fins al final de la G1. Durant la G1 els complexos CDK2-ciclina E es troben inhibits per p21 i p27. A més a més, la fosfatasa Cdc25A és important per a l'activitat de CDK2-ciclina. Durant la G1 els nivells de Cdc25A són reduïts, perquè, per una banda, E2F regula la seva expressió i per l'altra, APC/ C^{Cdh1} la ubiquitinitza, fent que el proteasoma la degradi ^{67,68}.

Els inhibidors Cip/Kip (p21 i p27) inhibeixen l'activitat de CDK2-Ciclina, però en canvi al unir-se a CDK4/6-Ciclina D promouen la seva activitat. Això implica que a l'augmentar l'expressió de ciclina D, i per tant la quantitat de complexos CDK4/6-Ciclina D, aquests s'uniran a p21 i p27. De manera que disminueix la quantitat de p21 i p27 que queda lliure i així es redueix progressivament la inhibició que fan en CDK2-Ciclina E ^{4,17,69}. A més a més, CDK2-ciclina E, és capaç de fosforilar a p27, fent que en el moment que s'activi l'expressió de Skp2, SCF^{Skp2} pugui ubiquitinitzar-la i així el proteasoma la pugui degradar ^{4,23}.

Entre els gens regulats per E2F també es troben Emi1 i Skp2. Això fa que quan s'activen aquests gens, per una part, Emi1 inhibeix a APC/C^{Cdh1} evitant la degradació de la ciclina A i Cdc25A, i per l'altra, es produeix l'activació de SCF^{Skp2} que derivarà en la degradació de p21, p27 i ciclina D. APC^{Cdh1} també reconeix i ubiquitinitza a Skp2, de manera que fins que no hi ha aquesta activació completa de l'expressió dels gens regulats per E2F, i l'activació de SCF^{Skp2}, no es pot materialitzar la inhibició d'APC^{Cdh1}. L'activació completa d'E2F i la inhibició irreversible d'APC^{Cdh1} es considera el punt de no retorn en la entrada en el cicle, ja que és imprescindible per fer la transició de G1 a S ^{17,64,70,71}.

1.3.2. FASE S

Un cop es dona la transició a la fase S, el proteasoma degrada la ciclina E. Això succeeix per dues vies dependents de les E3 ubiquitina ligasa CRL. Per una part CRL3^{RhoBTB3} reconeix la ciclina E no unida a CDK2, i per una altra, SCF^{FBW7} reconeix la ciclina E fosforilada a diversos residus ⁷²⁻⁷⁴. A més a més s'ha vist que SCF^{SKP2} també pot ubiquitinitzar la ciclina E quan està fosforilada en el residu tirosina 380 ⁷⁵.

La reducció de la ciclina E i l'increment de la ciclina A afavoreix el canvi de CDK2-ciclina E per CDK2-ciclina A, que promourà la replicació del DNA durant la fase S ^{76,77}. L'activitat CDK2-ciclina A es manté elevada ja que APC/C^{Cdh1} continua inactiu gràcies a l'expressió d'Emi1 i a la pròpia activitat CDK2-ciclina A. A més a més, SCF es troba actiu i manté la degradació dels inhibidors p21 i p27 ^{4,23,48,70}.

La replicació del DNA és la que controlarà el moment d'inici de la mitosi. Quan la cèl·lula finalitza la replicació del DNA s'activaran les quinases Plk1 i CDK1, que durant la G2 prepararan i conduiran la cèl·lula a la mitosi ^{78,79}.

1.3.3. FASES G2 I M

Quan la cèl·lula ja ha replicat el DNA, el complex CDK1-Ciclina A fosforila a Bora, un cofactor de la proteïna Aurora A i així indueixen l'activació de Plk1, que fosforilarà el factor de transcripció FoxM1 ^{78,80-82}.

De la mateixa manera que la replicació del DNA es promou gràcies a l'activació dels gens regulats per E2F durant la G1, el factor de transcripció FoxM1 és l'encarregat d'activar la transcripció de gens clau en la mitosi. FoxM1 es troba inactiu fins que Plk1 el fosforila per tal d'activar-lo ⁸¹.

El complex CDK1-Ciclina B és el que indueix i controla la mitosi. Al principi de la G2 aquest es troba inhibït gràcies a la fosforilació que fa la quinasa Wee1. Quan s'activa FoxM1 s'activa la transcripció de gens com ciclina B, la fosfatasa CDC25 o Plk1. De manera que quan els nivells d'aquestes proteïnes és elevat, la fosfatasa CDC25 pot activar el complex CDK1-ciclina B en eliminar la fosforilació que la inhibia.

Tot i la importància del complex CDK1-Ciclina B, és important destacar que en absència de ciclina B, la ciclina A la pot compensar i promoure l'entrada en mitosi. De fet, durant la G2, la ciclina A és essencial per induir la mitosi ^{83,84}. Els complexos CDK1-Ciclina A i CDK1-ciclina B

fosforilen més de 1000 proteïnes que intervenen en la mitosi, i en la majoria de fosforilacions hi pot participar qualsevol d'aquests dos complexos ⁸⁵. A més a més, altres quinases com Plk1, Aurora A i Aurora B també participen en la fosforilació de proteïnes necessàries per la mitosi ⁸⁶.

CDK1 afavoreix la seva pròpia activació gràcies a que fosforila a Wee1. Aquesta fosforilació produeix la sortida de Wee1 del nucli al citoplasma, on es podrà unir a SCF^{βTrCP}, que l'ubiquitinitzarà per a què la degradí el proteasoma ^{87,88}. Per altra banda, la fosfatasa PP2A:B55 és una de les fosfatases antagoniques principals de CDK1. És imprescindible per a la sortida de la mitosi, quan l'activitat de CDK1 és baixa. Així que per a l'activació i funcionament de CDK1 és important que es trobi inhibida. La inhibició de PP2A:B55 també és depenent de CDK1, de manera que a mesura que s'activi i augmenti la seva activitat, la fosfatasa s'anirà inhibint i es podran contrarestar els seus efectes ⁸⁹.

Així doncs, es pot veure com al principi de la G2 l'activació de la CDK1 es troba reprimida a diferents nivells: nivells de ciclina B i CDC25 baixos i una elevada activitat de Wee1 i PP2A:B55. Aquestes inhibicions es poden reduir en part per la pròpia activitat CDK1, fent que al final de la G2 els nivells siguin prou elevats com per revertir de manera eficient aquestes inhibicions i conduir la cèl·lula a la mitosi ⁸⁸.

Un cop la cèl·lula entra en mitosi, aquesta progressa fins a la metafase, i quan tots els cinetocors es troben units als microtúbuls es produeix l'activació de l'APC/C^{Cdc20}, que degradarà proteïnes claus com la ciclina B i la securina, promovent la separació de les cromàtides germanes i la transició de metafase a anafase ⁹⁰.

Aquesta activació es deu en part a l'activitat CDK1, que fosforila i inhibeix a Emi1, i per altra banda també fosforila a APC/C activant-lo. No obstant això, CDK1 també fosforila a Cdh1 i Cdc20 inhibint-los. Això implica que el complex APC/C^{Cdc20} està format però inactiu fins que la fosfatasa PP2A elimina la fosforilació de Cdc20 i activa definitivament el complex ^{48,91}.

Quan Cdh1 es troba fosforilat es desplaça al citoplasma, per això, al principi de la mitosi, APC/C^{Cdc20} és el complex predominant. Un cop s'inactiva la CDK1 per la degradació de les ciclines i incrementa l'activitat de les fosfatases, Cdh1 es pot defosforilar i es produeix el canvi en APC/C de Cdc20 per Cdh1^{48,92-94}. APC/C^{Cdh1} estarà actiu durant el final de la mitosi i la següent G1, on si la cèl·lula torna a entrar al cicle cel·lular, s'inhibirà al final de la G1⁶⁴.

2. REPLICACIÓ DEL DNA

Els llocs del genoma on es pot iniciar la replicació es coneixen com a orígens de replicació. En eucariotes -amb l'excepció d'alguns llevats com *S. Cerevisiae*- els orígens de replicació no tenen una seqüència consens, a diferència dels de procariotes, que si la tenen ⁹⁵⁻⁹⁸. Així doncs, els orígens no depenen de la seqüència, però sí que estan condicionats per la combinació de diversos factors com el posicionament dels nucleosomes o la riquesa en guanines, ja que s'ha vist que es troben a zones lliures de nucleosomes o properes a G-quàdruplexs ^{99,100}.

2.1. HABILITACIÓ DELS ORÍGENS

Durant el final de la mitosi i la fase G1, hi ha proteïnes que s'uneixen a l'origen de replicació i formen el complex de pre-replicació. Aquest primer pas d'habilitació dels orígens és el que es coneix com a *origin licensing* ¹⁰¹.

La primera proteïna que s'uneix als orígens és **ORC** (*Origin Recognition Complex*), format per sis subunitats conservades en eucariotes ^{97,102,103}. ORC promou la càrrega del complex **Mcm2-7**. Aquest complex és una helicasa necessària durant la replicació, composta per sis subunitats que formen un hexàmer. Als orígens de replicació es carreguen dos complexos de Mcm2-7 de manera seqüencial i que queden enfrontats un amb l'altre. Així, durant la fase S es pot iniciar la replicació de manera bidireccional a partir d'un mateix origen ^{104,105}.

Per a carregar les dues helicases, no és suficient amb la unió d'ORC a la cromatina. ORC actúa de manera conjunta amb dos cofactors Cdc6 i Cdt1. Cdc6 interacciona amb ORC i Cdt1 amb MCM2-7 per poder carregar l'helicasa al DNA. Un cop es carrega la segona unitat de MCM2-7 és quan es forma del tot el complex de pre-replicació, que no es podrà activar fins a la fase S ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

A la **figura 6** es mostren els diferents passos i les proteïnes involucrades en la càrrega de les helicases.

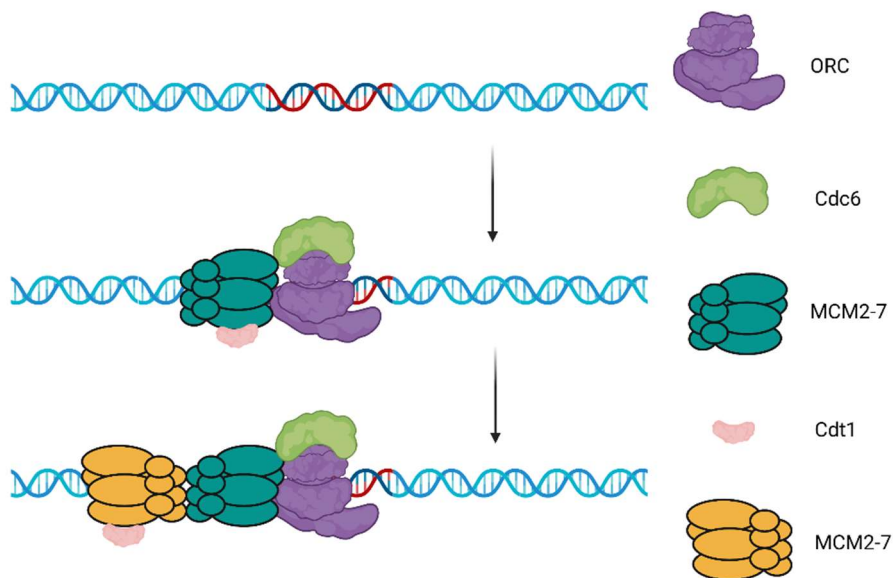


Figura 6. Càrrega dels orígens de replicació. Adaptada de “*Single-Molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading*”¹⁰⁵. Figura realitzada amb BioRender.com.

Aquesta separació entre l'habilitació (fase M-G1) i l'activació (fase S) és fonamental per a evitar la re-replicació, que derivaria en inestabilitat genòmica¹⁰⁷. La separació s'aconsegueix gràcies a que al final de la mitosi i durant la fase G1 APC/C es troba actiu i els orígens es poden habilitar però no activar. Amb l'entrada en fase S, APC/C s'inactiva, afavorint l'activació dels complexos de pre-replicació però impedit que se'n carreguin de nous⁶⁵.

La inhibició de la formació del complex de replicació es fa a través de la geminina i CDK2-Ciclina A. La geminina s'uneix a Cdt1 segregant-la. A més a més, CDK2-ciclina A fosforila a Cdt1 -fent que SCF^{SKP2} la pugui reconèixer- i a Cdc6, fent que surti del nucli. Així doncs, si la geminina i el complex CDK2-Ciclina A es troben actius, no es poden carregar les MCM2-7 als orígens de replicació. Durant la G2 la formació de complexos de pre-replicació també està inhibida, perquè SCF^{Ciclina F} degrada la Cdc6 que hi hagi al nucli.¹⁰⁸⁻¹¹²

APC/C^{Cdh1} reconeix i ubiquitinitza tant a geminina com la ciclina A, fent que el proteasoma les degradi. D'aquesta manera permet la formació dels complexos de pre-replicació. Així que amb APC/C^{Cdh1} actiu (fase

G1) es poden habilitar els orígens de replicació. A més a més, com que l'activitat CDK2-Ciclina A és necessària per l'activació dels orígens de replicació, els orígens habilitats a la G1 no es podran activar. Quan a la entrada en la fase S s'inactiva a APC/C^{Cdh1}, es permet que els complexos de replicació s'activin i s'iniciï la replicació, però no se'n podran formar de nous^{65,113}. Aquest eix oposat entre geminina i ciclina A amb APC/C és el que permet que un cop comenci la replicació no es puguin tornar a habilitar nous orígens.

2.2. ACTIVACIÓ DELS ORÍGENS

Per que es formi el replisoma, primer s'ha de desenrotllar el DNA a l'origen de replicació, i així es puguin carregar totes les proteïnes que el formaran. Durant la G1 les MCM2-7 carregades es troben inactives. Un cop la cèl·lula entra en fase S, l'activitat de la **DDK** (*Dbf4-dependent kinase*) augmenta i fosforila les MCM2-7 a les subunitats Mcm2, Mcm4 i Mcm6, per tal d'activar-les. El complex DDK està format per dues proteïnes: la quinasa **Cdc7** i la subunitat reguladora que l'activa, que és la proteïna ASK (en llevats Dbf4), i assoleix el seu màxim d'expressió a la fase S¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Les fosforilacions en MCM2-7 permeten que es reclutin altres proteïnes que conformaran l'helicasa activa. L'helicasa activa es forma quan s'uneixen **Cdc45** i el complex **GINS**, format per Sld5, Psf1, Psf2 i Psf3. El conjunt d'aquestes proteïnes s'anomena **CMG (Cdc45-MCM-GINS)**. CMG té una activitat helicasa robusta i cada CMG (format a partir de cada una de les dues Mcm2-7) es mourà en la direcció oposada a l'altre i així es podrà replicar el DNA de manera bidireccional.

Així com en el complex de pre-replicació Mcm2-7 es troba unit a les dues cadenes de DNA, CMG només està unit a la cadena líder i es mou en direcció 3'→5'^{117,118}.

La replicació requereix d'altres proteïnes a més del CMG, així que durant l'activació, a banda d'aquestes proteïnes que constitueixen el CMG, s'uniran altres elements del replisoma. El conjunt de totes

INTRODUCCIÓ

aquestes proteïnes és el que es coneix com complex de preinici de replicació ^{76,77}.

A més de les fosforilacions de les DDK, per activar els orígens de replicació CDK2 també fosforila proteïnes que formen part del replisoma. Per a què es carreguin Cdc45 i GINS a les Mcm2-7 fosforilades per les DDK, abans aquestes proteïnes s'han d'associar per carregar-se de manera conjunta. Per a aquesta associació és imprescindible l'activitat CDK2. En eucariotes superiors aquesta agrupació de proteïnes està mediada per TopBP1, que actua com a plataforma on s'uneixen diverses proteïnes com Treslin, DUE-B, GEMC1 i RecQ4. Aquestes proteïnes formen part del replisoma i actuen com a nexes d'unió entre CMG i la polimerasa ϵ , ja que s'acoblen a Cdc45, GINS i la polimerasa ϵ , i les uneixen a les Mcm2-7 formant el complex de preinici de replicació. ^{76,77}.

La formació del complex de preinici de replicació s'ha estudiat més en profunditat en llevats que en eucariotes superiors i entre ells s'ha vist que hi ha diverses diferències. En llevats les fosforilacions de CDK2 a Sld3 i Sld2 promouen la seva interacció amb Dbp11 i formen el complex amb Cdc45 i GINS, ja que Sld3 interacciona amb Cdc45 i Sld2 amb GINS. Les proteïnes homòlogues en eucariotes superiors són: Treslin, RecQ4 i TopBP1 respectivament ^{76,77}.

Tot i que en eucariotes superiors CDK2 també fosforila a Treslin per tal que pugui interaccionar amb TopBP1, també hi ha altres proteïnes involucrades en el reclutament de Cdc45 ^{119,120}. En eucariotes superiors el reclutament de Cdc45 el fan conjuntament Treslin, DUE-B i GEMC1 ^{121,122}.

DUE-B és important per a la formació del complex de preinici, i interacciona amb TopBP1, Treslin i Cdc45. En canvi, a diferència de Treslin, no s'ha descrit que CDK2 la fosforili ^{123,124}. Per altra banda, GEMC1 també interacciona amb TopBP1 i Cdc45. Malgrat que no és imprescindible per la interacció, quan CDK2 fosforila a GEMC1 l'afinitat per TopBP1 augmenta ^{76,125}.

En llevats Sld2 (l'homòleg de RecQ4) interacciona amb Dbp11 (l'homòleg de TopBP1) gràcies a la fosforilació de CDK2. A més a més, també s'uneix a GINS i a una subunitat de la polimerasa ϵ . En canvi, en eucariotes RecQ4 interacciona amb TopBP1 i Mcm2-7, però aquesta no depèn de fosforilació ni tampoc és essencial per a la interacció de GINS amb Mcm2-7. No obstant això, és una proteïna rellevant per a l'inici de la replicació, ja que a part de contribuir a la unió d'aquestes proteïnes (tot i no ser essencial), gràcies a la fosforilació que fan les CDK, afavoreix l'activitat helicasa del complex, que és important per a l'obertura de la doble hèlix que fan MCM2-7. Les MCM2-7 passaran d'englobar les dues cadenes de DNA (complex de pre-replicació) a només unir-se a la líder (complex de preinici). RecQ4 també promou la càrrega de la polimerasa α a la cromatina en *Xenopus* ^{118,126-129}.

A banda d'aquest complex, en la formació del complex de preinici també hi participa Mcm10. Aquesta proteïna s'uneix a Mcm2-7 i intervé en l'obertura inicial del DNA a l'origen de replicació. També estabilitza l'associació de MCM2-7 a Cdc45 i GINS. A més a més, s'ha vist que interacciona directament amb RecQ4 i promou la seva unió a les Mcm2-7. Quan CDK2 fosforila a RecQ4, Mcm10 deixa d'interactuar amb RecQ4 i s'estimula l'activitat helicasa ¹³⁰⁻¹³⁴.

A la **figura 7** es detalla la formació del complex de preinici i les fosforilacions que realitzen les DDK i CDK2.

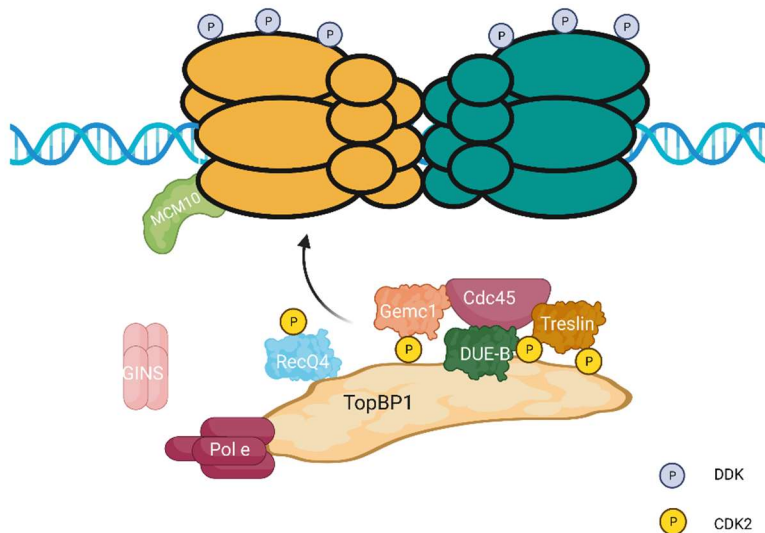


Figura 7. Formació del complex de preinici. Adaptada de “*GEMC1 is a novel TopBP1-interacting protein involved in chromosomal DNA replication*”⁷⁶ i “*DNA Replication from Old Principles to New Discoveries*”¹⁰¹. Realitzada amb BioRender.com.

2.3. FORMACIÓ DEL REPLISOMA I REPLICACIÓ

Un cop format el complex de preinici, el DNA es desenrotlla a l’origen de replicació, es carreguen les últimes proteïnes que formaran part del replisoma i s’inicia la replicació. Entre aquestes proteïnes trobem la polimerasa α , que genera fragments curts de RNA anomenats encebadors. A partir dels encebadors canvia a la seva activitat de DNA polimerasa i sintetitza un petit fragment de DNA^{118,135}. Mcm10 i AND-1 són les proteïnes que intervenen en el reclutament de la polimerasa α ¹³⁶. AND-1 funciona com a centre organitzador, interacciona i uneix a varies proteïnes al replisoma^{135,137,138}. En aquest cas constitueix un pont entre CMG i la polimerasa α , ja que interacciona amb les dues proteïnes. S’ha vist que podria unir fins a dues polimerases millorant així la eficiència en l’inici de la replicació^{139,140}. En llevats també s’ha descrit que Mcm10 estabilitza la polimerasa α a la cromatina, i que pot

interaccionar amb ella i amb CMG, igual que AND-1 (en aquest cas el seu homòleg, Ctf4) ^{118,141,142}.

Amb la síntesi dels encebadors, RFC (*Replication factor C*) hidrolitza ATP i carrega a PCNA (*Proliferating Nuclear Antigen*). PCNA és una proteïna que té forma d'anell i funciona com una abraçadora que envolta el DNA i es mou al llarg d'ell. També s'uneix a la polimerasa que sintetitza el DNA i augmenta la seva processivitat ^{118,143-145}.

La replicació del DNA es realitza en sentit 5'→3', això implica que una cadena es sintetitza de manera contínua (cadena líder) i l'altre ho ha de fer per fragments, ja que la síntesi del DNA es produeix en sentit oposat al de la progressió de l'helicasa CMG (cadena retardada) ^{101,118}.

La cadena líder la replica la **polimerasa ϵ** , que es troba unida a CMG, i, per tant, la polimerasa replica mentre avança l'helicasa. La replicació de la cadena retardada la controlen la **polimerasa α** i la **polimerasa δ** . La polimerasa α és la que sintetitza els encebadors de RNA, i posteriorment replica un petit fragment de DNA. A partir d'aquest fragment, la polimerasa δ replica la resta que queda fins arribar al següent encebador ¹⁴⁶⁻¹⁵⁰. Aquests segments que es generen s'anomenen fragments d'Okazaki. L'activitat de la polimerasa δ pot desplaçar els encebadors de RNA del DNA del fragment anterior i replicar aquella zona, per així tenir tot el fragment format per DNA. Després la ligasa I serà l'encarregada d'unir els fragments i les nucleases degradaran els encebadors de RNA desplaçats ^{151,152}.

Amb la formació de la bombolla de replicació, el DNA de doble cadena s'obre i durant el procés s'exposa DNA de cadena senzilla (ssDNA), que és més fràgil que quan està en doble cadena (dsDNA). Això ocorre sobre tot amb la cadena retardada, que com que es sintetitza en fragments durant la seva replicació s'exposa ssDNA. Per protegir aquest ssDNA vàries molècules d'RPA s'uniran a ell ^{118,153}.

A la **figura 8** es mostra l'estructura del replisoma durant la replicació explicada en aquesta secció.

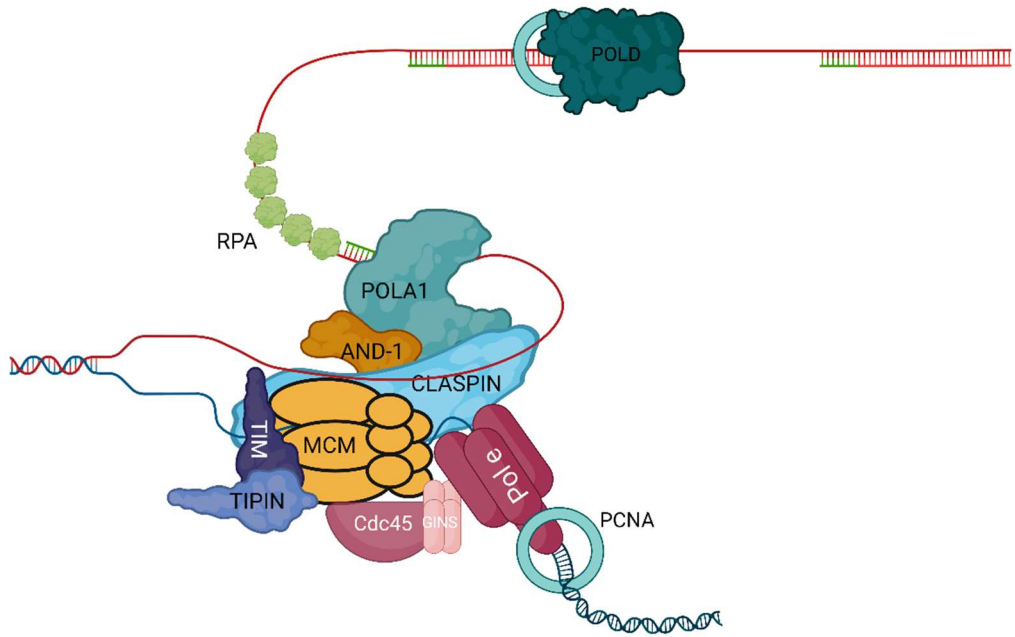


Figura 8. Estructura del replisoma. Adaptada de “Spotlight on the Replisome: Aetiology of DNA Replication-Associated Genetic Diseases”¹⁵⁴. Realitzada amb BioRender.com.

3. ESTRÈS REPLICATIU

Un cop avança la forqueta de replicació, aquesta es pot alentir o parar. Aquest fenomen és el que es coneix com estrès replicatiu. El que succeeix és que fruit d'aquest alentiment o parada s'exposa ssDNA, i com que és més fràgil i susceptible de ser degradat per les nucleases, comporta un perill per l'estabilitat genòmica. En funció de la severitat i el temps que duri la parada, la cèl·lula activarà diferents mesures de resposta, dirigides a preservar la integritat del genoma ^{155,156}.

Les causes d'aquest estrès replicatiu són molt diverses i poden ser tant exògenes com endògenes. Si s'eliminen les causes/obstacles que provoquen l'estrès, la forqueta pot progressar.

3.1. CAUSES DE L'ESTRÈS REPLICATIU

3.1.1. BARRERES FÍSiques

En aquest grup s'engloben els obstacles que redueixen o aturen la progressió de la forqueta. Aquests obstacles poden produir estrès replicatiu alterant la capacitat de les helicases per desenrotllar el DNA o també afectant directament les polimerases. Es coneixen com a barreres per la forqueta de replicació ^{157,158}.

També estan incloses les lesions al DNA, que es poden produir de diferents maneres com espècies reactives d'oxigen (ROS), radiació ultraviolada, mutàgens químics o productes del metabolisme. La polimerasa no reconeix aquestes lesions com a un motlle vàlid per sintetitzar la cadena nova i es para ¹⁵⁷⁻¹⁶¹.

Aquestes lesions poden ser tant trencaments simples o dobles en la cadena de DNA (*single strand break* [SSB] o *double strand break* [DSB]), com els adductes o l'encreuament (*cross-link*) entre cadenes. També hi ha agents endògens, ambientals o utilitzats en quimioteràpia que poden produir l'encreuament entre proteïnes i DNA, formant també una barrera per a la progressió de la replicació ¹⁶²⁻¹⁶⁴.

En aquests casos s'activaran mecanismes de reparació per poder recuperar la replicació ^{157,158,161}.

Per altra banda, no només les lesions al DNA formen barreres per a la forquilla de replicació. Hi ha estructures secundaries del DNA que poden actuar com a tal. Entre aquestes estructures podem trobar les forquilles, les estructures cruciformes, els G-quadruplexos, que es poden trobar tant per la composició de la seqüència de DNA (seqüències altament repetitives) com per processos fisiològics com la transcripció i la reparació ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

La condensació de la cromatina també és un factor clau en l'estrès replicatiu. La disminució d'heterocromatina pot produir estrès replicatiu en incrementar la possibilitat de transcripció i activació d'òrgens. Així doncs, la pèrdua d'activitat de complexos de la cromatina pot induir estrès replicatiu ^{158,168}.

3.1.2. COL·LISIONS REPLICACIÓ-TRANSCRIPCIÓ

També pot ocórrer que la maquinària de replicació col·lideixi amb la de transcripció, provocant que aquesta es pari. S'ha vist com, fruit d'aquest fenomen, es pot produir una reestructuració cromosòmica o recombinació associada a la transcripció ¹⁶⁹.

Les topoisomerases són essencials per desfer el superenrotllament positiu que es genera en aquests encontres, i així protegir la integritat del genoma ¹⁷⁰. Després de les col·lisions entre les dues maquinàries es poden produir *R-loops*, que són estructures on interacciona el RNA transcrit amb una cadena del DNA i per tant, s'exposa el ssDNA de l'altre. Els *R-loops* resultants poden produir recombinació associada a la transcripció ^{171,172}.

Per a prevenir i protegir dels efectes de les col·lisions entre replicació i transcripció, a part de la intervenció de topoisomerases, també actuen complexos implicats en la maduració de mRNA. A més a més, la cèl·lula té altres estratègies per prevenir aquestes col·lisions. La major part de la transcripció ocorre durant la G1 i els gens que es transcriuen en fase S estan físicament separats de les forquetes de replicació. Tot i aquestes mesures, es poden donar aquestes col·lisions, derivant entre altres coses, en la formació de *R-loops*, que s'hauran d'eliminar gràcies

a l'acció de nucleases especialitzades i altres proteïnes per a què la forqueta de replicació pugui avançar ^{155,158,161,171,173,174}.

3.1.3. ALTERACIONS EN FACTORS LIMITANTS

Els nivells de desoxiribonucleòtids també són un factor essencial en el progrés de la forqueta de replicació. El seu dèficit provoca que la forqueta s'alenteixi o en casos més severes, es pari. Per tant, la replicació i la síntesi de nucleòtids han d'estar molt vinculades per tal d'evitar l'estrès replicatiu. Els nivells de desoxiribonucleòtids han d'estar molt controlats, ja que el seu dèficit està relacionat amb un augment en la inestabilitat genòmica i la tumorigènesi, i el seu excés s'ha vist que redueix la fidelitat de les polimerases, incrementant així el nivell de mutacions ^{158,175,176}.

A més dels nucleòtids, els components del replisoma o altres proteïnes involucrades en la progressió de la forqueta també són importants, i el seu dèficit produeix estrès replicatiu. Per exemple, en els gens que codifiquen per proteïnes com la polimerasa ϵ o RPA, es poden produir mutacions hipomòrfiques (que redueixen la funció del gen) que s'ha vist que deriven en un augment en l'estrès replicatiu, que deriva en una major inestabilitat genòmica i tumorigènesi ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

3.1.4. ALTERACIONS EN LA DINÀMICA DELS ORÍGENS DE REPLICACIÓ

Les alteracions en l'activació dels orígens de replicació també produeixen estrès replicatiu. En condicions normals, la cèl·lula carrega més orígens de replicació dels que després utilitzarà. Ho fa perquè si hi ha problemes durant la replicació, aquests puguin servir com a suport i poder replicar la zona conflictiva. S'han descrit mutacions en Mcm4 que redueixen la seva estabilitat i, com a conseqüència, disminueix el nombre d'orígens de replicació carregats durant la G1. Això fa que les cèl·lules tinguin major estrès replicatiu, inclús en condicions control, fent que siguin més propenses a que al final de la fase S quedin zones sense

replicar, tinguin més inestabilitat genòmica i augmenti la tumorigènesi ^{158,180,181}.

És fonamental controlar l'activitat de CDK2 per aconseguir una bona eficiència en l'activació dels orígens de replicació. De fet, alteracions en quinases que restringeixen la seva activitat –com WEE1- incrementen l'activació d'orígens de replicació i redueixen la velocitat de la forqueta de replicació, segurament per baixos nivells de dNTPs o altres factors que intervenen en la replicació ^{182,183}.

3.1.5. EXPRESSIÓ D'ONCOGENS

La sobreexpressió o expressió constitutiva d'oncogens com HRas, Myc o ciclina E també és una font d'estrès replicatiu ^{158,161,184}. L'expressió d'oncogens redueix la durada de la fase G1 i fa que la cèl·lula entri en fase S sense estar preparada. S'ha descrit com aquest escurçament fa que la cèl·lula comenci a sintetitzar el DNA quan encara no s'ha acabat la transcripció de tots els gens que s'han de transcriure durant la G1. De manera que en aquests gens es produirà un major nombre de col·lisions entre replicació i transcripció ^{185,186}. A més a més, la sobreexpressió de c-Myc o la ciclina E també altera la regulació de l'activació dels orígens, fent que l'activació augmenti i disminueixi la quantitat de desoxiribonucleòtids disponibles ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

3.2. RESPOSTA A L'ESTRÈS REPLICATIU

Els *checkpoints* són punts de control del cicle cel·lular. Els formen tota una sèrie de mecanismes que asseguren que el cicle es fa de manera correcta. En la fase S hi poden intervenir el *checkpoint* de replicació i el de dany al DNA. Aquests consten de proteïnes que detecten esdeveniments específics i activen una resposta contra ells, sent capaços de parar el cicle cel·lular si és necessari. El *checkpoint* que detecta i respon a l'estrès replicatiu és el *checkpoint* de replicació ^{4,190,191}.

3.2.1. CHECKPOINT DE REPLICACIÓ

Quan es produeix l'estrès replicatiu es genera un fragment de ssDNA que produeix l'activació del *checkpoint*. En funció de la longitud del fragment hi haurà major o menor activació ¹⁹². Si el bloqueig afecta la cadena líder, es produeix un desacoblament entre les helicases i la polimerasa que permet la formació d'un fragment prou llarg de ssDNA per tal d'activar el *checkpoint* ¹⁹³. En canvi, si només s'encalla la polimerasa de la cadena retardada, el replisoma no es para per complet, ja que aquesta cadena es replica de manera discontinua. La replicació en la cadena retardada es pot reprendre a partir de l'encebador següent ^{194,195}. Per altra banda, si el bloqueig també afecta les helicases no es pot produir el desacoblament, tot i això, les forquetes parades es processen i, gràcies a l'acció de nucleases i helicases o translocases, es genera el ssDNA necessari per tal d'activar el *checkpoint* de replicació ^{196,197}.

ATR és la quinasa clau que promou les funcions del *checkpoint* de replicació. És una proteïna fonamental per a la viabilitat cel·lular, ja que la pèrdua completa de la seva funció provoca la mort en estat embrionari ¹⁹⁸. **ATRIP** (*ATR interactor Protein*) és una proteïna que interacciona amb ATR i amb RPA. De manera que quan es produeixen els fragments de ssDNA durant l'estrès replicatiu, aquests es cobreixen ràpidament per RPA, i el complex **ATRIP-ATR**, interaccionarà amb RPA. Al fragment de ssDNA s'uniran diversos complexos, fent que es localitzin al lloc de l'estrès replicatiu varies molècules d'ATR. Un cop reclutat a la cromatina, ATR s'autofosforila en la treonina 1989. Aquesta fosforilació s'ha vist que es pot produir entre diferents molècules d'ATR. Per a l'activació del *checkpoint* de replicació no es suficient l'autofosforilació d'ATR, abans cal activar-la ¹⁹⁹⁻²⁰¹.

Hi ha dos activadors diferents d'ATR: TopBP1 i ETAA1 ²⁰². Mentre que ETAA1 interacciona directament amb RPA i s'acumula al lloc on hi ha l'estrès replicatiu, TopBP1 requereix d'altres proteïnes que el reclutin on hi ha la polimerasa encallada ^{203,204}. Per reclutar a TopBP1, RPA interacciona amb RFC-Rad17, que carregarà el complex 9-1-1. Aquest funciona com una abraçadora de DNA (semblant a PCNA) i serà el que

carregarà a TopBP1 a la intersecció entre el ssDNA i dsDNA, concretament a la que té l'extrem 5' en el dsDNA ^{158,205,206}. S'ha descrit que TopBP1 no intervé en l'autofosforilació d'ATR. No obstant això l'autofosforilació és necessària per a què TopBP1 interaccioni amb ATR, fent que pugui reconèixer els seus substrats. D'aquesta manera TopBP1 promou l'activitat quinasa d'ATR ²⁰¹.

Quan ATR es troba activat, fosforila a diversos substrats. De tots ells, Chk1 és el principal efector d'ATR en el *checkpoint* de replicació, així que l'eix ATR-Chk1 serà el principal modulador de les seves funcions ²⁰⁷⁻²¹⁰. La fosforilació de Chk1 és depenent de **claspina** ²¹¹. La claspina es troba al replisoma durant la replicació, i en resposta a l'estrès replicatiu CK1γ1 i les DDK la fosforilen ²¹²⁻²¹⁴. La fosforilació de la claspina promou la interacció amb Chk1, reclutant-lo on hi ha l'estrès replicatiu i promovent que ATR el fosforilli ^{211,215-217}. Sense claspina els nivells de fosforilació de Chk1 són baixos ^{216,217}.

ATR fosforila a Chk1 en les serines 317 i 345, fet que estimula l'autofosforilació de Chk1 en la serina 296 ^{218,219}.

A la **figura 9** es pot veure com s'activa el *checkpoint* de replicació explicat anteriorment.

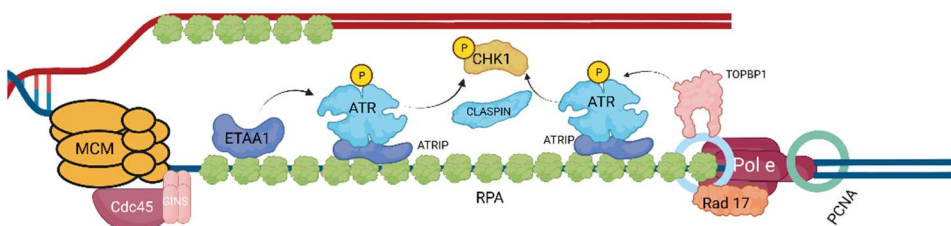


Figura 9. Activació del *checkpoint* de replicació. Adaptada de "DNA damage responses that enhance resilience to replication stress" ²²⁰. Realitzada amb BioRender.com.

FUNCIONS DEL CHECKPOINT

Inhibició de la progressió en el cicle

Chk1 redueix l'activitat tant de CDK2 com de CDK1 per evitar la progressió en el cicle. Per una banda, fosforila la fosfatasa Cdc25A, que serà reconeguda per SCF^{β-TrCP}, ubiquitinilada i degradada pel proteasoma^{221,222}. Per altra banda, Chk1 fosforila a Cdc25C expulsant-la del nucli al citoplasma. Cdc25C intervé en l'activació de CDK1 durant la transició G2-M, per tant, la inhibició que fa Chk1 suprimeix l'activació de CDK1 i evita l'entrada de cèl·lules que no han acabat la replicació a mitosi^{223,224}.

Control de l'activació de nous orígens

L'eix ATR-Chk1 inhibeix l'activació de nous orígens, principalment perquè evita que es carreguin diversos factors del complex de preinici als orígens activats. Utilitza diferents estratègies, per una banda, en reduir l'activitat CDK, no es produeixen les fosforilacions necessàries per formar correctament el complex de preinici¹⁵⁷. Per l'altra, també fosforila a Treslin, impedit així la càrrega de Cdc45 per formar el complex de preinici²²⁵. A més a més, ATR fosforila directament a la histona metiltransferasa MLL, estabilitzant-la i afavorint que s'acumuli a la cromatina. Allà, metilarà la histona 3 dels orígens de replicació, impedit també la càrrega de Cdc45²²⁶.

Rif1 és una proteïna que forma un complex amb PP1 i inhibeix l'activitat de la fosfatasa. PP1 es localitza als orígens de replicació per tal d'eliminar les fosforilacions que fan les DDK. Les CDK fosforilen a Rif1 evitant la seva interacció amb PP1 i així promouen l'activitat de PP1. De manera que una conseqüència de la inhibició de les CDK és l'augment de l'activitat de la fosfatasa PP1, que eliminarà les fosforilacions de Cdc7, disminuint així l'activació del complex MCM2-7²²⁷⁻²³⁰.

Aquesta inhibició de l'activació de nous orígens el que fa és prevenir que nous replisomes puguin patir més estrès replicatiu, i així exhaurir els nivells d'RPA i promoure el trencament del DNA als llocs on hi ha els replisomes encallats. Aquesta ruptura als llocs on hi ha els

replisomes parats es coneix com a col·lapse de les forquetes (*fork collapse*)^{231,232}.

No obstant, amb nivells baixos d'estrès replicatiu, tot i que ATR inhibeix l'activació de nous orígens a altres zones que estaven inactives, en les zones on hi ha l'estrès promou l'activació d'orígens propers per poder acabar de replicar la zona^{233,234}.

Increment dels nivells de dNTPs

S'ha vist com l'activitat de l'eix ATR-Chk1 afavoreix l'acumulació de RRM2, una de les dues subunitats de la ribonucleòtid reductasa. L'increment de RRM2 augmenta la producció de nucleòtids^{235,236}. A més a més, ATR incrementa l'activitat de la deoxicitidina quinasa, un enzim implicat en la reutilització de nucleòtids. Aquest participa en la síntesi de nucleòtids a partir de intermediaris resultants de la degradació de DNA²³⁷. De manera que l'activació del *checkpoint* de replicació incrementa la síntesi de nucleòtids.

Estabilització de la forqueta, reparació i reinici

Quan s'elimina l'obstacle o para l'esdeveniment que impedia la progressió de la forqueta, aquesta es pot reiniciar. De manera que és important mantenir l'estabilitat de la forqueta. No obstant això, si la parada persisteix, tot i activar el *checkpoint* de replicació es produeix el col·lapse de la forqueta, que deriva en la formació de DSB²³⁸.

En estudis amb llevats i alguns en vertebrats s'ha suggerit un paper del *checkpoint* de replicació en l'estabilització del replisoma^{190,239–241}. No obstant això, estudis més recents, tant en llevats com en humans demostren que ATR no intervé en l'estabilització del replisoma, si no en l'estabilització de la forqueta per protegir-la del col·lapse^{242–244}. De fet s'ha descrit que, durant l'estrès replicatiu components del replisoma es desenganxen del DNA naixent, però romanen a la cromatina. Això genera llargs fragments de ssDNA que, malgrat la separació, no afecten a la capacitat de reinici de la forqueta²⁴⁴.

El *checkpoint* de replicació també intervé en la reparació del dany i el reinici de la replicació. Aquestes funcions es desenvoluparan en detall en seccions posteriors.

3.3. RESPOSTA AL DANY AL DNA

Sovint l'estrès replicatiu està vinculat al dany al DNA, i no només cal protegir la forqueta, sinó que també cal reparar la lesió. Quan hi ha dany al DNA la cèl·lula el detecta i respon segons el tipus de lesió que hi hagi. La resposta al dany es coneix com a **DDR** (DNA Damage Response)^{245,246}. El *checkpoint* de replicació també intervé en la reparació. Un dels esdeveniments importants per a la DDR és la fosforilació de la histona H2AX, i ATR és capaç de fosforilar-la per promoure la reparació del dany²⁴⁷. H2AX és una variant de la histona H2A que segons el tipus cel·lular, es troba en el 2-25% dels nucleosomes^{248,249}.

Les causes del dany són diverses i poden ser tant exògenes (radiació ultraviolada, químics genotòxics) com endògenes (Espècies reactives d'oxigen)^{245,246}. En funció del tipus de lesió s'activarà un mecanisme de reparació o un altre. Podem distingir entre:

- *Base Excision Repair*: aquest mecanisme serveix per reparar nucleòtids danyats, trencaments en una cadena (SSB) i llocs abàsics (que han perdut la base nitrogenada)²⁴⁶.
- *Nucleotide Excision Repair*: és el mecanisme de reparació més versàtil. Té dues vies diferents i serveix per reparar SSB, adductes de bases, encreuaments i bases oxidades^{246,247}.
- *Mismatch repair*: reconeix i repara errors en l'aparellament dels nucleòtids o petites deleccions que produeixen les polimerases²⁴⁶.
- *Interstrand crosslink repair*: s'activa quan es produeixen encreuaments en el DNA, és a dir, unions covalents entre les dues cadenes de DNA. Les proteïnes principals en aquesta reparació són les de la via de l'anèmia de fanconi (FA)^{246,250}.
- *Double-strand break (DBS) repair*: És l'encarregat de reparar els trencaments de doble cadena. Hi ha dos mecanismes diferents: la unió d'extrems no homòlegs (**NHEJ**, *Non-Homologous End*

Joining) i la recombinació homòloga (**HR**, *Homologous Recombination*). Un estrès replicatiu prolongat que comporta el col·lapse de les forquetes produeix trencaments de doble cadena, esdeveniment que activa el *checkpoint* de dany al DNA^{246,251}.

3.3.1. ACTIVACIÓ DEL CHECKPOINT DE DANY AL DNA

Quan es produeix el DSB, les proteïnes Ku70/80 s'uneixen ràpidament per protegir els extrems i mantenir-los propers²⁵¹. Després el complex **MRN** detecta el DSB i recluta i activa a **ATM** al lloc on hi ha el trencament. Aquest complex està format per tres proteïnes:

- **MRE11**: És una nucleasa que s'uneix als extrems del DSB i que pot interaccionar amb altres MRE11, podent unir així dos complexos MRN. Gràcies a la seva activitat endonucleasa i exonucleasa, participa en el processament dels DSB i altres estructures diferents (en el context de la HR), tot i que aquesta funció no és essencial per a l'activació d'ATM²⁵²⁻²⁵⁶.
- **Rad50**: és una ATPasa de la família de les SMC (involucrades en el manteniment de l'estructura dels cromosomes) que conté dos dominis que formen una cua llarga que és capaç de interactuar amb les cues d'altres Rad50. Per tant, al interaccionar amb la cua de Rad50 del complex que està unit a l'altre extrem del DSB, es podran mantenir pròxims tant els dos extrems del trencament. També pot mantenir properes les cromàtides germanes per a la recombinació homòloga²⁵³⁻²⁵⁵.
- **Nbs1**: És una proteïna encarregada de les interaccions entre proteïnes i de proteïnes amb DNA. És la proteïna que interacciona amb ATM^{253-255,257}.

ATM es troba formant un homodímer que és inactiu. La seva activació fa que adopti una forma monomèrica, gràcies a la qual podrà interaccionar amb les proteïnes que fosforilarà. Aquesta activació d'ATM depèn de la seva acetilació per part de l'acetiltransferasa Tip60 i de l'autofosforilació en la serina 1981²⁵⁸⁻²⁶¹. Quan ATM està activat fosforila diverses proteïnes, però la principal efectora d'ATM és **Chk2**.

Chk2 fosforilarà proteïnes que derivaran en una parada en el cicle cel·lular i un increment de la recombinació homòloga ²⁶².

A més a més, ATM promou l'amplificació del senyal, ja que, igual que ATR, fosforila les histones H2AX properes (que en la forma fosforilada s'anomenen **γH2AX**). Aquesta fosforilació recluta a MDC1 protegint-la i reclutant més complexos MRN i més ATM. D'aquesta manera gràcies a γH2AX s'amplifica el senyal d'ATM ^{263,264}. No només existeix aquesta amplificació per part de MDC1. ATM també fosforila a Rad17, que promou el reclutament de més complexos MRN a la cromatina ²⁶⁵.

En la via de senyalització dependent d'ATM hi ha altres modificacions d'histones importants ²⁶⁶. Quan ATM fosforila a MDC1, aquest també recluta a la E3 ubiquitina ligasa RNF8 que ubiquitinitza la histona H2A reclutant a **53BP1**, una proteïna que promou la reparació per NHEJ i inhibeix la resecció excessiva que pot ocórrer durant la HR ²⁶⁷. La E3 ubiquitina ligasa RNF168 també pot reconèixer les ubiquitinizacions i amplificar-les, reclutant així més 53BP1 i altres proteïnes relacionades amb la reparació dels DSB com **BRCA1** ^{268,269}.

Les dues vies de reparació són la recombinació homòloga i la unió d'extrems no homòlegs.

Durant la recombinació homòloga (HR) **CtIP** s'uneix i estimula l'activitat de MRN per processar els DSB gràcies a la incorporació de nucleases com DNA2, EXO1 o BLM. Aquest processament genera uns extrems de ssDNA que ràpidament es cobriran d'RPA ²⁷⁰⁻²⁷². Després, gràcies a l'acció de BRCA1 i PALB2, **BRCA2** promourà l'intercanvi del RPA per **RAD51**, que forma un filament nucleoproteic. Gràcies a l'activitat d'intercanvi de cadena de Rad51, el filament nucleoproteic envairà una regió homòloga formant un *D-loop* (*Loop/Illaç de desplaçament*) ²⁷³⁻²⁷⁵. La recombinació homòloga finalitza amb la resolució d'aquesta estructura intermèdia ²⁷⁵.

En la NHEJ, l'heterodímer Ku70/Ku80, que reconeix els extrems del DSB i s'uneix a ells per mantenir-los junts, serveix de bastida per reclutar les proteïnes que intervindran en la reparació per NHEJ. Es

forma un complex multiproteic que generalment consistirà en nucleases, polimerases i ligases. La majoria de vegades els extrems no són roms, així que cal un processament. Primer Ku70/Ku80 s'uneix als extrems del DSB on recluta i activa la quinasa **DNA-PK** (proteïna quinasa depenent de DNA). Aquesta quinasa fosforila proteïnes clau com Artemis, que juntament amb el complex MRN processaran els extrems. DNA-PK amb Artemis reclutaran les lligases, com el complex XRCC4-DNA ligasa IV, per a què uneixin el DNA trencat ²⁷⁶⁻²⁷⁹. Aquest mecanisme de reparació pot induir errors, ja que durant el processament es poden perdre o canviar alguns nucleòtids ²⁸⁰.

Com que la recombinació homòloga requereix d'una cromàtide germana, està restringida a la fase S i G2. En un principi és mantenia que la HR era el mecanisme de reparació més utilitzat en aquestes dues fases. No obstant això, darrerament s'ha descrit que és el mecanisme de reparació més utilitzat només durant la fase S (a partir de la meitat) ²⁸¹.

3.4. **CROSSTALK ENTRE CHEKPOINT DE REPLICACIÓ I DE DANY**

Així com l'eix ATR-Chk1 és el controlador del *checkpoint* de replicació, ATM-Chk2 és el del *checkpoint* de dany al DNA, ja que s'activa amb la presència de DSB. Tot i semblar diferenciats, la realitat és que sovint hi ha una activació conjunta, ja que un estrès replicatiu prolongat provoca el col·lapse de les forquetes i genera DSB, fet que promou l'activació d'ATM. Per altra banda durant el processament dels extrems d'un DSB també es generen fragments llargs de ssDNA que poden activar a ATR ^{191,262,282}.

A més a més, tant ATR i ATM fosforilen al voltant de 700 substrats i un gran nombre coincideixen o estan interconnectats ²⁸². Una de les funcions principals és la de parar el cicle cel·lular per poder reparar el dany. Tant ATR-Chk1, com ATR-Chk2 fosforilen i inhibeixen a CDC25. També paren el cicle a través de l'estabilització de p53, ja que ATM, ATR, Chk1 i Chk2 fosforilen a p53 estabilitzant-la ²⁸²⁻²⁹¹. A més a més, ATR i ATM inhibeixen a l'E3 ubiquitina ligasa MDM2, que al ser un

inhibidor de p53, també ajuda a la seva estabilització ^{292,293}. p53 té diverses funcions relacionades amb la viabilitat. S'ha vist com, per exemple, l'estabilització que fa l'eix ATM-Chk2 de p53 promou l'expressió de p21, que és un inhibidor de les CDK-ciclina ²⁹⁴⁻²⁹⁶. Això permet que si hi ha dany al DNA durant la G1, el cicle també es pot parar i reparar el DNA. En cas que el dany sigui excessiu o que l'estrès replicatiu sigui prolongat, ATM es capaç de promoure l'apoptosi i la senescència ^{191,297-299}. En cas d'estrès replicatiu prolongat, ATR també pot induir senescència inclús en absència de DSB ^{191,287}.

3.5. REINICI DE LA REPLICACIÓ

Un cop s'elimina l'obstacle que impedeix la progressió de la forqueta, aquesta es pot reiniciar. Hi ha diversos mecanismes per al reinici de la forqueta de replicació parada, i encara no es coneixen en detall els mecanismes que fan que la cèl·lula utilitzi un o un altre ¹⁵⁹. En els següents apartats descriurem els diferents mecanismes de reinici que es coneixen (**figura 10**).

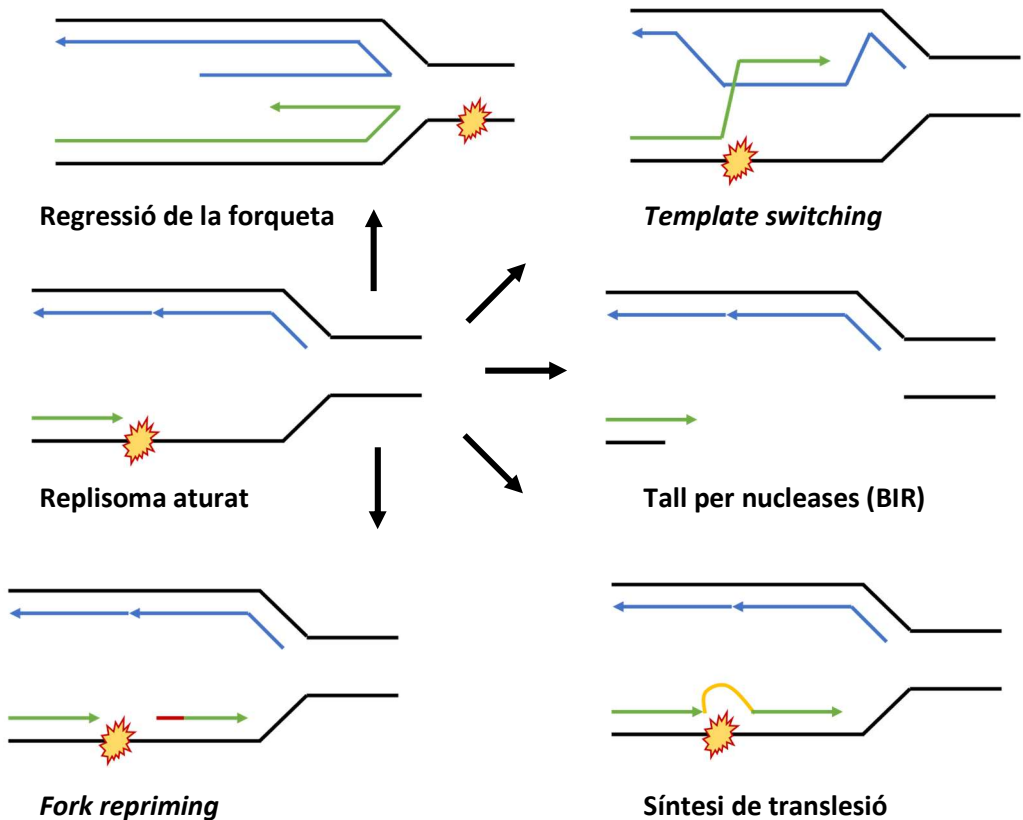


Figura 10. Reinici de la forqueta de replicació. Mecanismes per reiniciar el replisoma quan aquest troba un obstacle (groc). En negre estan representades les dues cadenes parentals, en blau la cadena retardada i en verd la líder. El fragment vermell correspon al sintetitzat per l'encebador i el fragment groc és el sintetitzat per la polimerasa de translesió. En els apartats següents es detalla cada una de les formes diferents de reinici de replicació. Adaptada de "DNA replication stress: from molecular mechanisms to human disease" ¹⁵⁵.

3.5.1. REGRESSIÓ DE LA FORQUETA

Quan el replisoma es para, la forqueta es pot reestructurar i adoptar una forma regressada (*reversed fork*). Si considerem el replisoma com una estructura amb tres vies (les dues cadenes parentals amb la respectiva naixent, i per davant de la progressió del replisoma la cadena parental), al regressar-se, la forqueta queda en una estructura de quatre vies, ja que es produeix una hibridació de les cadenes naixents que forma una nova via central més curta darrere el replisoma. Aquesta estructura també es coneix com a *chicken foot* (peu de pollastre) ^{300,301}.

És una resposta conservada ja que s'ha detectat en procariotes ³⁰². Malgrat al principi es va postular com un producte del col·lapse de les forquetes, la hipòtesi actual és que es tracta d'un mecanisme de protecció que respon a diferents tipus d'estrès replicatiu, des de lesions al DNA fins a dèficit de nucleòtids. Permet protegir la forqueta i sobrepassar les lesions al DNA, ja que restringeix la progressió del replisoma, limita l'acumulació excessiva de ssDNA i evita que avanci contra la lesió/obstacle. Això permet que si hi ha un dany s'afavoreixi la seva reparació i s'impedeixi el col·lapse de la forqueta ^{300,301}.

Diverses proteïnes estan involucrades en la regressió de la forqueta, com les translocases SMARCA1 ^{303,304}, ZRANB3 ^{304,305} i HLTf ^{304,306} o l'helicasa FHB1 ³⁰⁷. A més a més, altres proteïnes com les translocases FANCM ³⁰⁸, Rad54 ³⁰⁹ o les helicases BLM ³¹⁰, WRN ³¹¹ i RECQ5β ³¹² poden promoure la regressió de la forqueta in vitro. Hi ha varies proteïnes implicades i l'eliminació d'una d'aquestes proteïnes no suprimeix per complet la regressió ^{300,301}.

Tot i la protecció que aquesta estructura confereix, l'extrem generat per la hibridació del DNA naixent es troba exposat i és susceptible de que varies nucleases com MRE11 ^{313,314}, CtIP ³¹³, DNA2 ³¹⁵ i EXO1 ³¹³ hi actuïn. De fet, el processament de l'extrem per les nucleases és important per al reinici, però cal protegir el DNA d'una degradació excessiva ^{314,315}. Per això, a l'extrem on hi ha el ssDNA, BRCA2 intercanvia el RPA per RAD51, formant un filament nucleoproteic que protegirà l'extrem de les nucleases ^{303,316,317}. També són importants per a la protecció BRCA1 i FANCD2 (proteïna de l'anèmia Fanconi, FA) ^{318,319}. Juntament amb proteïnes de la via de FA, BODL1 també protegeix el DNA de l'acció de les nucleases ³²⁰.

Les forquetes regressades es poden reiniciar, de fet s'han descrit dos mecanismes que controlen el seu reinici. Per un costat, la helicasa RECQ1 és capaç de promoure el reinici de les forquetes regressades al revertir aquesta estructura. L'activitat de RECQ1 la controla PARP, que estabilitza la forqueta regressada i inhibeix a RECQ1 fins que s'hagi reparat el dany i es pugui reiniciar la forqueta ³²¹. El segon mecanisme involucra a WRN i la nucleasa DNA2, que cooperen per fer una reseció

en sentit 5'→3' i així produir un extrem en 3' per promoure el reinici de la forqueta ³¹⁵.

El *checkpoint* de replicació està involucrat en la regulació de la regressió de la forqueta. ATR fosforila a SMARCA1 per limitar la seva activitat i evitar un processament massiu de les forquetes que derivi en col·lapse ³²². ATR també és capaç de fosforilar les helicases BLM ^{323,324} i WRN ³²⁵. A més a més, s'ha vist que Chk1 pot controlar la resecció, ja que la seva inhibició incrementa l'activitat de nucleases com MRE11 ³²⁶ i Mus81 ^{327,328}.

3.5.2. SÍNTESI DE TRANSLESIÓ/BYPASS DE LA LESIÓ

En aquest cas les polimerases de síntesi de translesió TLS (*Translesion synthesis*) substitueixen a les canòniques. Com que tenen un centre catalític més gran, els permet sintetitzar el DNA al poder passar a través de les lesions de la cadena parental sense quedar encallades. Les principals polimerases de translesió en mamífers són REV1, Polζ, Polη, Poli, Polk i Rev1 ^{329,330}. Aquestes polimerases tenen baixa fidelitat, ja que el seu centre catalític és gran i no tenen dominis de correcció 3'→5' ¹⁵⁹. No obstant això, gràcies a aquestes polimerases, només reduint la fidelitat es poden evitar els efectes de lesions produïdes per agents com la radiació ultraviolada, que poden derivar en la formació de DSB i reorganitzacions cromosòmiques incrementant la inestabilitat genòmica ³³¹.

Tot i que es desconeix el mètode de selecció pel reinici de la replicació, s'ha vist que el principal regulador de la càrrega de les polimerases de translesió a la forqueta parada és la mono-ubiquitinació de PCNA en la lisina 164 que catalitza la E3 ubiquitina ligasa Rad18 ^{329,330,332-337}. També s'ha vist que en el cas de Rev1 i Polη l'activitat d'aquestes polimerases augmenta amb la mono-ubiquitinació de PCNA ³³⁶. No obstant això, en mamífers també s'ha detectat síntesi de translesió sense la ubiquitinació de PCNA ^{338,339}.

El *checkpoint* de replicació podria promoure la TLS, ja que l'eix ATR-Chk1 participa en el reclutament de Pol η i Rad18 a la cromatina³⁴⁰. A més a més, s'ha descrit com ATR fosforila directament a Pol η ³⁴¹.

3.5.3. FORK REPRIMING

En aquest cas, per sobrepassar la lesió, la polimerasa PrimPol, que a més de l'activitat polimerasa té activitat de síntesi d'encebadors, torna a sintetitzar un encebador per davant de la polimerasa encallada. El reclutament de la PrimPol es fa gràcies a la interacció amb ssDNA³⁴²⁻³⁴⁷.

El fet de tornar a sintetitzar un nou encebador més enllà de la lesió es coneix com a *fork repriming*, i deixa un fragment de ssDNA on hi ha la lesió que s'haurà de reparar després. Per sintetitzar el DNA que falta principalment s'utilitzen les polimerases de translesió REV1 i POL ζ ^{348,349}. No obstant, la implicació de REV1 no està gaire clara en eucariotes superiors, ja que hi ha estudis que descarten la seva implicació³⁵⁰⁻³⁵². Si la cèl·lula es troba en fase S, la seva activitat la promouran UBC13 i RAD51, i si està en fase G2, Rad18 monoubiquitinitza a PCNA per promoure l'activitat de les polimerases de translesió^{353,354}.

3.5.4. TEMPLATE SWITCHING

Template switching és un mecanisme per tal d'evitar utilitzar com a motlle la cadena danyada. On hi ha la lesió es produeix la hibridació entre les cadenes naixents i així enlloc d'utilitzar com a motlle la cadena parental amb la lesió, utilitzarà l'altre naixent per a sintetitzar la regió danyada^{194,355-357}.

Així com la mono-ubiquitinització de PCNA promou la TLS, la sumoilació juntament amb la poli-ubiquitinització de PCNA promou l'intercanvi de motlles o *template switching*³⁵⁸⁻³⁶⁰.

3.5.5. BREAK INDUCED REPLICATION

Break induced replication (**BIR**, replicació induïda per trencament) és un tipus de recombinació homòloga que es pot utilitzar per reiniciar la forqueta de replicació. S'inicia amb el processament que fan les nucleases de forquetes col·lapsades o regressades, que genera un DSB que conté un extrem protuberant. Amb aquest extrem es podrà fer la invasió de cadena per buscar un motlle homòleg amb que continuar la replicació i sintetitzar fragments de DNA, que en el cas de prosseguir amb la replicació poden arribar als centenars de kilobases ^{361–364}. Entre les nucleases s'ha identificat al complex Mus81-Eme1 per processar les forquetes i generar DSB en condicions d'estrès replicatiu per tal d'afavorir el reinici de la replicació ^{365,366}.

En eucariotes el BIR s'ha estudiat més en detall en llevats, ja que es poden induir DSB de manera controlada. Tal com succeeix en la recombinació homòloga el DSB es processa per generar l'extrem 3' protuberant. Aquest es cobrirà per RAD51, que promourà la invasió de la cadena per buscar la hibridació amb l'altra cadena homòloga formant el *D-loop*. Encara no està clar quines són les proteïnes involucrades, tot i que en un principi, en un dels models de BIR es proposés la MCM2-7 ^{362,367}, actualment es postula l'helicasa Pif1 com a l'encarregada de carregar la polimerasa al *D-loop* i permetre la síntesi de fragments llargs a l'estendre la replicació del *D-loop* ^{362,368,369}. Finalment, la cadena retardada utilitzaria com a motlle la naixent sintetitzada al *D-loop* ^{368,370}. Tant la Polε, com la Polα, com la Polδ poden participar en la replicació durant la BIR, però d'entre elles s'ha vist que en llevats la principal en la cadena líder és Pol32, una subunitat de Polδ que no és necessària en la replicació en condicions lliures d'estrès replicatiu ^{371–373}. En humans el seu homòleg és POL32 i també està implicat en la BIR ³⁷⁴.

En bacteris com *Escherichia Coli*, la replicació s'inicia a partir d'un sol origen. De manera que són molt dependents del reinici de la forqueta per reiniciar la replicació després del col·lapse de la forqueta ³⁶². En canvi, en eucariotes, com que es carreguen més orígens dels necessaris, en cas de col·lapse de la forqueta es pot utilitzar un dels orígens carregats en excès (*dormant origin*) per recuperar la replicació

i no dependre exclusivament de BIR. En aquest cas s'activaria un nou origen proper i la forqueta nova acabaria arribant a la que està parada. A més a més, l'activació d'aquests orígens també limita la longitud de fragment sintetitzat d'una forqueta que es reinicia per BIR. S'ha vist que una densitat d'orígens alta i l'elevada activitat de Mus81 és important per limitar la longitud dels fragments sintetitzats per BIR ^{362,375}. La limitació de l'activitat de BIR és important, ja que el BIR pot produir mutacions reorganitzacions cromosòmiques i inestabilitat genòmica ^{361,362,364,374,376-379}.

4. ESTRÈS REPLICATIU I CÀNCER

La resposta contra l'estrès replicatiu és fonamental per a la cèl·lula. Les mutacions en proteïnes relacionades amb la resposta a l'estrès replicatiu i al dany al DNA estan relacionades amb diverses síndromes i/o malalties. De fet el nom d'algunes d'aquestes proteïnes està relacionat amb la malaltia o síndrome que produeix la seva mutació. Per exemple ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), o la via de senyalització de l'anèmia de Fanconi (FA), que és important per a la reparació d'unions covalents entre les cadenes de DNA i la mutació en alguna de les proteïnes d'aquesta via produeix l'anèmia de Fanconi ¹⁵⁵.

L'estrès replicatiu també incrementa la predisposició al càncer i contribueix a la tumorigènesi ³⁸⁰. El càncer és un terme que engloba un conjunt de malalties caracteritzat pel fet que cèl·lules anormals es divideixen sense control i poden envair altres teixits ³⁸¹. El procés de transformació cel·lular en el qual cèl·lules sanes esdevenen cèl·lules tumorals ha estat un punt fonamental en l'estudi del càncer, que ha permès identificar oncogens (promouen la transformació) i supressors tumorals (limiten la divisió cel·lular, la pèrdua de la seva funció promou la transformació) ^{382,383}. La transformació ocorre en múltiples esdeveniments, on les cèl·lules progressivament van adquirint mutacions i alteracions epigenètiques fins esdevenir un tumor ³⁸⁴. Tot i aquesta variabilitat en els diferents tipus de càncer, Hanahan i Weinberg varen recopilar les característiques distintives (*hallmarks*) que comparteixen els tumors, entre les quals hi ha la inestabilitat genòmica ³⁸⁵⁻³⁸⁸.

Hem vist com el col·lapse de les forquetes que deriva en DSB, fa que aquestes s'hagin de reiniciar per mecanismes com el BIR (*Break Induced Replication*), que pot ser altament mutagènic al provocar canvis en el nombre de còpies d'un gen o reordenaments cromosòmics. Aquestes alteracions s'han relacionat amb diversos tumors ^{389,390}. A més a més, si el dany és tan elevat que pot comprometre severament la integritat del genoma, la cèl·lula entrarà en apoptosi o senescència. S'ha vist que hi ha cèl·lules amb alteracions en la resposta al dany que

fan que es pugui sobrepassar aquesta barrera i s'afavoreixi la tumorigènesi ^{155,391}.

Durant el procés de transformació cel·lular també es pot produir estrès replicatiu, ja que l'expressió d'oncogens en si mateixa és una font d'estrès replicatiu, i els seus efectes poden ser molt majors si hi ha defectes en proteïnes involucrades en la resposta a estrès replicatiu. Els oncogens poden causar alteracions en la dinàmica de la càrrega i activació dels orígens de replicació, o un increment de la transcripció, que fa que sumat a una activació prematura d'orígens s'incrementin les col·lisions entre replicació i transcripció ³⁸⁰. Un dels mecanismes de protecció de la cèl·lula davant l'expressió d'oncogens i l'augment d'estrès replicatiu és la senescència, mecanisme que les cèl·lules tumorals són capaces d'evitar ³⁹².

A més a més, hi ha regions del genoma, anomenades llocs fràgils comuns (*common fragile sites*, **CFS**) que quan pateixen estrès replicatiu, sovint es produeixen trencaments o queden regions sense replicar a la mitosi ^{393,394}. Aquestes regions es poden caracteritzar per trets com tenir una baixa densitat d'orígens de replicació, replicar-se al final de la fase S, tenir gens llargs, microsatèl·lits rics en A-T, repeticions de DNA invertides o repeticions de trinucleòtids ³⁹⁴⁻³⁹⁸. Tot i que generalment es repliquen al final de la fase S, també s'han trobat alguns que ho fan al principi ³⁹⁹. Entre els diferents tipus cel·lulars hi ha CFS que són comuns, però s'han detectat que hi ha CFS que són específics del tipus cel·lular ^{394,397,398}.

Per mantenir l'estabilitat dels CFS és important que el *checkpoint* de replicació funcioni correctament. El paper d'ATR és clau i s'ha vist com mutacions en proteïnes que intervenen en la resposta a l'estrès replicatiu promouen la inestabilitat dels CFS ^{394,400-402}. El fet que tinguin una densitat d'orígens molt baixa fa que depenguin molt del reinici de la forqueta, ja que al no haver-hi orígens propers, si s'activen altres orígens aquests haurien de cobrir distàncies llargues ^{394,403}. Aquest fet podria derivar en regions sense replicar al final de la fase S ^{394,404}.

Vist que aquests llocs del genoma són inestables en condicions d'estrès replicatiu, s'ha volgut estudiar el seu paper en el càncer. Tot i que són regions proclius a trencar-se, no sembla que estiguin involucrades en les reorganitzacions cromosòmiques que posseeixen molts tumors, a excepció d'alguns CFS que es repliquen al principi de la fase S, anomenats ERFS (*Early Replication Fragile Site*)^{394,399,404,405}. No obstant això, els CFS sí que s'han relacionat amb delecions i alteració en el nombre de còpies d'alguns gens, afavorint la inestabilitat genòmica del càncer^{394,397,404-407}.

Com que les cèl·lules tumorals tenen majors nivells d'estrès replicatiu, hi ha tractaments de quimioteràpia dirigits a incrementar aquest estrès i així saturar la resposta de la cèl·lula i induir la mort o senescència. Els que afecten a la replicació els podem trobar resumits a la **taula 1**.

Taula 1. Tractaments aprovats contra la replicació o que generen dany al DNA. Extreta de "*Targeting nucleotide metabolism: a promising approach to enhance cancer immunotherapy*"⁴⁰⁸, "*Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment*"⁴⁰⁹, "*Cellular responses to replication stress: Implications in cancer biology and therapy*"⁴¹⁰ i *National Cancer Institute*⁴¹¹.

Agent	Inhibició-mecanisme	Usos clínics aprovats	
Metotrexat	Síntesi nucleòtids	Leucèmia limfoblàstica aguda, coriocarcinoma, corioadenoma destructiu, mola hidatiforme, càncer de pulmó, pit	
6-Mercaptopurina		Leucèmia limfàtica aguda	
Fludarabina		Leucèmia limfocítica crònica	
Dacarbazina		Melanoma, limfoma de Hodgkin	
Hidroxiurea		Leucèmia mieloide crònica i càncer de cap i coll.	
Pemetrexed		Mesotelioma	
Capecitabina		Càncer colorectal i mama	
Decitabina		Síndrome mielodisplàstica	
Gemcitabina (Gemzar®)		Càncer d'ovaris, pulmó, mama i pancreàtic	
Fluorouracil		Càncer de colon, esofàgic, gàstric, mama, pancreàtic	
Citarabina (Ara-C®)		Leucèmia mieloide aguda i limfocítica aguda, Limfoma no Hodgkin de cèl·lules T, Meningitis limfocítica	
Cladribina		Anàleg de nucleòsid	Limfoma no Hodgkin, Leucèmia limfocítica crònica o de cèl·lules piloses

INTRODUCCIÓ

Azacitidina		Leucèmia mielomonocítica crònica	
Nelarabina		Leucèmia limfoblàstica o limfoma limfoblàstic de cèl·lules T precursors,	
Pentostatina	Adenosina desaminasa	Tricoleucèmia	
Tipiracil	Timidina fosforilasa	Càncer colorectal	
Clofarabina	DNA polimerasa	Leucèmia limfocítica aguda	
Carboplatí	Formació d'enllaços covalents creuats en el DNA	Càncer d'ovari, pulmó, cap i coll, bufeta urinària	
Oxaliplatí		Càncer colorectal, pàncrees i recte	
Irinotecan		Càncer ovàric, pulmó, colorectal	
Topotecan			
Etopòsid	Topoisomerases		Limfomes, càncer de pulmó, testicular, bufeta urinària, ovari
Tenipòsid			Leucèmia aguda, càncer de pulmó de cèl·lules petites, ovari
Mitoxantrona		Limfoma no Hodgkin, càncer de mama, pròstata	
Mostassa nitrogenada		Limfoma no Hodgkin, leucèmia limfocítica crònica, càncer d'ovari, mama	
Nitrosourea		Tumors cerebrals, mieloma múltiple, limfoma no Hodgkin	
Alquil-sulfonats	Agent alquilant de DNA	Leucèmia mieloide crònica	
Triazines		Melanoma maligne, sarcoma d'Ewing	
Aziridines		Limfoma no Hodgkin, Leucèmia limfocítica crònica, càncer d'ovari i mama	

Així com s'han descrit en tumors varies mutacions en proteïnes implicades en la resposta a l'estrès replicatiu i al dany en el DNA, s'ha vist que hi ha una incidència molt baixa en mutacions en ATR i Chk1. A més a més, són dues proteïnes on no es troben delecions. De manera que la resposta a l'estrès replicatiu en tumors és necessària. De fet, sovint aquestes proteïnes es troben sobreexpressades en tumors, suggerint que siguin importants per poder controlar l'augment d'estrès replicatiu que hi ha generalment en cèl·lules tumorals ^{155,380}. La resposta de diferents tumors a l'estrès replicatiu pot ser diversa i dependrà de les proteïnes alterades. De manera que conèixer en detall com responen les cèl·lules de diferents tumors permet elaborar estratègies més precises i adaptades als diferents tumors ³⁸⁰.

En aquesta tesi s'analitzen algunes d'aquestes proteïnes que participen en la resposta a l'estrès replicatiu i que sovint estan sobreexpressades en tumors. És el cas d'OZF, RAD51. Per altra banda, també s'analitzen els efectes d'inhibir un mecanisme de resistència a l'estrès replicatiu, com és l'activació de nous orígens. També s'analitzen els efectes sobre l'estabilitat del genoma que té l'activació de nous orígens durant la recuperació d'un estrès replicatiu.

OBJECTIUS

El nostre laboratori està centrat en l'estudi de la resposta a l'estrès replicatiu, ja que aquest estrès està relacionat amb la tumorigènesi i la seva resposta és un mecanisme fonamental per preservar l'estabilitat genòmica. La resposta a l'estrès està orquestrada pel *checkpoint* de replicació, que para la progressió en el cicle i protegeix la forqueta de replicació fins que es pot tornar a reiniciar la replicació en condicions on no hi hagi aquest estrès.

El grup prèviament ha caracteritzat la resposta a l'estrès replicatiu en cèl·lules tumorals i no tumorals. Per generar estrès replicatiu s'utilitza la hidroxíurea, que és un inhibidor de la ribonucleòtid reductasa i, per tant, inhibeix la síntesi de nucleòtids. De manera que para les forquetes de replicació perquè provoca l'esgotament dels nivells de nucleòtids disponibles.

Concretament, s'estudien dos tipus d'estrès replicatiu: un agut on es tracten les cèl·lules durant 2 hores, i un sever, on es tracten durant 14 hores. Tant les cèl·lules no transformades, com les tumorals, es recuperen d'un estrès replicatiu agut. En canvi, a diferència de les cèl·lules tumorals, les cèl·lules no tumorals veuen molt limitada la seva recuperació després d'un estrès replicatiu sever i bona part es tornen senescents. Aquesta diferència es deu a que les cèl·lules tumorals són capaces d'activar nous orígens per reiniciar la replicació, tot i que sigui en condicions desfavorables que puguin comprometre la integritat del genoma.

Per tant, com que les cèl·lules tumorals tenen més resistència a l'estrès replicatiu, la nostra hipòtesi és que si utilitzem inhibidors de nous orígens després d'un estrès replicatiu sever podríem sensibilitzar les cèl·lules tumorals a tractaments que generen estrès replicatiu i que es donen en la clínica.

Per altra banda, l'altra hipòtesi és que les cèl·lules tumorals podrien estar activant nous orígens de replicació en dominis de replicació inactius abans de l'estrès, alterant així el *timing* de replicació que

OBJECTIUS

provocarà canvis epigenètics i d'expressió gènica. Aquest fenomen seria un factor positiu per a la progressió del tumor.

Com que les cèl·lules de càncer colorectal solen tenir estrès replicatiu de forma basal, aquest serà el nostre model d'estudi. Fruit d'aquest estrès replicatiu basal ens interessa estudiar i caracteritzar la funció que tenen les proteïnes implicades en la replicació sota aquestes condicions, ja que potencialment poden ser dianes terapèutiques que incrementin l'efectivitat de tractaments que augmenten l'estrès replicatiu.

Els objectius principals d'aquesta tesi són:

- 1- Analitzar proteïnes involucrades en la remodelació de la forqueta de replicació durant l'estrès replicatiu agut i el seu paper en l'estabilitat genòmica.
- 2- Analitzar si la inhibició de nous orígens de replicació després d'un estrès replicatiu sever en cèl·lules tumorals prevé la recuperació de la replicació.
- 3- Analitzar si l'activació de nous orígens després d'un estrès replicatiu sever en cèl·lules tumorals es dona en dominis inactius abans de l'estrès i s'altera el *timing* de replicació i la conformació de la cromatina.

RESULTATS

CAPÍTOL 1

OZF MANTÉ LA VELOCITAT DE PROGRESSIÓ DE LA FORQUETA DE REPLICACIÓ EN CONDICIONS D'ESTRÈS REPLICATIU

Els resultats d'aquest capítol estan
publicats a *Feu et al., FASEB J. 2020*

1.1. INTRODUCCIÓ

Com ja hem vist a la introducció, la claspina és una proteïna que interacciona amb Chk1 per tal d'activar el *checkpoint* de replicació, però aquesta no és la seva única funció. La claspina juga un paper central en molts processos. De fet, en llevats, el seu ortòleg (Mrc1) és la diana de varies quinases activades per diverses situacions d'estrès com: oxidatiu, osmòtic, calor o manca de nutrients. D'aquesta manera es vincula la resposta a aquests estressos amb la protecció del DNA. Les fosforilacions de Mrc1 provoquen un retard en l'activació de nous orígens i una reducció de la velocitat de la forqueta de replicació ⁴¹². En vertebrats s'ha descrit que la degradació de la claspina per part de la caspasa 7 és necessària per la inducció de l'apoptosi ^{413,414}. A més a més, s'ha observat que quan hi ha estrès de reticle per l'acumulació de proteïnes mal plegades, la velocitat de replicació es redueix. Això es produeix perquè al activar-se la resposta al mal plegament de proteïnes (coneguda com UPR [*unfolded protein response*]), la claspina es fosforila per una via dependent de la quinasa PERK, derivant en l'activació de Chk1 ⁴¹⁵.

1.1.1. NIVELLS DE CLASPINA I DESACTIVACIÓ DEL *CHECKPOINT* DE REPLICACIÓ

Els nivells de claspina estan molt regulats. A nivell transcripcional està controlada per la família de factors de transcripció E2F ^{416,417}. La seva expressió fluctua durant el cicle cel·lular, durant les fases S-G2 és quan hi ha els nivells més alts i després disminueixen al final de la mitosi, perquè és quan comença la seva degradació ⁴¹⁸. La família de factors de transcripció NFκB també promou la transcripció del gen de la claspina, així que la via de senyalització IKK-NFκB està implicada en el manteniment d'uns nivells adequats de claspina ⁴¹⁹. La degradació és important per la desactivació del *checkpoint*. S'ha vist com en fibroblasts una depleció de *cdh1* provoca una activació de Chk1 durant la G1 i la seva entrada prematura en senescència ⁴²⁰. La degradació de la claspina es produeix per ubiquitinització. Aquesta es pot ubiquitinitzar tant pel complex SCF^{βTrCP} al final de la mitosi, com pel d'APC/C^{Cdh1}

durant la G1⁴²⁰⁻⁴²². Per tal que la claspina interaccioni amb SCF^{βTrCP} i pugui ser degradada, aquesta s'ha de fosforilar en la serina 30 o 34⁴²¹⁻⁴²³. La fosforilació és dependent de Plk1, i és fonamental per poder degradar la claspina i desactivar el *checkpoint* de replicació un cop s'ha reparat el dany, o s'ha eliminat l'obstacle que parava la forqueta. La degradació de la claspina inactiva el *checkpoint* de replicació per la reducció en l'activació de Chk1⁴²³⁻⁴²⁵. A més a més, hi ha diverses ubiquitina hidrolases com USP7, USP9X, USP20, USP28 i USP29, que reverteixen la ubiquitinització i permeten un funcionament adequat del *checkpoint* i un òptim manteniment de la capacitat de replicació del DNA de la cèl·lula⁴²⁶⁻⁴³¹.

1.1.2. CLASPINA I REPLICACIÓ

Tot i no estar involucrada directament en la incorporació de nucleòtids, aquesta proteïna forma part del replisoma i presenta afinitat pel DNA desenrotllat o ramificat⁴³². Als llocs on la forqueta de replicació es para o se n'ha produït dany, el DNA es desenrotlla i queda en forma ramificada. La claspina s'uneix a aquesta estructura de DNA, i així es pot reclutar a les zones on s'ha produït dany al DNA o la forqueta de replicació es troba parada⁴³²⁻⁴³⁵.

També forma part del complex de protecció de la forqueta de replicació (conegut com *replication fork protection complex*), juntament amb les proteïnes Timeless i Tipin. A més del paper ja esmentat en l'activació de Chk1, durant la replicació aquest complex s'encarrega del manteniment i monitorització de l'estabilitat de la forqueta⁴³⁶. S'ha vist que si es depleciona la claspina hi ha un augment d'aturada de les forquetes i terminacions prematures^{437,438}. El que fa la claspina, conjuntament amb Timeless i Tipin, és coordinar les activitats helicasa i polimerasa. Sense aquest complex es podrien produir fragments de DNA de cadena senzilla (ssDNA) molt llargs entre les polimerases i les helicases i s'activaria el *checkpoint* de replicació. De fet, si no es poden mantenir uns nivells baixos de ssDNA s'hi podria produir un col·lapse massiu de les forquetes de replicació, que derivaria en trencaments de doble cadena al DNA i la mort cel·lular com a causa de la replicació catastròfica (fet conegut com a *replication catastrophe*)^{380,439}. Dintre del

complex, el model que s'ha proposat és que en la cadena retardada Tipin coordina les activitats helicasa i polimerasa, i en la líder ho fa la claspina ⁴⁴⁰. Quan hi ha parada de la forqueta la proteïna And1 interacciona amb la claspina i promou l'activació del *checkpoint* ⁴⁴¹.

També s'ha descrit un possible efecte en l'activació de nous orígens independent del seu paper amb Chk1. La càrrega de la claspina a la cromatina està mitjançada pel complex de preinici i per Cdc45. Això fa que la unió de la claspina a la cromatina estigui lligada amb l'inici de la replicació ⁴⁴². També interacciona amb CDC7, i aquesta unió és important per una fosforilació eficient de les Mcm. Així que la claspina podria contribuir en l'activació de nous orígens, però no és essencial. En cèl·lules de murí s'ha vist com en depleccionar la proteïna encara hi ha uns certs nivells d'activació d'orígens de replicació ⁴⁴³, i en cèl·lules tumorals hi ha un mecanisme de compensació que produeix un increment en l'activació dels orígens ^{444,445}.

A més a més, claspina interacciona amb proteïnes de les diferents vies de reparació del DNA i la seva fosforilació a varis residus específics és fonamental per discriminar entre les diferents estructures que es formen en resposta al dany al DNA ⁴⁴⁶.

1.1.3. OZF INTERACCIONA AMB LA CLASPINA

Vist això, la claspina és una proteïna fonamental per preservar l'estabilitat genòmica, i un punt clau i nexa comú en molts processos que van dirigits a ella. Hi ha moltes proteïnes que interaccionen amb la claspina, i el nostre grup es va proposar estudiar i buscar noves proteïnes que interaccionessin amb ella.

Es va realitzar un assaig de doble híbrid per identificar proteïnes que interaccionessin amb la claspina. Aquest assaig es va fer en col·laboració amb el laboratori del Dr Raimundo Freire, utilitzant un segment de 347 aminoàcids del domini C-terminal. En total es van identificar 39 proteïnes i 9 d'elles eren proteïnes amb motiu dit de zinc que pertanyien a la subfamília Krüppel. D'entre totes elles ens vàrem centrar en OZF, ja que era una proteïna formada només per 10 motius dit de zinc consecutius i amb funció desconeguda ⁴⁴⁷.

La interacció claspina-OZF la vàrem confirmar també per co-immunoprecipitació tant de proteïnes exògenes com d'endògenes ⁴⁴⁷. Al confirmar la interacció i per ser una proteïna amb funció desconeguda, el següent pas va ser analitzar si OZF intervé en les diverses funcions que té la claspina.

1.2. RESULTATS PREVIS

1.2.1. OZF NO ÉS ESSENCIAL PER A LA REPLICACIÓ EN hTERT-RPE

Un cop demostrada la interacció d'OZF amb la claspina i la seva presència a les forquetes de replicació, es va comprovar si tenia una implicació directa en la replicació. Utilitzant la tècnica del *DNA fiber* assay no es va observar cap efecte en la progressió de la forquilla de replicació després de reduir per transfecció amb siRNA els nivells d'OZF 48 hores abans (**figura 1**). Tampoc es va observar cap efecte en la dinàmica de replicació (**figura 1**) tot i que s'ha reportat que la claspina podria tenir un efecte en l'activació de nous orígens per la seva interacció amb cdc7 ⁴⁴³.

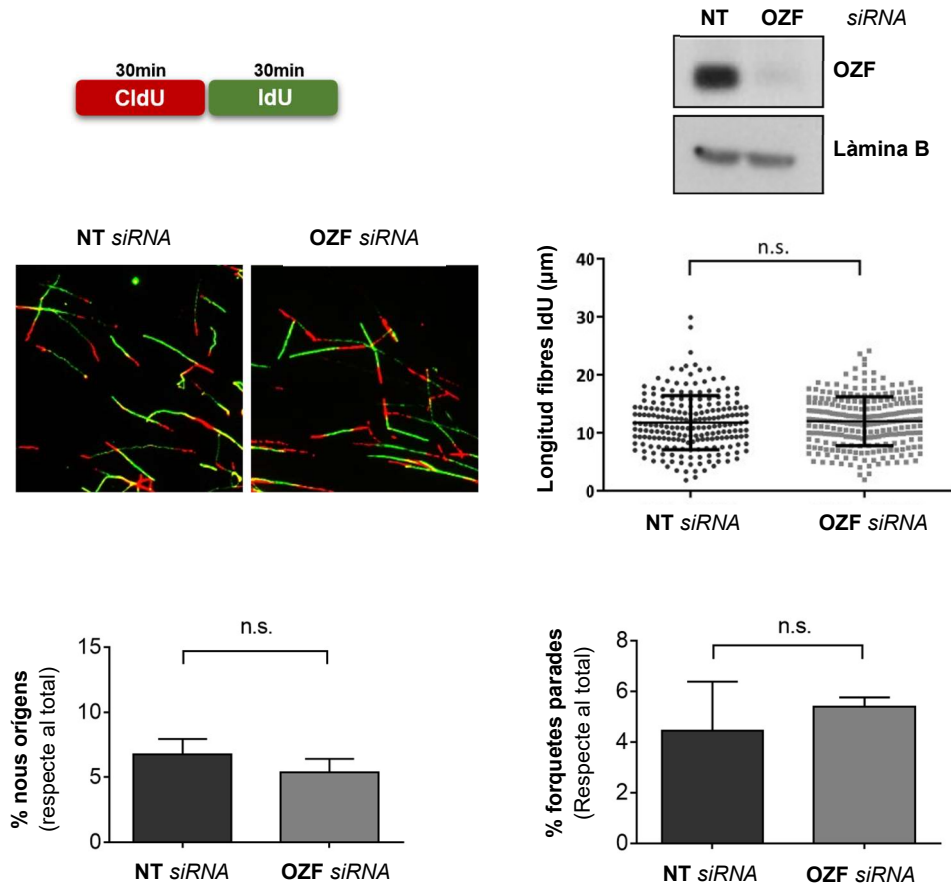


Figura 1. La depleció d'OZF no afecta la progressió de la forqueta en condicions control en cèl·lules hTERT-RPE. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem fer el DNA *fiber assay* i recollir les mostres per fer el WB de comprovació. Per al WB (dalt a la dreta) es va utilitzar la làmina B com a control de càrrega. Per al DNA *fiber assay* vàrem fer un marcatge tal com es detalla a l'esquema (dalt a l'esquerra). Les dues imatges (mig-esquerra) són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs. A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 250 fibres. El gràfic (mig-dreta) correspon a un experiment representatiu de tres (test de Mann-Whitney, n.s.: estadísticament no significatiu). També vàrem quantificar els nous orígens activats (baix-esquerra [fibra marcada només amb IdU]) i les forquetes parades o terminacions (baix dreta [fibra marcada només amb CldU]). En aquests casos es mostra la mitjana i desviació estàndard de tres experiments independents (3n) (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició i experiment.

1.2.2. OZF ÉS NECESSARI PER A LA PROGRESSIÓ DE LA FORQUETA DE REPLICACIÓ EN CONDICIONS D'ESTRÈS REPLICATIU

Utilitzant les mateixes condicions de transfecció del siRNA contra OZF, es va analitzar la replicació, però en aquest cas el *DNA fiber assay* es va fer en condicions d'estrès replicatiu suau, que no paressin per complet la replicació. Per tal d'aconseguir aquest estrès replicatiu suau es va utilitzar una dosi baixa d'hidroxiurea (0.1mM) on no es produeix activació del *checkpoint*, tal i com s'explica a la **figura 2**. La reducció dels nivells d'OZF produeix un alentiment de la progressió de la forquilla de replicació, ja que les fibres marcades amb IdU eren més curtes en comparació amb la condició *non-target* (NT).

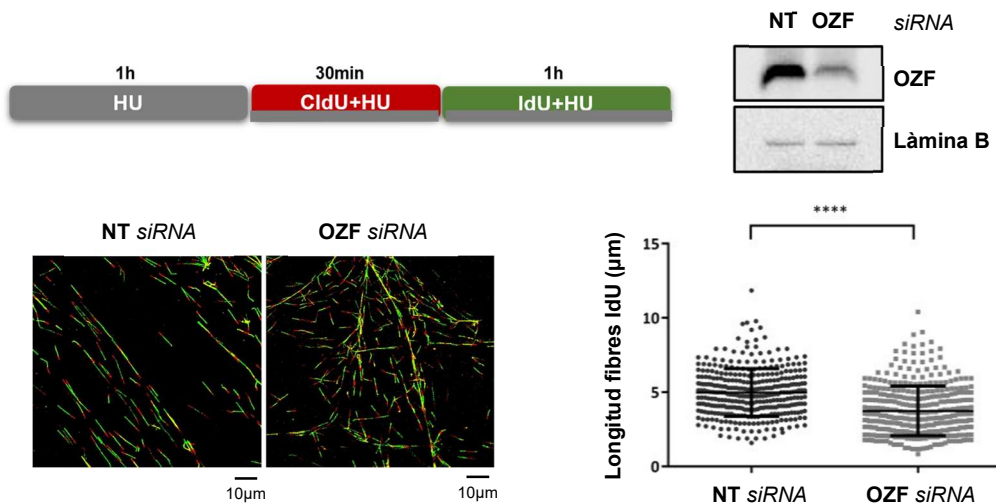


Figura 2. La depleció d'OZF redueix la progressió de la forqueta en cèl·lules hTERT-RPE amb estrès replicatiu. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem fer el *DNA fiber assay* i recollir les mostres per fer el WB de comprovació. Pel WB (dalt-dreta) es va utilitzar la làmina B com a control de càrrega. Pel *DNA fiber assay* vàrem fer un marcatge tal com es detalla a l'esquema (dalt-esquerra). Per induir estrès replicatiu es va utilitzar una dosi de 0.1mM d'hidroxiurea (HU). Les dues imatges (baix-esquerra) són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs (baix-dreta). A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 300 fibres. El gràfic correspon a un experiment representatiu de tres (test de Mann-Whitney, ****: P valor < 0.0001) .

A l'estar OZF implicada en la progressió de la forquilla en RPE en condicions suaus d'estrès replicatiu, es va analitzar si en les cèl·lules tumorals també s'observava el mateix. S'ha descrit que la majoria cèl·lules tumorals tenen nivells basals d'estrès replicatiu ⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰. De manera que si OZF és important per la replicació en condicions d'estrès replicatiu, ho podria ser també per a aquestes cèl·lules tumorals amb un estrès basal. Es va realitzar un *DNA fiber assay* amb cèl·lules HCT116 en condicions control. La reducció dels nivells d'OZF en aquesta línia cel·lular per siRNA provocaren una disminució de la velocitat de la forqueta de replicació, sense afectar la dinàmica de replicació (**figura 3**).

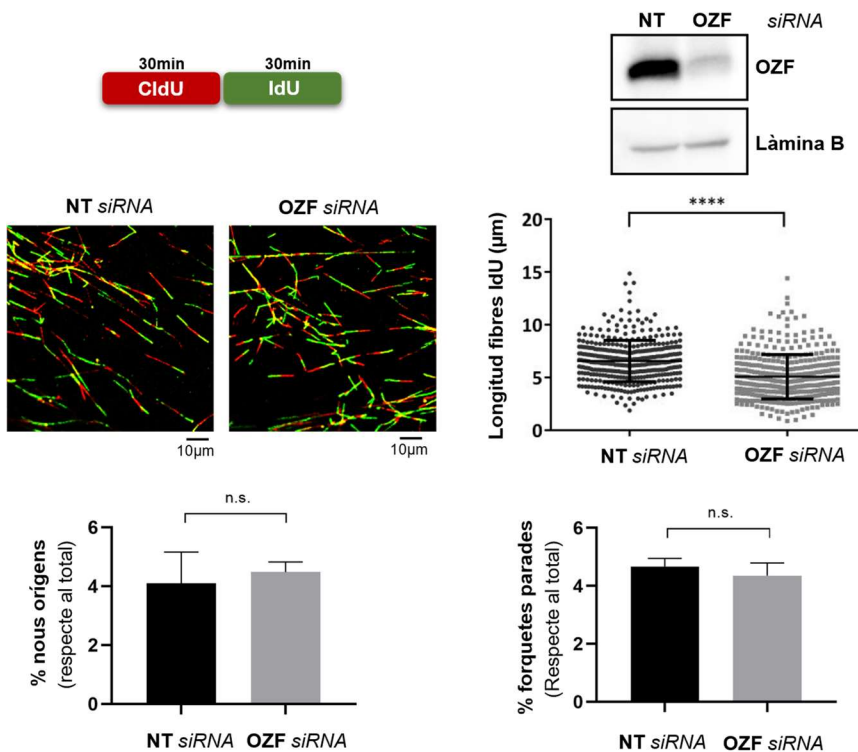


Figura 3. La depleció d'OZF redueix la progressió de la forquilla en condicions control en cèl·lules HCT116. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem fer el DNA fiber assay i recollir les mostres per fer el WB de comprovació. Pel WB (dalt a la dreta) vàrem utilitzar la Làmina B com a control de càrrega. Pel DNA fibre assay vàrem fer un marcatge tal com es detalla a l'esquema (dalt-esquerra). Les dues imatges (mig-esquerra) són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs. A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 250 fibres. El gràfic (mig-dreta) correspon a un experiment representatiu de tres (test de Mann-Whitney, ****: P valor < 0.0001). També vàrem quantificar l'activació de nous

origens (baix-esquerra [fibres marcades només amb IdU]) i les forquetes parades o terminacions (baix-dreta [fibres marcades només amb CldU]). Es mostra la mitjana i desviació estàndard de tres experiments independents (3n) (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició i experiment.

1.3. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest capítol són:

- I. Comprovar si OZF intervé en l'activació del *checkpoint* de replicació.
- II. Comprovar si l'efecte de la depleció d'OZF sobre la replicació observat en HCT116 es manté en altres línies cel·lulars de càncer colorectal.
- III. Analitzar si la reducció de la velocitat de la forquilla de replicació provocada per la disminució dels nivells d'OZF en HCT116 té un efecte sobre la viabilitat cel·lular i la integritat del genoma.

1.4. RESULTATS

1.4.1. OZF NO ÉS NECESSARI PER A L'ACTIVACIÓ DEL *CHECKPOINT* DE REPLICACIÓ

Al ser OZF una proteïna que interacciona amb la claspina vàrem analitzar si OZF està implicada en l'activació del *checkpoint* de replicació. Per provocar un estrès replicatiu prou significatiu com per activar el *checkpoint* vàrem utilitzar una concentració de 10mM d'hidroxiurea. Així doncs, després de transfectar amb siRNA contra OZF vàrem tractar les cèl·lules hTERT-RPE amb la hidroxiurea i recollir mostres durant les primeres hores per analitzar per *western blot* (WB) l'activació del *checkpoint*. La reducció dels nivells d'OZF no afecta la fosforilació de la serina 296 de Chk1 (**figura 4**). Aquesta fosforilació

correspon a l'autofosforilació de Chk1, que és dependent d'ATR i es produeix quan s'activa el *checkpoint* de replicació ⁴⁵¹.

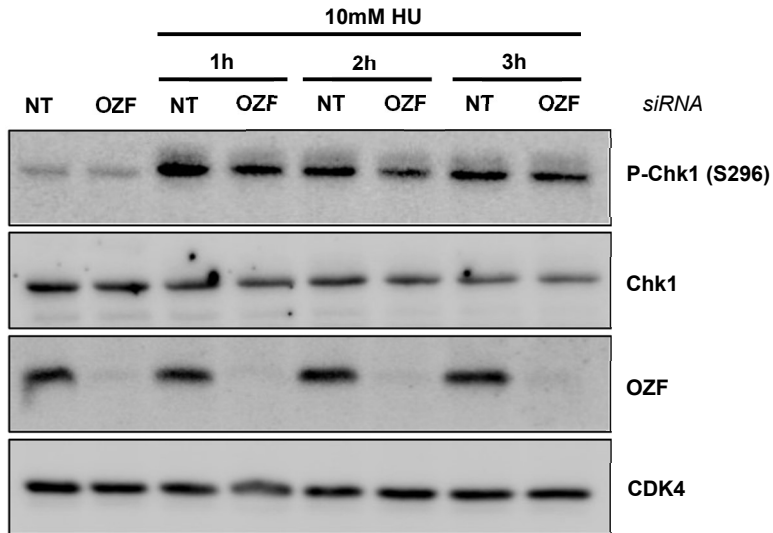


Figura 4. OZF no és essencial per a l'activació del *checkpoint* de replicació en cèl·lules hTERT-RPE. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem tractar i recollir les cèl·lules segons s'indica (HU: Hidroxiurea) El nivells de P-Chk1, Chk1 i OZF es van analitzar per WB. Vàrem analitzar nivells CDK4 com a control de càrrega.

1.4.2. OZF ÉS NECESSARI PER A LA PROGRESSIÓ DE LA FORQUILLA DE REPLICACIÓ EN HCT116, DLD-1 i SW480

El primer que vàrem fer és comprovar que les línies de càncer colorectal utilitzades tenien estrès replicatiu basal, tal com està descrit a la bibliografia ⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰. Els tres models cel·lulars utilitzats presentaven nivells força més elevats de P-Chk1 serina 296 que les cèl·lules no transformades hTERT-RPE (**figura 5**). Aquest resultat implica que les cèl·lules tumorals estudiades tenen un estrès replicatiu basal suficientment elevat com per activar el *checkpoint* de replicació.

RESULTATS

Més del 80% dels càncers colorectals tenen una sobreexpressió d'OZF. En el nostre cas, vàrem comparar per WB els nivells d'OZF en les 3 línies cel·lulars tumorals utilitzades amb les hTERT-RPE. Les cèl·lules tumorals presentaven uns nivells més elevats d'aquesta proteïna que les cèl·lules no transformades (**figura 5**).

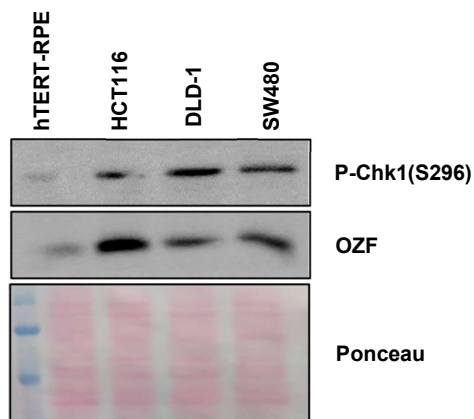
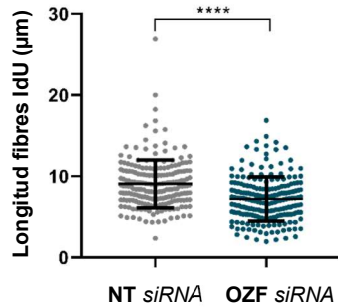
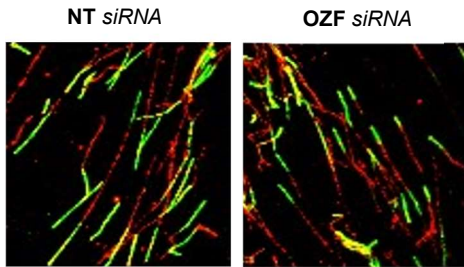
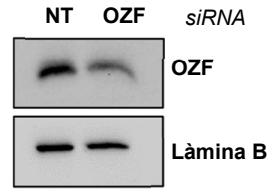


Figura 5. Les cèl·lules tumorals HCT116, DLD-1 i SW480 tenen una major expressió d'OZF que cèl·lules hTERT-RPE. WB representatiu de 3 experiments independents (3n) per analitzar els nivells d'OZF i P-Chk1. Vàrem utilitzar un marcatge amb Ponceau com a control de càrrega..

Un cop comprovat que les línies cel·lulars DLD-1 i SW480 tenien estrès replicatiu basal, vàrem analitzar per *DNA fiber assay* la velocitat de progressió de la forqueta i la dinàmica de replicació en aquestes cèl·lules. El marcatge i la immunofluorescència es va fer 48 hores després de la transfecció amb el siRNA contra OZF.

Els resultats van ser els mateixos que els obtingut prèviament amb les cèl·lules HCT116. En aquest cas, després de la reducció dels nivells d'OZF, tant les DLD-1 com les SW480 patiren una disminució de la velocitat de progressió de la forqueta de replicació (**figura 6**). A més a més, igual que amb les cèl·lules HCT116, la dinàmica de replicació no es va veure afectada, ja que no presentaven més forquilles aturades o terminacions, o un canvi en l'activació de nous orígens (**figura 6**).

DLD-1



SW480

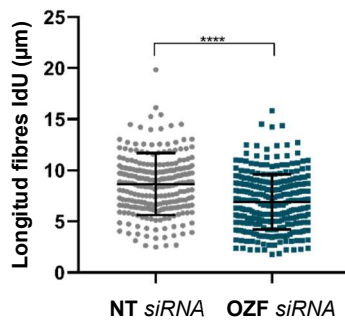
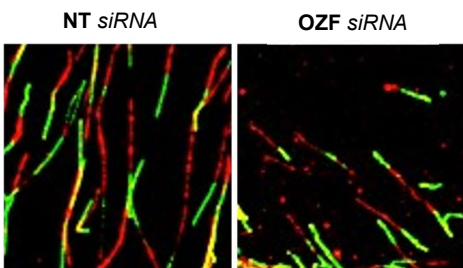
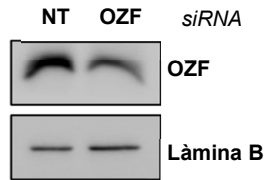
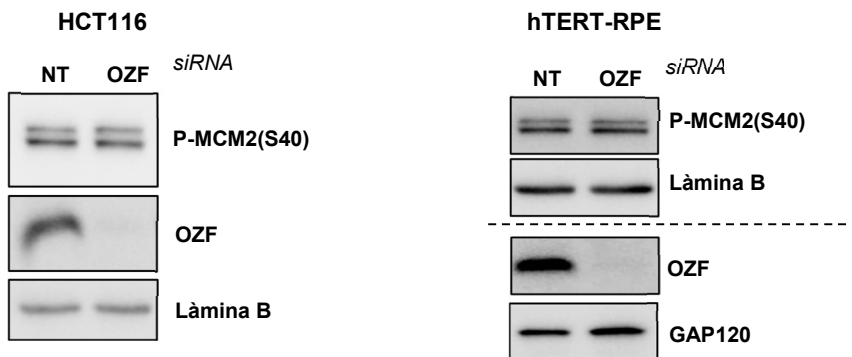


Figura 6. La depleció d'OZF redueix la progressió de la forqueta en condicions control en cèl·lules DLD-1 i SW480. La disposició de les imatges i gràfics de cada línia cel·lular és la mateixa. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem fer el DNA fiber assay i recollir les mostres per fer el WB de comprovació. Pel WB (dalt-dreta) vàrem utilitzar la làmina B com a control de càrrega. Pel DNA fiber assay vàrem fer un marcatge tal com es

RESULTATS

detalla a l'esquema (dalt-esquerra). Les dues imatges (baix-esquerra) són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs. A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 250 fibres. El gràfic (baix-dreta) en el cas de les cèl·lules DLD-1 correspon a un experiment representatiu de tres (3n) i en el cas de les cèl·lules SW480 només s'ha fet un experiment (1n) (test de Mann-Whitney, ****: P valor < 0.0001).

El nombre d'activació de nous orígens en condicions control (NT siRNA) o amb la reducció d'OZF (OZF siRNA) els valors d'aquests esdeveniments eren molt baixos, de l'ordre de 3 a 5 orígens activats per condició. En el cas que hi hagués una diferència petita en l'activació de nous orígens, potser no la podem detectar degut a les limitacions tècniques del *DNA fiber assay*, amb el qual no tenim prou resolució. Per tal d'incrementar la resolució, i analitzar amb major precisió si hi havia un efecte en l'activació de nous orígens, vàrem comparar per WB els nivells de P-MCM2 S40. Aquesta fosforilació de MCM2, és la que realitza CDC7 per tal d'activar els nous orígens. En les quatre línies cel·lulars, tant tumorals com no tumorals, la disminució per siRNA dels nivells d'OZF no va produir canvis en els nivells de P-MCM2 S40, indicant que l'activació de nous orígens no es veia afectada (**figura 7**).



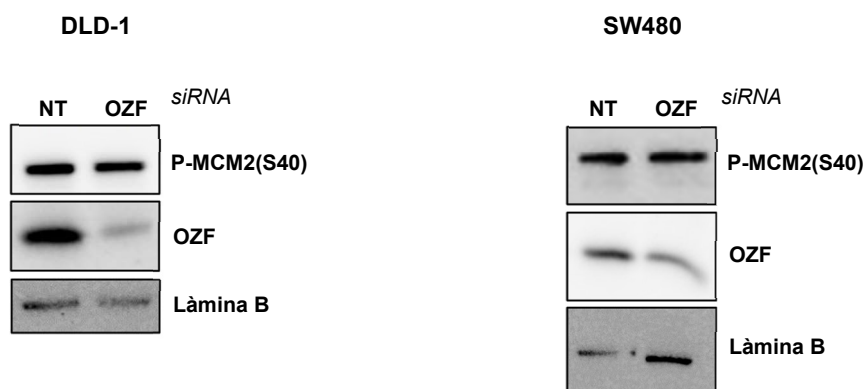


Figura 7. La depleció d'OZF no varia els nivells de P-MCM-2 en cèl·lules HCT116, DLD-1, SW480 i hTERT-RPE. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem recollir les cèl·lules per fer el WB. Vàrem utilitzar la làmina B o GAP120 com a control de càrrega. En el cas de les cèl·lules HCT116 i hTERT-RPE es mostra un experiment representatiu de 3 i en el cas de les DLD-1 i SW480 només s'ha fet un experiment.

1.4.3. LA REDUCCIÓ D'OZF NO INCREMENTA EL DANY A DNA NI TÉ EFECTES SOBRE LA VIABILITAT CEL·LULAR

A diferència de les cèl·lules hTERT-RPE, en HCT116 la disminució d'OZF té efectes sobre la replicació en condicions control. El següent que vàrem comprovar va ser si aquest efecte repercutia en la viabilitat de les cèl·lules tumorals. Per a l'estudi de la viabilitat vàrem fer un assaig de formació de colònies, també conegut com assaig de clonogenicitat. Amb aquesta tècnica s'analitza la capacitat d'una cèl·lula individual d'esdevenir una colònia. El procediment que vàrem utilitzar fou recollir les cèl·lules 48 hores després del tractament amb el siRNA contra OZF, per diluir-les i replantar-les a una confluència molt baixa per a què estiguin prou separades entre elles. Les cèl·lules queden plantades de manera individual i una setmana després es pot veure si han pogut formar una colònia.

En les cèl·lules HCT116 la depleció d'OZF no va produir ningun efecte sobre la capacitat formadora de colònies (**figura 8**).

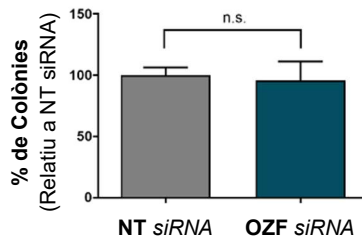


Figura 8. La depleció d'OZF no afecta la viabilitat en cèl·lules HCT116 en condicions control. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem replantar les cèl·lules per diluir-les (200 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous [per triplicat]). 7 dies després vàrem fixar, tenyir i contar les colònies. Vàrem calcular la mitjana de cada triplicat i normalitzar pel control (iNT). El gràfic mostra la mitjana de tres experiments independents (3n) (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu). Experiments realitzats en col·laboració amb la Dra. Sònia Feu.

L'altra opció que ens vàrem plantejar és que l'absència d'OZF durant l'estrès replicatiu pogués ocasionar dany al DNA, que posteriorment es pugui reparar i no tingui conseqüències greus sobre la viabilitat cel·lular. Per detectar el dany al DNA, vàrem fer una immunofluorescència contra dues proteïnes involucrades en la resposta al dany. Una és 53BP1, i l'altra és γ H2AX. Com que no sabíem si podria ser un efecte molt lleu, ja que no afecta la viabilitat, vàrem analitzar un gran nombre de cèl·lules utilitzant una tècnica de microscòpia que permet l'anàlisi de poblacions grans, coneguda com a *high-content screening microscopy*. Vàrem utilitzar portaobjectes amb pous aptes pel cultiu cel·lular i amb una base de molt poc gruix per a poder utilitzar un microscopi confocal. Es va automatitzar l'obtenció d'imatges amb el microscopi per així aconseguir mosaics d'imatges d'una gran regió de cada pou i incrementar el nombre de cèl·lules que es poden analitzar. Al generar moltes imatges també vàrem automatitzar l'anàlisi d'aquestes amb una macro d'*ImageJ* i de *R* per visualitzar les dades obtingudes. Com a control de que la tècnica era prou sensible, vàrem afegir una condició amb un tractament de 0.1mM d'hidroxiurea que ocasiona un estrès replicatiu de baixa intensitat, ja que no és suficient per activar el *checkpoint* de replicació. Ni amb les cèl·lules HCT116 (**figura 9**) ni amb les DLD-1 (**figura 10**)

vàrem observar un increment en γ H2AX ni de 53BP1 després de la reducció dels nivells d'OZF en condicions control o amb un augment d'estrès replicatiu (0.1mM hidroxiurea).

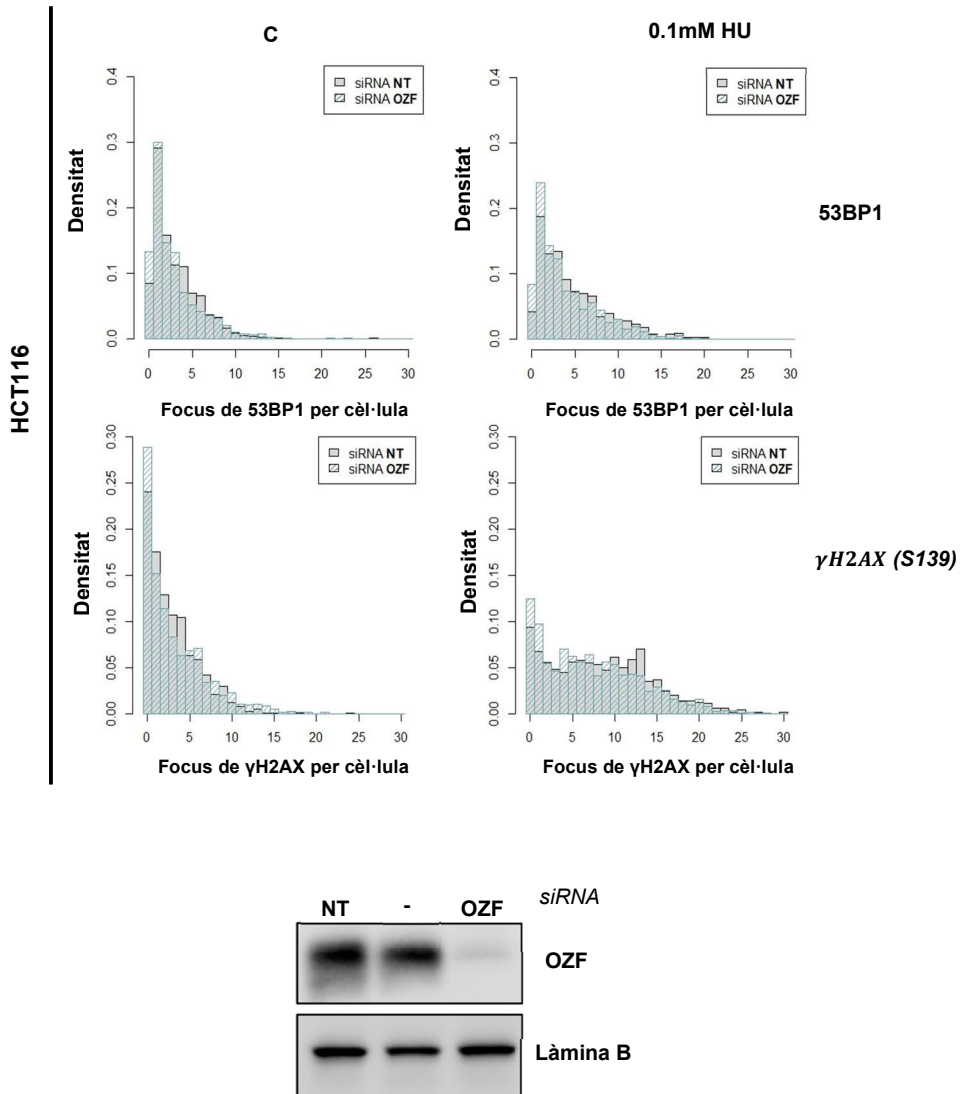


Figura 9. La depleció d'OZF no indueix dany en cèl·lules HCT116. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). 48 hores després de la transfecció vàrem recollir les mostres per fer el WB de comprovació (baix a l'esquerra). Vàrem utilitzar GAP120 com a control de càrrega. En el cas de la condició tractada amb 0.1mM d'hidroxiurea (HU), el tractament el vàrem fer 24 hores després de la transfecció i vàrem deixar les cèl·lules amb hidroxiurea durant 24 hores. Així a les 48 hores després de la transfecció vàrem fixar les dues condicions (C i 0.1mM HU) i realitzar la immunofluorescència de HCS. Es vàren analitzar entre 500 i 1200 cèl·lules per condició.

RESULTATS

Es mostren els histogrammes de freqüència d'un experiment representatiu de 2 experiments independents (2n).

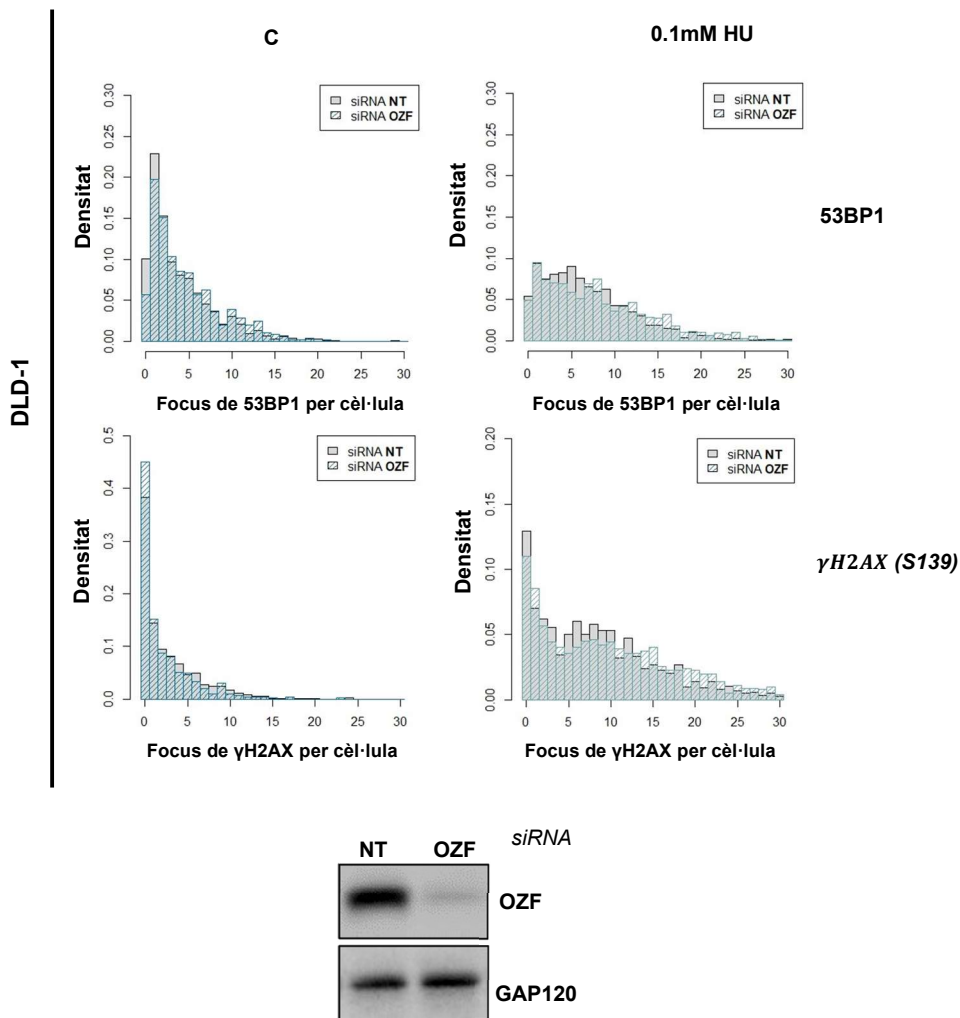


Figura 10. La depleció d'OZF no induïx dany en cèl·lules DLD-1. Vàrem transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: non-target). 48 hores després de la transfecció vàrem recollir les mostres per fer el WB de comprovació (baix a l'esquerra). Vàrem utilitzar GAP120 com a control de càrrega. En el cas de la condició tractada amb 0.1mM d'hidroxiurea (HU), el tractament el vàrem fer 24 hores després de la transfecció i vàrem deixar les cèl·lules amb hidroxiurea durant 24 hores. Així a les 48 hores després de la transfecció vàrem fixar les dues condicions (C i 0.1mM HU) i realitzar la immunofluorescència de HCS. Es vàren analitzar entre 500 i 1200 cèl·lules per condició. Es mostren els histogrammes de freqüència d'un experiment representatiu de 2 experiments independents.

Així doncs, tot i que la manca d'OZF provoca una disminució en la velocitat de replicació del DNA, no té un efecte detectable en la viabilitat cel·lular o el dany al DNA.

CAPÍTOL 2

RAD51 MANTÉ LA PROGRESSIÓ DE LA REPLICACIÓ EN RESPOSTA A L'ESTRÈS REPLICATIU

Els resultats d'aquest capítol estan publicats a *Feu et al., PLoS One. 2022*

2.1. INTRODUCCIÓ

La proteïna RAD51 té un paper principal en la recombinació homòloga, tal com s'ha descrit a la introducció. Durant la recombinació homòloga RAD51 forma un filament nucleoproteic amb el ssDNA i promou la invasió per buscar l'homologia en la cromàtide germana ⁴⁵². A més a més, té un paper fonamental en la resposta de les cèl·lules a l'estrès replicatiu i les lesions en el DNA. Per això cal estudiar-la en més detall i aprofundir en les diverses funcions que té.

RAD51 forma part de la superfamília de recombinases recA/Rad51, la qual està present en els 3 els dominis dels que en formen part tots els éssers vius ⁴⁵³. L'única excepció són alguns bacteris intracel·lulars amb genomes extremadament reduïts ^{454,455}. És una proteïna fonamental pel manteniment i estabilitat del genoma. En llevats l'eliminació del seu ortòleg no és letal, tot i que sensibilitza les cèl·lules al dany produït per DSBs ^{456,457}. Quan s'indueix la tetraploidització en llevats, RAD51 és essencial per mantenir la viabilitat de les cèl·lules ⁴⁵⁸. En vertebrats és una proteïna més rellevant, ja que l'eliminació de RAD51 en ratolins produeix la mort en estat embrionari ⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹.

Es podria catalogar a RAD51 com una ATPasa dependent de DNA, ja sigui ssDNA o dsDNA ^{462,463}. Això és gràcies a que conté un domini α/β ATPasa semblant al de les helicases. Tot i això, l'activitat ATPasa és baixa en comparació amb el seu ortòleg en llevats (RecA), que és entre 150-200 vegades major que RAD51 ⁴⁶³. Cada monòmer de RAD51 s'uneix a 3 nucleòtids amb una afinitat modesta (K_d [constant de dissociació] aproximada de 10^{-6}). Un gir del filament nucleoproteic helicoidal de ssDNA-RAD51 està compost per sis monòmers. La hidròlisi de l'ATP redueix l'estabilitat del filament, fet que provoca que RAD51 es reguli negativament a través de l'activitat ATPasa pròpia ^{463,464}.

A banda d'aquest domini ATPasa, també té un domini N-terminal format per 5 hèlix α i una làmina β que intervé en la unió entre monòmers de RAD51, dos bucles desordenats que s'uneixen al DNA i un fragment flexible que fa de connector entre els dominis ⁴⁶³.

2.1.1. FORMACIÓ I ESTABILITZACIÓ DEL NUCLEOFILAMENT RAD51-ssDNA

Quan s'exposa un fragment de ssDNA, aquest fragment es cobreix ràpidament amb la proteïna RPA. Això es deu a que RPA presenta una elevada afinitat pel ssDNA (K_d aproximada de 10^{-10}) i a més a més hi ha entre 3 i 5 milions de molècules per cèl·lula ^{465,466}. Aquest fet implica que per a la formació del filament de RAD51 al ssDNA sigui necessari que RAD51 desplaci el d'RPA ⁴⁶⁷. Com que RAD51 presenta una menor afinitat pel DNA que RPA i, a més a més, una menor estabilitat, fa que es requereixi d'una proteïna medidora que, a més de formar aquests filaments, els estabilitzi. En mamífers aquesta proteïna és BRCA2 ^{467,468}. En el context de la recombinació homòloga PALB2 interacciona amb BRCA1 i és aquest últim el que recluta a BRCA2 allà on hi ha el dany ⁴⁶⁹. D'aquesta manera BRCA2 s'uneix al ssDNA per tal de reclutar-hi RAD51 ^{469,470}.

BRCA2 té una regió formada per repeticions BRC. Aquestes tenen la capacitat de formar el filament nucleoproteic en aportar aproximadament 4 monòmers de RAD51 al DNA. També promouen l'estabilitat del filament RAD51-ssDNA, ja que per una banda inhibeixen l'activitat ATPasa de RAD51 i, per l'altra, redueixen l'associació de RAD51 a dsDNA ^{471,472}. Cal destacar que la regió C-terminal també es pot unir a RAD51 i promoure l'estabilització d'aquests filaments ⁴⁷³.

Tot i ser la principal, BRCA2 no és l'única proteïna que intervé en l'estabilització i la dinàmica dels filaments RAD51-ssDNA. Els paràlegs de RAD51 també intervenen en la seva formació, la dinàmica i la invasió per buscar l'homologia ⁴⁵³. Tal com s'ha mencionat al principi, RAD51 forma part d'una superfamília de recombinases presents en tots els dominis d'éssers vius. Això implica que aquestes proteïnes tenen un ancestre comú, del qual han evolucionat. Durant el procés s'han produït diverses duplicacions genòmiques i diversificació de funcions ^{453,474}. En conseqüència, podem trobar diversos paràlegs de RAD51: RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 i SWSAP1 ^{453,474,475}. Tots ells formen part de diversos complexos:

- **BCDX2:** RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2
- **CX3:** RAD51C-XRCC3
- **Shu:** SWSAP1-SWS1

L'única d'aquestes proteïnes que no és un paràleg de RAD51 és SWS1⁴⁷⁵. RAD51C forma part de dos complexos i a més a més també interacciona amb el format per PALB2, RAD51 i BRCA2⁴⁷⁶. S'ha observat que l'eliminació de la majoria de paràlegs de RAD51 en ratolins provoca la mort en estat embrionari⁴⁷⁷.

2.1.2. FUNCIONS DE RAD51

RAD51 té altres funcions a més de la cerca d'homologia durant la recombinació homòloga. S'ha vist com a banda d'altres factors com ZRANB3 o SMARCAL, és una proteïna important per a la regressió de la forqueta. La seva eliminació redueix el nombre de forquetes regressades i promou l'acumulació de DSBs⁴⁷⁸. Cal destacar que aquesta funció no depèn de la capacitat de fer l'intercanvi de cadenes, ni de BRCA2, ni de la formació del filament nucleoproteic llarg de RAD51 a l'inici de la regressió^{317,318,479,480}.

En situacions d'encreuament entre cadenes (conegut com *interstrand crosslink* [ICL]), la regressió de la forqueta promou la seva reparació. S'ha vist com RAD51 es recluta quan es produeix una parada de la forqueta per ICL^{481,482}. Com que moltes d'aquestes funcions no depenen de la recombinació homòloga i de BRCA2, és important destacar que a aquestes forquetes el reclutament de RAD51 és independent de BRCA2⁴⁸³⁻⁴⁸⁵. Hi ha maneres alternatives per reclutar RAD51 al DNA que no impliquen la formació del complex BRCA1-PALB2-BRCA2, com el complex MMS2L-TONSL que recluta RAD51 quan hi ha forquetes parades o la fosforilació de RAD51 que fan Plk1 i CK2, fent que interaccioni amb NBS1. La proteïna NBS1 forma part del complex MRN i és un sensor inicial de DSB. D'aquesta manera es pot acumular RAD51 als llocs on hi ha dany al DNA fins i tot en situacions on no hi ha BRCA2⁴⁸⁶⁻⁴⁸⁸.

A més del seu paper a l'inici de la regressió de les forquetes, s'ha vist com el filament nucleoproteic que es forma després actua com a

protector del DNA naixent de l'activitat de nucleases ^{489,490}. Aquesta funció també s'ha vist que es deu a la formació del nucleofilament, i és independent de l'activitat de cerca d'homologia i d'intercanvi de cadena. Aquesta protecció és un fet més estructural que d'activitat enzimàtica. Per això la seva estabilització és clau, així que depèn de proteïnes que l'estabilitzin com són BRCA1, BRCA2 i BOD1L ^{319,320}.

No sempre es produeix la regressió de la forqueta, quan aquesta no es pot donar s'afavoreix el repriming mediat per la PRIMPOL ⁴⁹¹. El que fa aquesta primasa és fer un *repriming* més enllà de la lesió al DNA, així es pot continuar amb la replicació evitant la zona lesionada fent *Translesion synthesis* o síntesi de translesió. D'aquesta manera el replisoma pot sobrepassar les lesions ^{342,343}. Com a conseqüència es produeixen fragments de ssDNA a les zones no replicades que si no s'emplen es poden processar en DSBs i ser una font d'inestabilitat genòmica ^{343,344}. RAD51 protegeix d'aquests fragments de ssDNA i té un paper a la postreplicació d'aquests fragments durant la G2. S'ha vist que si s'elimina RAD51 es produeix un augment en els ssDNA produïts per la *translesion synthesis* ³¹⁶.

Els paràlegs de RAD51 també participen en aquests processos. S'ha descrit que el complex BCDX2 intervé en la regressió de la forqueta ⁴⁹², i juntament amb CX3 protegeixen les forquetes de la degradació per part de MRE11 ⁴⁹³. A més a més, el complex CX3 també intervé en el reinici de les forquetes regressades ^{493,494}. En canvi el complex Shu no s'ha relacionat amb la protecció del DNA naixent, però en llevats s'ha descrit que intervé en el reinici després d'un estrès replicatiu produït per hidroxiiurea ⁴⁹⁵.

En resum, a banda del seu paper a la recombinació homòloga, RAD51 està involucrat en:

- Regressió de la forqueta
- Protecció del DNA naixent
- Reparació post-replicació

2.2. RESULTATS PREVIS

2.2.1. RAD51 NO ÉS ESSENCIAL PER LA REPLICACIÓ EN hTERT-RPE

Gran part dels estudis de RAD51 estan fets en cèl·lules transformades. En vista d'aquesta situació, el nostre grup es va centrar en avaluar les funcions de RAD51 en cèl·lules no tumorals. Mitjançant la tècnica d'*iPOND* (*Isolation of proteins on nascent DNA*) es poden aïllar les proteïnes que interaccionen amb el DNA acabat de sintetitzar, també conegut com DNA naixent (*nascent DNA*). Gràcies a aquesta tècnica vàrem detectar la presència de RAD51 a les forquetes de replicació en condicions control en cèl·lules hTERT-RPE ⁴⁹⁶. Havent trobat RAD51 a la forqueta de replicació ens vàrem centrar en analitzar quines funcions tenia RAD51 en la replicació.

El primer que es va estudiar va ser si RAD51 era important per la progressió de la forqueta. Així doncs es va inhibir RAD51 i després es va realitzar un *DNA fiber assay* per tal d'estudiar la replicació en aquestes condicions. Per tal d'inhibir RAD51 vàrem utilitzar el B02, que és un inhibidor de la unió de RAD51 al ssDNA i de l'activitat d'intercanvi de cadena ⁴⁹⁷.

Per *DNA fiber assay* no es va veure cap efecte en la progressió de la forqueta amb la inhibició de RAD51 amb B02 (**figura 1**).

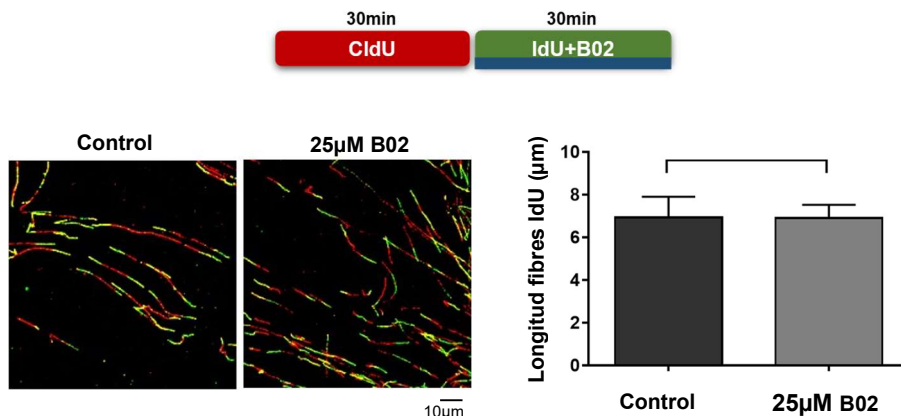


Figura 1. La inhibició de RAD51 no afecta la progressió de la forqueta en condicions control en cèl·lules hTERT-RPE. Vàrem fer un tractament i marcatge tal com es detalla a l'esquema. Dosi B02: 25µM. Les dues imatges són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs. A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 200 fibres. El gràfic (dreta) correspon a la mitjana i a la desviació estàndard de tres experiments independents (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu).

2.2.2. RAD51 ÉS NECESSARI PER LA PROGRESSIÓ DE LA FORQUETA DE REPLICACIÓ EN CONDICIONS D'ESTRÉS REPLICATIU

Per iPOND també es va trobar RAD51 a les forquetes en el reinici després d'un estrès replicatiu agut (2 hores amb 10mM d'hidroxiurea). Per tant, el següent que es va analitzar fou si RAD51 tenia algun paper a la replicació del DNA en condicions d'estrès replicatiu. Es va fer un *DNA fiber assay* després de la inhibició de RAD51 amb B02, i la inducció d'un estrès replicatiu suau amb 0.1mM d'hidroxiurea. La dosi utilitzada provoca un estrès replicatiu que redueix la velocitat de la forqueta, però no es suficient per provocar una activació del *checkpoint* de replicació.

En condicions d'estrès replicatiu suau, el fet d'inhibir RAD51 va provocar una disminució de la velocitat de la forqueta (**figura 2**).

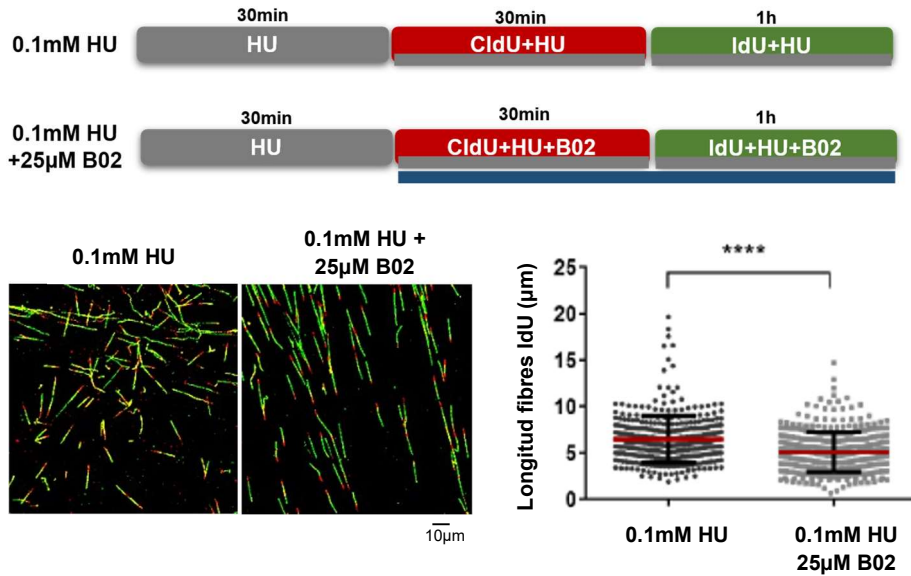


Figura 2. La inhibició de RAD51 redueix la progressió de la forqueta en condicions d'estrès replicatiu suau en cèl·lules hTERT-RPE. Vàrem fer un tractament i marcatge tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 0.1mM. Dosi B02: 25µM. Les dues imatges són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs. A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 250 fibres. El gràfic correspon a un experiment representatiu de tres experiments independents (Test de Mann-Whitney, ****: P valor <0.0001).

Com que les cèl·lules tumorals HCT116 tenen un estrès replicatiu basal es va fer l'experiment de *DNA fiber assay* en aquestes cèl·lules inhibint RAD51 en condicions control.

La inhibició de RAD51 en cèl·lules HCT116 va produir la disminució de la velocitat de la forqueta de replicació (**figura 3**).

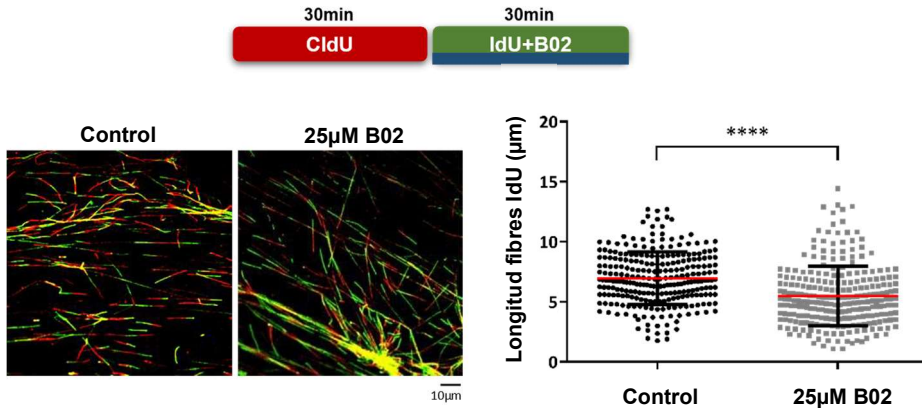


Figura 3. La inhibició de RAD51 redueix la progressió de la forqueta en condicions control en cèl·lules HCT116. Vàrem fer un tractament i marcatge tal com es detalla a l'esquema. Les dues imatges són representatives de cada condició. Vàrem mesurar la longitud del marcatge amb IdU en fibres marcades amb els dos anàlegs. A cada experiment vàrem analitzar un mínim de 250 fibres. El gràfic correspon a un experiment representatiu de tres experiments independents (Test de Mann-Whitney, ****: P valor <0.0001).

2.3. OBJECTIU

L'objectiu d'aquest capítol és:

- I. Analitzar si la reducció de la velocitat de la forquilla de replicació provocada per la inhibició de RAD51 en condicions d'estrès replicatiu té un efecte sobre la viabilitat cel·lular i la integritat del genoma.

2.4. RESULTATS

2.4.1. LES CÈL·LULES DE CÀNCER COLORRECTAL TENEN INCREMENTATS ELS NIVELLS DE RAD51

El primer que ens vàrem preguntar fou si les cèl·lules de càncer colorectal tindrien major quantitat de RAD51. Com ja s'ha esmentat al capítol anterior, les cèl·lules tumorals de càncer colorectal (CRC) tenen majors nivells d'estrès replicatiu ⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰. Per tant, en afectar RAD51 la replicació en condicions d'estrès replicatiu volíem veure si les cèl·lules amb les que treballàriem tenien majors nivells de RAD51. En analitzar els nivells de RAD51 per western blot, les cèl·lules de CRC (HCT116 i

DLD-1) tenien majors nivells de RAD51 comparades amb les no transformades hTERT-RPE (**figura 4**).

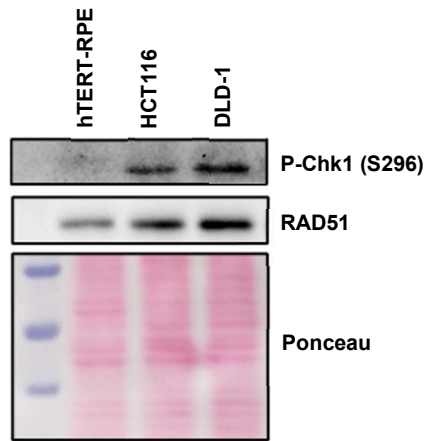


Figura 4. Les cèl·lules tumorals HCT116 i DLD-1 tenen uns majors nivells de P-Chk1 i RAD51 que cèl·lules hTERT-RPE. WB representatiu de 3 experiments independents. Vàrem utilitzar un marcatge amb Poinceau com a control de càrrega.

2.4.2. LA INHIBICIÓ DE RAD51 RETARDA LA PROGRESSIÓ DE LA FASE S EN HCT116 I DLD-1

En inhibir RAD51 en cèl·lules amb estrès replicatiu basal, la forquilla de replicació progressava més lentament (**figura 3**). El següent pas fou comprovar si aquest alentiment de la progressió de les forquetes de replicació es traduïa en un retard en el progrés de la fase S. El que vàrem fer fou un pols amb BrdU per marcar les cèl·lules que en el moment del tractament estaven en fase S. Després vàrem tractar amb B02 i vàrem recollir mostres de manera progressiva per veure l'avanç en el cicle de la població BrdU positiva.

Després del tractament amb l'inhibidor de RAD51 la progressió en la fase S era més lenta que en les condicions control tant en les cèl·lules HCT116 com en les DLD-1 (**figura 5**).

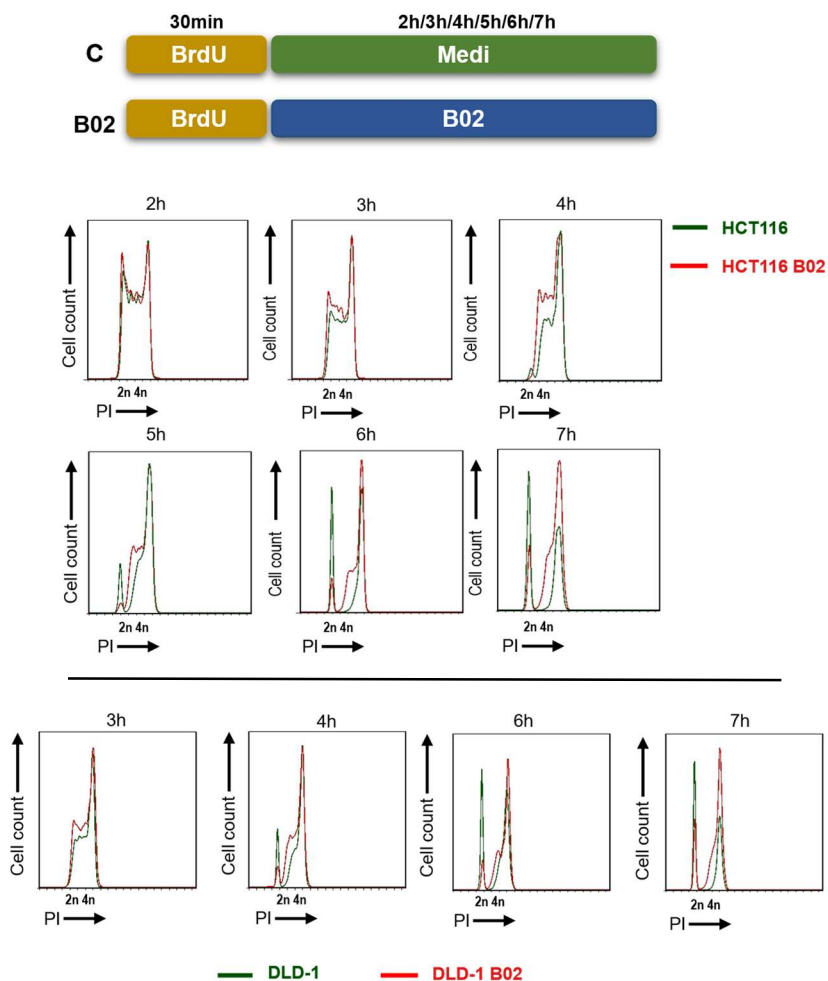


Figura 5. La inhibició de RAD51 retarda la progressió de la fase S en cèl·lules HCT116 i DLD-1. Vàrem utilitzar un marcatge amb BrdU per analitzar la progressió en condicions controls o tractades amb 25µM B02, de les cèl·lules que estaven inicialment en fase S. (veure l'esquema de la part superior). Estan representats els histogrames del marcatge amb PI de les cèl·lules BrdU+. Les condicions es van recollir a l'hora marcada a dalt de cada histograma. Les dues primeres files de histogrames corresponen a les cèl·lules HCT116 i la fila inferior a les DLD-1.

2.4.3. LA INHIBICIÓ DE RAD51 NO INCREMENTA EL DANY AL DNA NI TÉ EFECTES SOBRE LA VIABILITAT CEL·LULAR

Aquesta reducció de la progressió en la fase S podria afectar la viabilitat cel·lular. El que vàrem fer fou analitzar si després de 12 hores de tractament amb B02 hi havia un efecte sobre la capacitat de les cèl·lules per formar colònies.

La inhibició de RAD51 va disminuir la viabilitat cel·lular, no obstant això, en hTERT-RPE i HCT116 la reducció va ser molt semblant (**figura 6**).

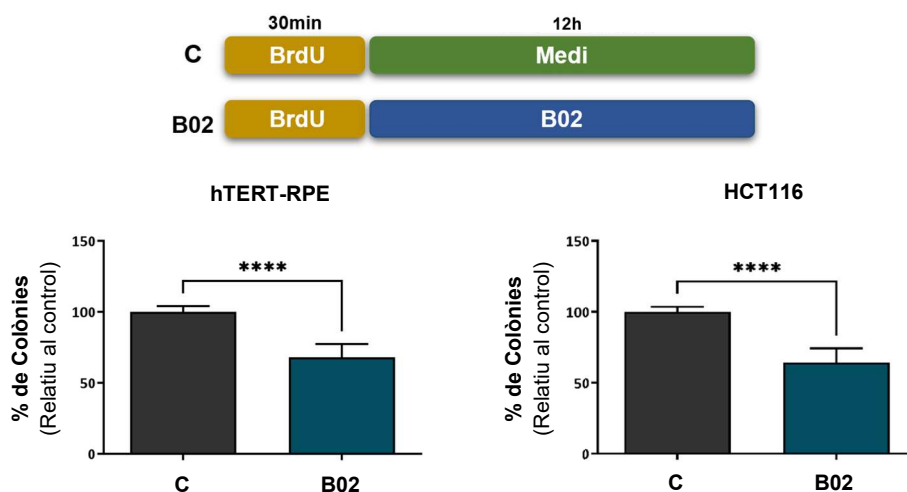


Figura 6. La inhibició de RAD51 disminueix la viabilitat en cèl·lules HCT116 i hTERT-RPE en condicions control. Vàrem tractar les condicions B02 durant 12 hores amb 25µM de B02, després vàrem replantar les cèl·lules per diluir-les (200 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous [per triplicat]). 7 dies després vàrem fixar, tenyir i contar les colònies. Vàrem calcular la mitjana de cada triplicat i normalitzar pel control. El gràfic mostra la mitjana de tres experiments independents. Experiments realitzats en col·laboració amb la Dra Sònia Feu.

De manera que no sembla que l'alentiment de la progressió de la forqueta de replicació sigui la causant d'aquesta reducció en la viabilitat, ja que aquest alentiment no ocorre en hTERT-RPE.

Després ens vàrem preguntar si la inhibició de RAD51 en condicions d'estrès replicatiu incrementava els nivells de P-Chk1 S295. Primer vàrem comprovar si la inhibició de RAD51 produïa majors nivells de P-

Chk1 S295 en hTERT-RPE i després en HCT116. Com que les cèl·lules hTERT-RPE no tenen estrès replicatiu basal, les varem sotmetre a diferents nivells d'estrès replicatiu. Per descartar l'efecte de cèl·lules que estan en altres fases del cicle, abans de fer el western blot (WB) vàrem sincronitzar-les en fase S. Primer vàrem tractar les cèl·lules amb timidina per deixar-les parades en la transició G1-S. Després d'eliminar la timidina, vàrem mantenir les cèl·lules 2 hores en medi per a què entressin en fase S. Així, un cop sincronitzades en S, vàrem fer els tractaments amb hidroxidurea a diferents dosis (0.1mM, 1mM i 10mM) combinades amb B02. Amb les diferents dosi d'hidroxidurea aconseguiríem diferents nivells d'activació del *checkpoint*. Després vàrem recollir mostres a diferents temps durant 4 hores per tal d'analitzar per WB els nivells de P-Chk1 S296.

La inhibició de RAD51 produïda pel B02 no va afectar la fosforilació de Chk1 en la serina 296, ja que els nivells d'aquesta proteïna són iguals que els de la condició tractada només amb hidroxidurea (**figura 7**).

També vàrem poder veure com el fet de sincronitzar les cèl·lules amb timidina ja indueix una petita activació del *checkpoint* (**figura 7**).

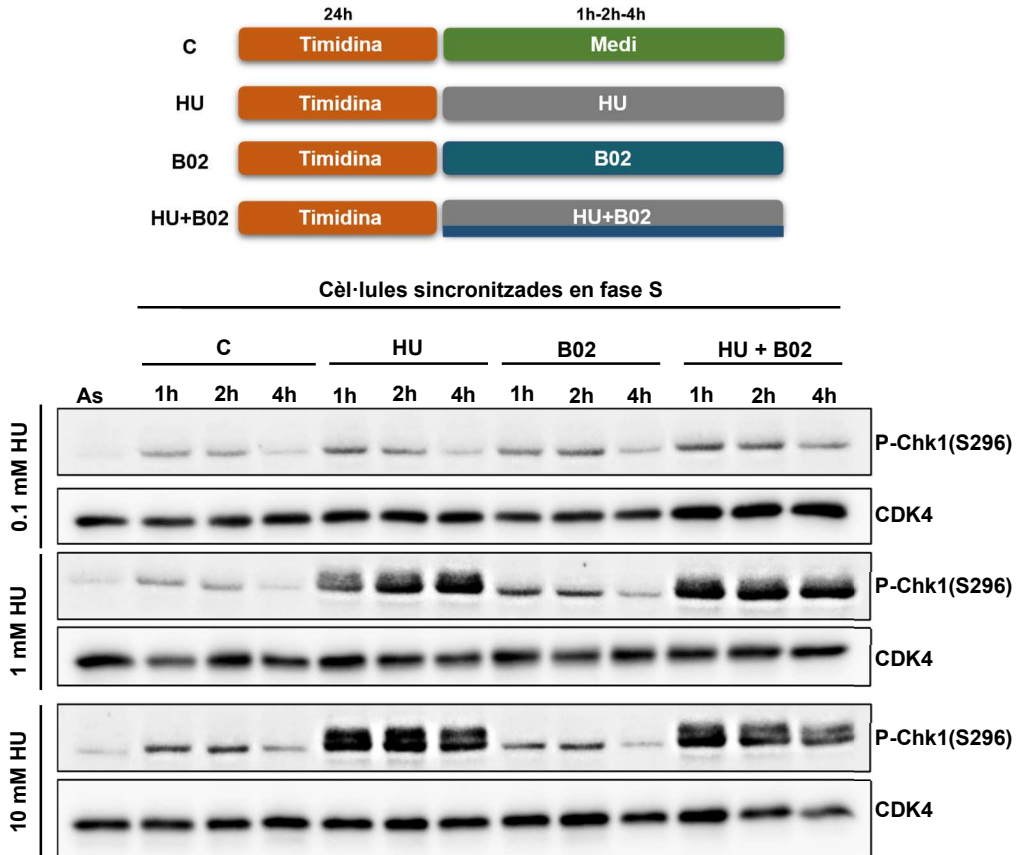


Figura 7. La inhibició de RAD51 no incrementa l'estrès replicatiu ni afecta l'activació del *checkpoint* de replicació en cèl·lules hTERT-RPE. Excepte la condició de cèl·lules asincròniques, primer vàrem sincronitzar les cèl·lules amb timidina, i després vàrem fer els tractaments seguint l'esquema que es mostra a la figura. Dosis hidroxiurea (HU): 0.1mM, 1mM i 10mM. Dosi B02: 25µM. La condició de cèl·lules asincròniques (As) és la mateixa en les tres membranes, es tracta de cèl·lules recollides directament sense cap tractament. Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega. WB representatiu de 2 experiments independents (2n).

Com que les cèl·lules HCT116 ja tenen un estrès replicatiu basal no les vàrem tractar amb hidroxiurea. Com que també ens interessava veure la influència de RAD51, vàrem afegir tres condicions més amb 1, 2 i 4 hores de recuperació del tractament amb B02. Així podíem veure si els possibles efectes desapareixien un cop eliminada la inhibició. També vàrem analitzar si hi havia augment de γ H2AX, ja que ens interessava veure si es produïa dany al DNA amb la reducció de la velocitat de la forqueta de replicació.

El tractament amb B02 no va produir cap increment en l'activació del *checkpoint* de replicació (**figura 8**). Malgrat això, el tractament amb B02 sí que sembla que incrementés la quantitat de γ H2AX, tot i que en eliminar el B02, els nivells disminueixen durant la recuperació (**figura 8**).

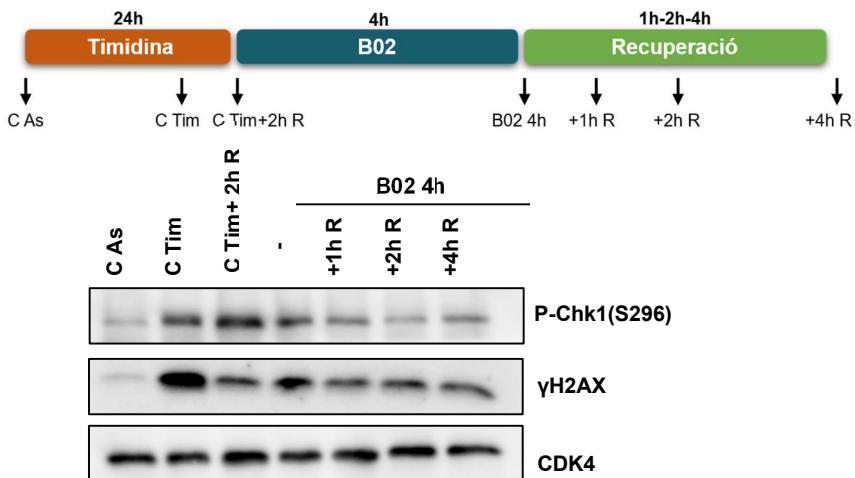
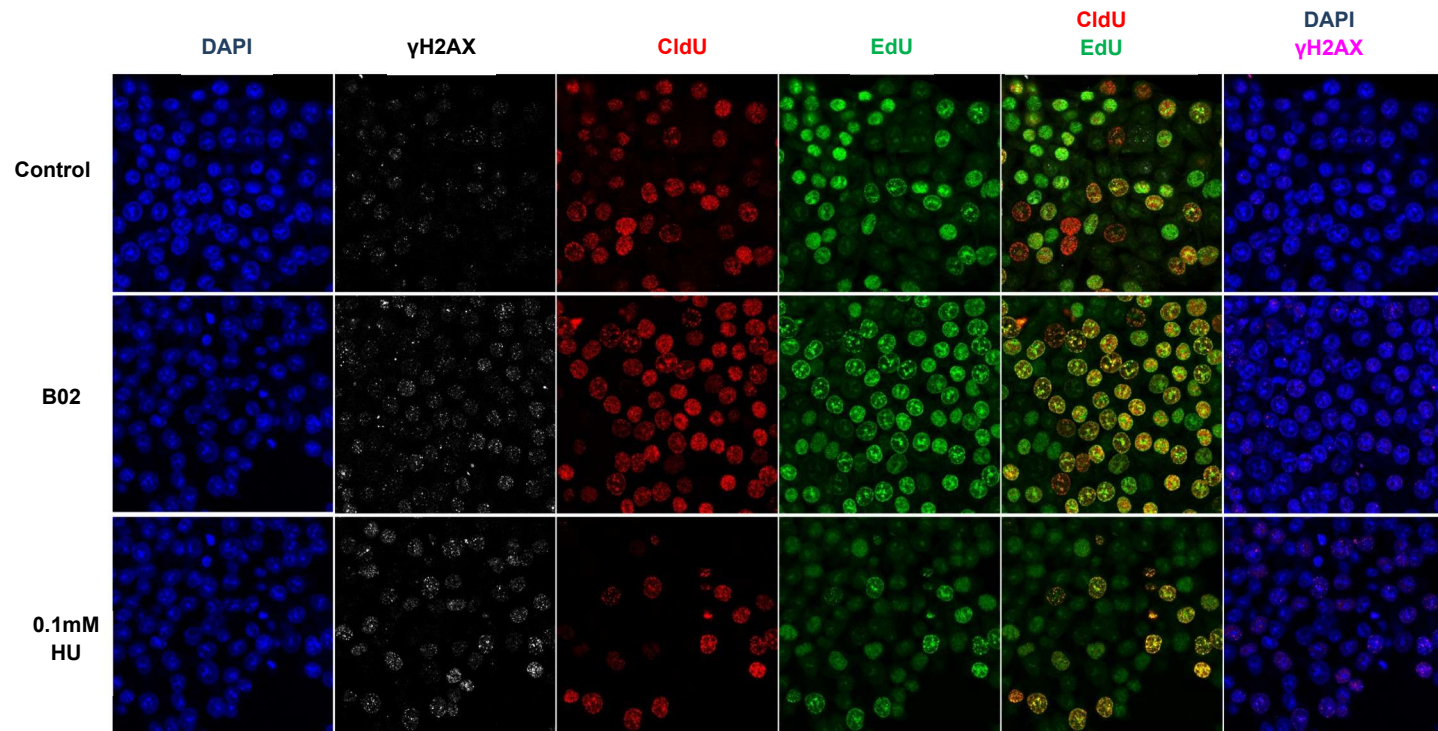


Figura 8. La inhibició de RAD51 incrementa els nivells de γ H2AX, però no incrementa l'activació del *checkpoint* de replicació en cèl·lules HCT116. Excepte la condició de cèl·lules asincròniques (C As), primer vàrem sincronitzar les cèl·lules amb timidina (Tim), i després vàrem fer els tractaments seguint l'esquema que es mostra a la figura. R: Recuperació. Dosi B02: 25 μ M. Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega. WB representatiu de 2 experiments independents. El control de timidina (C Tim) és una condició recollida just després del tractament amb timidina per veure l'efecte de la timidina en els nivells de les proteïnes analitzades. El control de timidina i 2 hores de recuperació (C Tim+2h R) és una condició per veure els nivells de les proteïnes analitzades després del procés complet de sincronització, just abans del tractament amb B02.

En veure l'augment de γ H2AX amb el tractament amb B02 volíem comprovar que es produïa també en cèl·lules no sincronitzades. Ens interessava eliminar l'efecte en l'augment de pCHK1 i γ H2AX que provoca la sincronització amb timidina. Per tant, vàrem dissenyar un experiment de microscòpia d'anàlisi de poblacions grans (*High content screening*) en el qual vàrem fer primer un pols amb CldU per a marcar les cèl·lules que estaven replicant el DNA just abans del tractament. Després, vàrem tractar amb B02 durant 4 hores per tal d'inhibir la RAD51 durant la fase S. En acabar vàrem fer un altre pols amb EdU, que és un altre anàleg de la timidina. Amb aquest disseny experimental vàrem aconseguir seleccionar només les cèl·lules que varen estar en fase S durant tot el temps que dura el tractament amb B02 (CldU i EdU

positives). Així vàrem evitar també l'efecte que pogués tenir el B02 en altres fases del cicle cel·lular sense haver de sincronitzar les cèl·lules. Com a control positiu vàrem utilitzar la condició tractada amb 0.1mM d'hidroxiurea.

Després de 4 hores amb l'inhibidor, les cèl·lules que estaven en fase S tenien major nombre de focus de γ H2AX. Els nivells eren semblants al de les cèl·lules tractades amb 0.1mM d'hidroxiurea (**figura 9**).



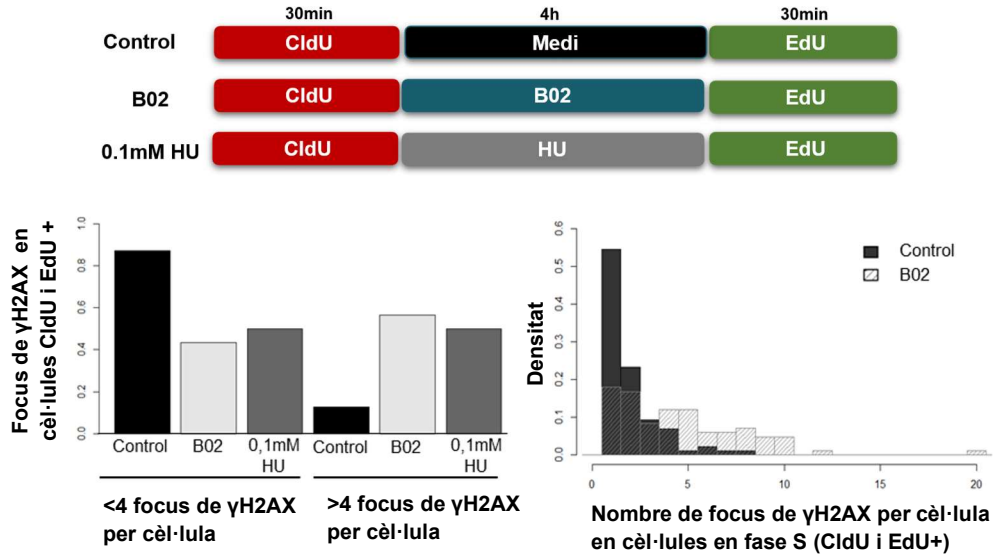


Figura 9. La inhibició de RAD51 incrementa els nivells de γ H2AX en cèl·lules HCT116. Vàrem fer el marcatge i tractaments tal com es mostra a l'esquema de dalt, després vàrem fixar les cèl·lules i fer la immunofluorescència de HCS. Dosi B02: 25 μ M. Dosi hidroxiurea (HU): 0.1mM. A la pàgina anterior es mostren imatges representatives de tot el mosaic. Només s'estudia la població en fase S durant tot el tractament (CldU i EdU positives). A la gràfica de l'esquerra es mostren les proporcions amb menys i amb més de 4 focus de γ H2AX per condició. A la gràfica de la dreta es troben superposats els histogrames de freqüència de les condicions control i tractada amb B02. Es vàren analitzar entre 500 i 1000 cèl·lules per condició.

Els focus de γ H2AX poden augmentar perquè es produeix ssDNA⁴⁹⁸. Per comprovar si es produïa dany al DNA després de la inhibició de RAD51 durant la replicació, el que vàrem fer fou repetir l'experiment anterior però en aquest cas detectant el nombre de focus de 53BP1.

Les cèl·lules que havien estat en fase S tot el temps del tractament amb B02 no presentaven un increment en focus de 53BP1 (**figura 10**). Per tant, l'increment anterior de focus de γ H2AX es produeix per l'augment de ssDNA i no perquè es generi dany al DNA.

RESULTATS

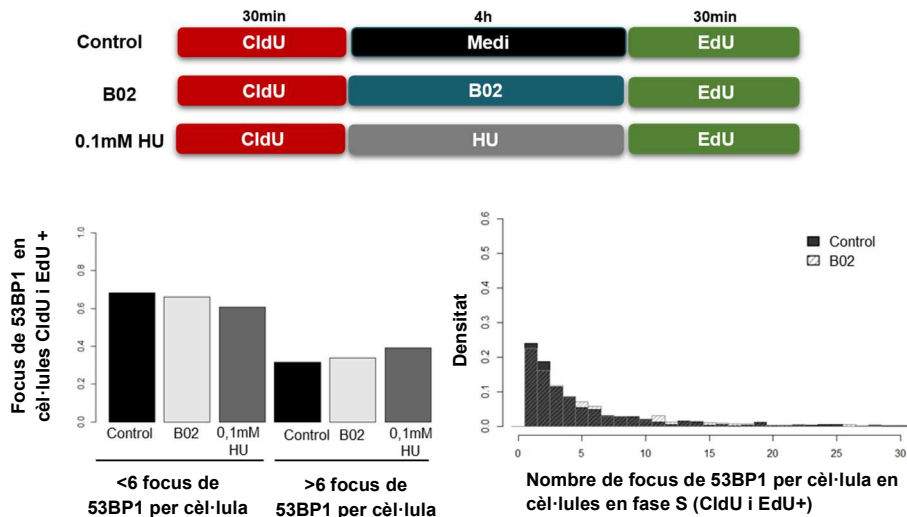


Figura 10. La inhibició de RAD51 no afecta els nivells de 53BP1 en cèl·lules HCT116. Vàrem fer el marcatge i tractaments tal com es mostra a l'esquema de dalt, després vàrem fixar les cèl·lules i fer la immunofluorescència de HCS. Dosi B02: 25µM. Dosi hidroxiurea (HU): 0.1mM. Només s'estudia la població en fase S durant tot el tractament (CldU i EdU positives). Al gràfic de l'esquerra es mostres les proporcions amb menys i amb més de 6 focus de 53BP1 per condició. A la dreta es troben superposats els histogrames de freqüència de les condicions control i tractada amb B02. Es vàren analitzar entre 1000 i 2000 cèl·lules per condició.

En descartar la hipòtesi de l'increment del dany al DNA, volíem detectar directament el ssDNA per immunofluorescència.

Per a què l'anticòs contra BrdU es pugui unir específicament al DNA cal que aquest estigui en cadena senzilla. Per això, les immunofluorescències contra BrdU requereixen d'un pas de desnaturalització del DNA, així es pot tenir tot el DNA en ssDNA i fer accessible tot el BrdU a l'anticòs. En aquest cas no ho férem, de manera que l'anticòs contra BrdU només s'hi podria unir a on hi hagués regions amb ssDNA. Prèviament al tractament vàrem fer una incubació llarga (24h) amb BrdU, per a tenir tot el DNA marcat amb BrdU abans de fer el tractament amb el B02. També volíem analitzar a la mateixa immunofluorescència si hi havia focus d'RPA, que s'uneix directament al ssDNA ⁴⁶⁶. Com a control positiu vàrem afegir una condició amb un tractament amb 10mM d'hidroxiurea.

Després d'un tractament de 4h amb B02 no vàrem observar cap augment ni en els focus de BrdU ni en els d'RPA (**figura 11**). Per tant,

això apunta que no es produeixen fragments grans de ssDNA, o com a mínim fragments prou grans com per poder-los detectar amb aquesta tècnica.

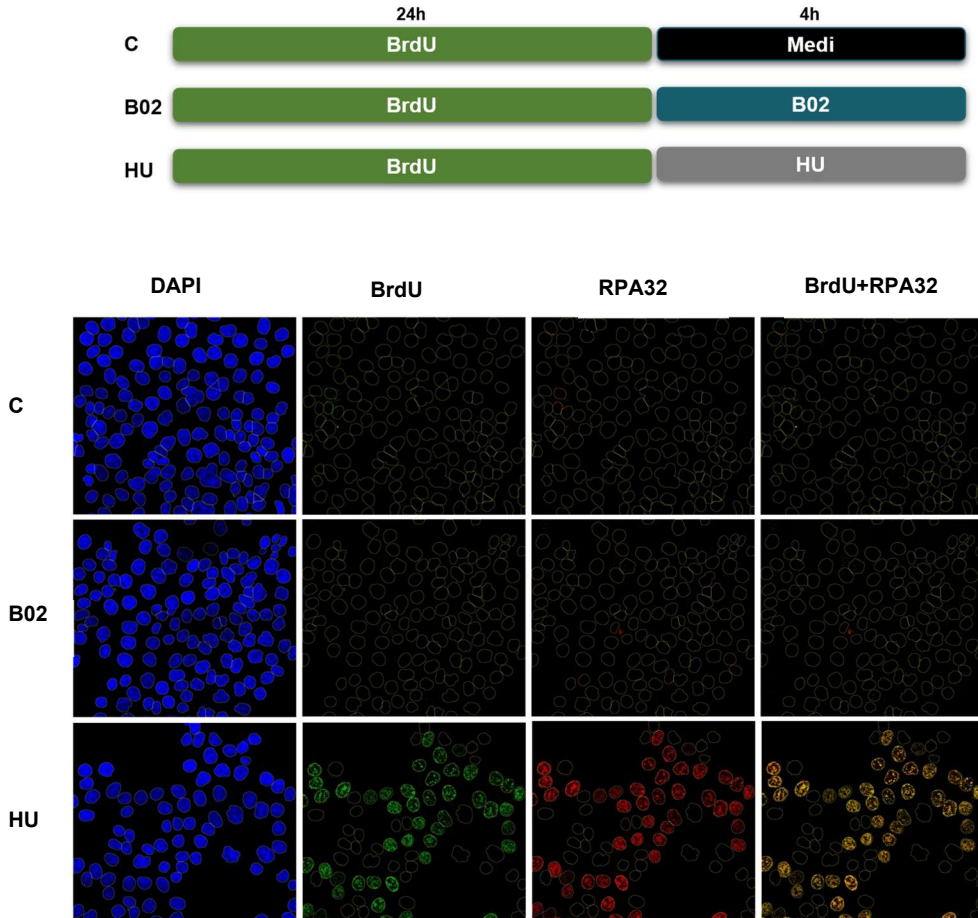


Figura 11. La inhibició de RAD51 no incrementa significativament els nivells de ssDNA en cèl·lules HCT116. Vàrem fer el marcatge i tractaments tal com es mostra a l'esquema de dalt, després vàrem fixar les cèl·lules i fer la immunofluorescència de HCS. En aquesta no es va desnaturalitzar el DNA. Dosi B02: 25µM. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Es mostren imatges representatives de tot el mosaic. Els perfils dels nuclis estan marcats en groc. Es vàren analitzar entre 1000 i 1500 cèl·lules per condició.

2.4.4. LA INHIBICIÓ DE RAD51 REDUEIX LA UNIÓ DE LA DNA POLIMERASA A AL DNA.

El veure l'increment en focus de γ H2AX després d'un tractament de 4 hores amb B02, i l'absència de grans fragments de ssDNA, la nostra hipòtesi fou que el tractament produïa fragments petits de ssDNA que no podíem detectar per immunofluorescència. En *Xenopus* s'ha demostrat que RAD51 interacciona amb la polimerasa α per a reclutar-la en forquetes que s'han parat per tal d'evitar la formació de grans fragments de ssDNA⁴⁸⁰.

Vàrem analitzar si amb la inhibició de RAD51 en cèl·lules HCT116 -que tenen un estrès replicatiu basal- hi hauria menys quantitat de DNA polimerasa α unida a la cromatina. Després d'un tractament de 4 hores amb B02 vàrem fer una extracció de cromatina i analitzar per WB la quantitat de DNA polimerasa α unida a ella. A la fracció de cromatina vàrem observar una disminució de la DNA polimerasa α després de la inhibició de RAD51 (**figura 12**). Aquest efecte no es va observar ni en el lisat total ni en la fracció citosòlica (**figura 12**).

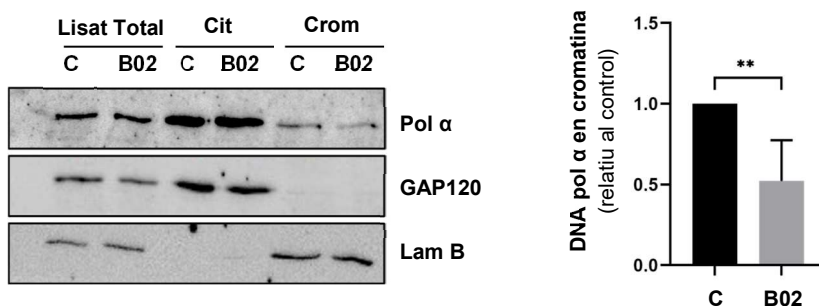


Figura 12. La inhibició de RAD51 redueix els nivells de polimerasa α unida a la cromatina en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules amb 25 μ M de B02 durant 4 hores. Després vàrem recollir les dues condicions i vàrem fer la extracció de la cromatina. Es va utilitzar GAP120 com a control de càrrega del citoplasma (Cit), i Làmina B com a control de càrrega de la fracció de la cromatina (Crom). Pel lisat total serveixen ambdues proteïnes. WB representatiu de 4 experiments independents (Pol α : Polimerasa α). A la dreta hi ha la mitjana i desviació estàndard de la quantificació del WB dels 4 experiments (resultats normalitzats pel control de càrrega (Làmina B) i respecte a la condició control). Només hem quantificat la fracció de la cromatina (t-test, **: P valor < 0.01).

En les cèl·lules hTERT-RPE vàrem veure prèviament com, provocant un estrès replicatiu que aturi les forquetes, aquestes necessitaven a RAD51 per a la seva progressió després del reinici de la forqueta de replicació ⁴⁹⁹. Així doncs, vàrem analitzar quatre condicions:

- C: Control
- HU+R: Per veure els nivells durant la recuperació d'un estrès replicatiu (control amb estrès replicatiu).
- HU+B02 : Per veure l'efecte de la inhibició de RAD51 durant el reinici i la replicació posterior.
- HU+R+B02: Per veure l'efecte de la inhibició un cop s'ha fet el reinici de les forquetes.

Els resultats van mostrar com en cèl·lules no tumorals hTERT-RPE després d'un estrès replicatiu (HU+B02) o durant la progressió després d'un estrès replicatiu (HU+R+B02) la inhibició de RAD51 redueix també la unió de la polimerasa α a la cromatina (**figura 13**).

RESULTATS

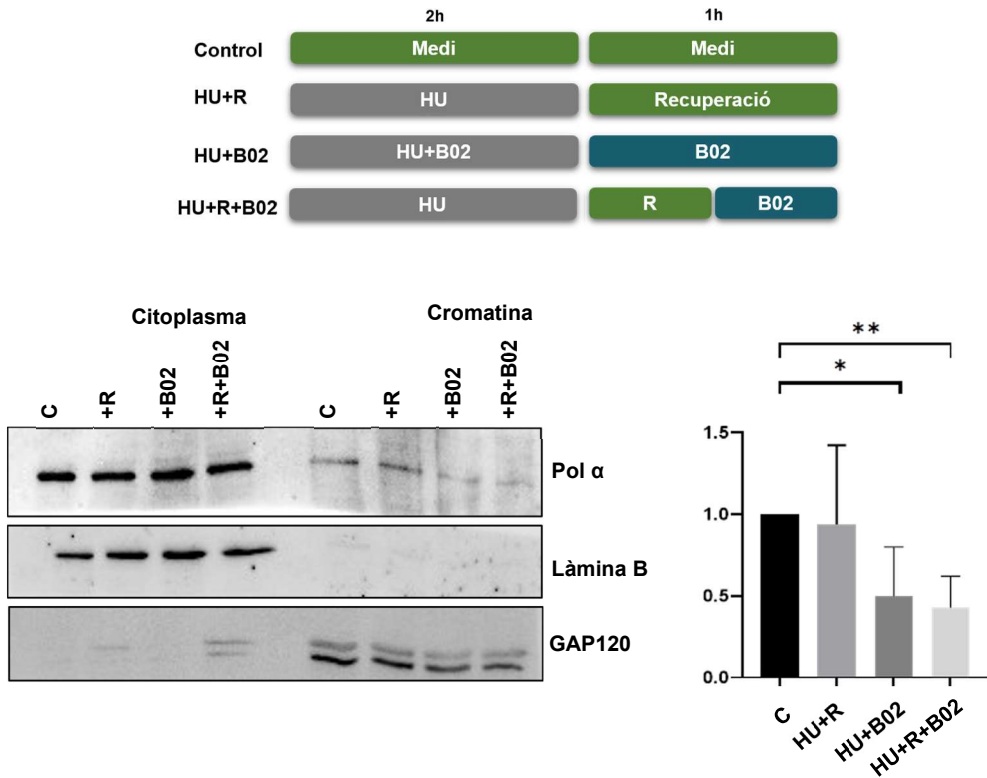


Figura 13. La inhibició de RAD51 redueix els nivells de polimerasa α unida a la cromatina en cèl·lules hTERT-RPE després d'un estrès replicatiu agut. Vàrem tractar les cèl·lules tal com es mostra a l'esquema de dalt. Després vàrem recollir les condicions i fer l'extracció de la cromatina. Es va utilitzar GAP120 com a control de càrrega del citoplasma), i Lâmina B com a control de càrrega de la fracció de la cromatina. WB representatiu de 5 experiments independents (Pol α : Polimerasa α . C: Control. R: Recuperació). A la dreta hi ha la mitjana i desviació estàndard de la quantificació del WB dels 5 experiments (resultats normalitzats pel control de càrrega (Lâmina B) i respecte a la condició control). Només hem quantificat la fracció de la cromatina (t-test, *: P valor < 0.05, **: P valor < 0.01).

Analitzant els resultats d'aquest capítol de manera global, podem veure com RAD51 és important pel manteniment de la progressió de la forqueta de replicació en condicions d'estrès replicatiu. La seva inhibició en cèl·lules de càncer colorectal produeix un retard en la progressió de la fase S, tot i que no compromet seriosament la viabilitat cel·lular. En condicions d'estrès replicatiu RAD51 està involucrada en la unió de la polimerasa α a la cromatina.

CAPÍTOL 3

LA INHIBICIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE NOUS
ORÍGENS DE REPLICACIÓ DESPRÉS
D'UN ESTRÈS REPLICATU SEVER
FRENA LA RECUPERACIÓ EN
CÈL·LULES HCT116

3.1. RESULTATS PREVIS

3.1.1. EL REINICI DE LA REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER ESTÀ COMPROMÈS EN hTERT-RPE

Els últims anys el nostre laboratori s'ha centrat en la resposta de les cèl·lules no tumorals contra l'estrès replicatiu. Aquest estrès el vàrem dividir en dos tipus diferents: estrès replicatiu agut -on no es produeix el col·lapse de les forquetes- i estrès replicatiu sever -on hi ha un col·lapse de les forquetes-. L'estrès replicatiu agut el vàrem generar amb un tractament de 10mM d'hidroxiurea durant 2 hores i el sever amb la mateixa dosi d'hidroxiurea durant 14h.

L'anàlisi per comprovar si les cèl·lules són capaces de finalitzar el cicle cel·lular el vàrem fer per citometria de flux. Primer vàrem fer un pols amb BrdU per marcar les cèl·lules en fase S just abans de produir l'estrès replicatiu. Després d'eliminar la hidroxiurea es varen deixar recuperar les cèl·lules en medi amb nocodazole. El nocodazole és un inhibidor de la despolimerització dels microtúbuls i para les cèl·lules al final de la mitosi⁵⁰⁰.

Després d'un estrès replicatiu agut, les cèl·lules hTERT-RPE són capaces de reiniciar la replicació un cop eliminada la font de l'estrès (HU). En canvi després d'un estrès replicatiu sever, durant les 12 hores de recuperació, les cèl·lules no són capaces d'acabar el cicle cel·lular i una part de la població es queda parada en fase S al no poder acabar la replicació (**figura 1**).

RESULTATS

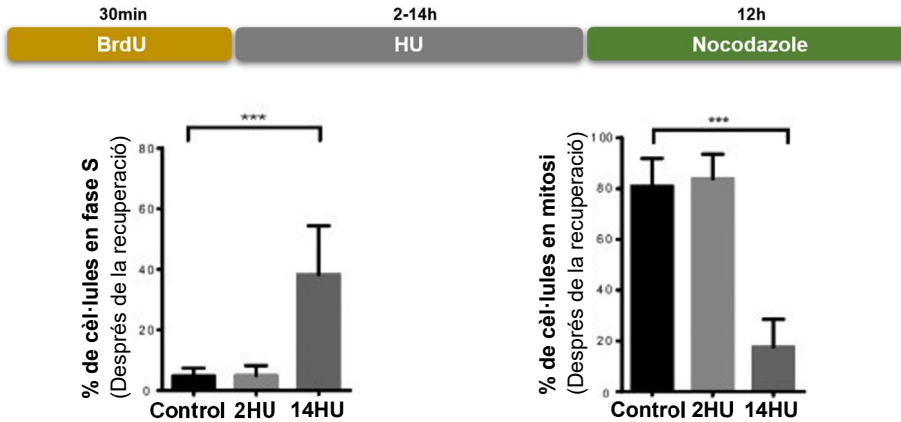
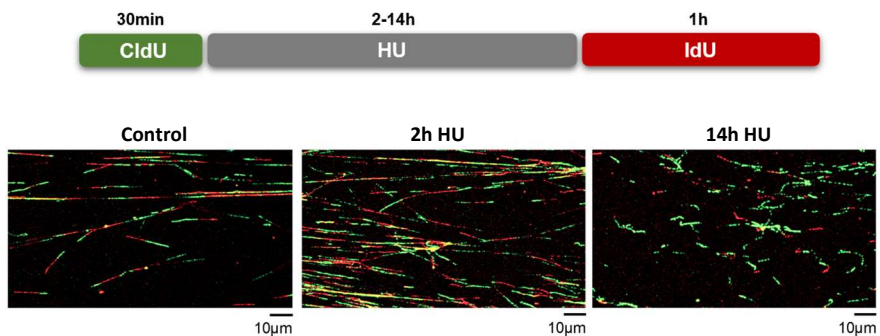


Figura 1. L'estrès replicatiu sever compromet el reinici de la replicació i la progressió en el cicle en cèl·lules hTERT-RPE. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Només vàrem analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase S (gràfic de l'esquerra) i el de cèl·lules mitòtiques (gràfic de la dreta). Als gràfics es mostra la mitjana i la desviació estàndard de 6 experiments independents (6n) (T-test,***: P valor <0.001).

Analitzant la recuperació per DNA fiber assay es pot veure com després d'un estrès replicatiu sever, tal com s'hi podria esperar amb els resultats de citometria obtinguts, el nombre de forquetes parades va augmentar i el reinici de les forquetes es va reduir (**figura 2**). Malgrat aquesta disminució en el reinici, l'activació de nous orígens no varia (**figura 2**).



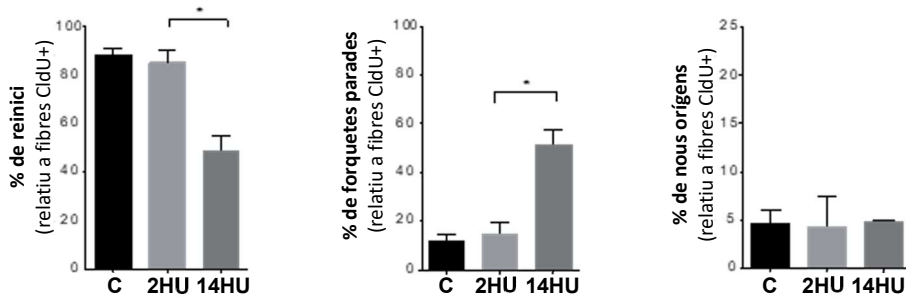


Figura 2. Durant la recuperació de l'estrès replicatiu sever incrementa el nombre de forquetes parades en cèl·lules hTERT-RPE. Vàrem fer un marcatge tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Les imatges són representatives de cada condició. Vàrem analitzar la dinàmica de replicació i quantificar el percentatge respecte el total de fibres marcades amb CldU de forquetes que reinicien (fibres marcades amb CldU i IdU, [gràfic a l'esquerra]), de forquetes parades (fibres marcades només amb CldU [gràfic del centre]) i d'activació de nous orígens (fibres marcades amb IdU [gràfic a la dreta]). C: Control; 2HU: 2 hores amb HU; 14HU: 14 hores amb HU. Es mostra la mitjana i desviació estàndard de tres experiments independents (t-test, *: P valor <0.05). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició i experiment.

L'activació de nous orígens depèn principalment de les proteïnes CDK2-Ciclina A i CDC7⁵⁰¹. Varem analitzar per *western blot* (WB) els nivells de proteïnes importants per a l'activació de nous orígens i la progressió en el cicle cel·lular, en aquest cas ciclina A i ciclina B.

Com que els nivells d'aquestes proteïnes varien durant el cicle cel·lular²⁰, es van sincronitzar les cèl·lules en fase S amb timidina. Aquestes ciclins es degraden per la ubiquitinització que fa APC/C^{Cdh1} i la posterior proteòlisis per part del proteasoma⁵⁰². Així que vàrem afegir a algunes condicions l'inhibidor del proteasoma MG-132, o vàrem deplecionar per siRNA el cofactor Cdh1, que és el responsable del reconeixement de les ciclins A i B per part d'APC/C⁵⁰². D'aquesta manera si els nivells es reduïen, podríem saber si era per degradació pel proteasoma o no.

Analitzant el nivell de les ciclins A i B, vàrem poder apreciar com durant l'estrès replicatiu es va produir una activació de l'APC/C^{Cdh1} i la posterior degradació de les ciclins (figura 3). Durant l'estrès replicatiu sever, la

inhibició del proteasoma o la depleció de la Cdh1 va restablir els nivells de ciclina A i de ciclina B (**figura 3**).

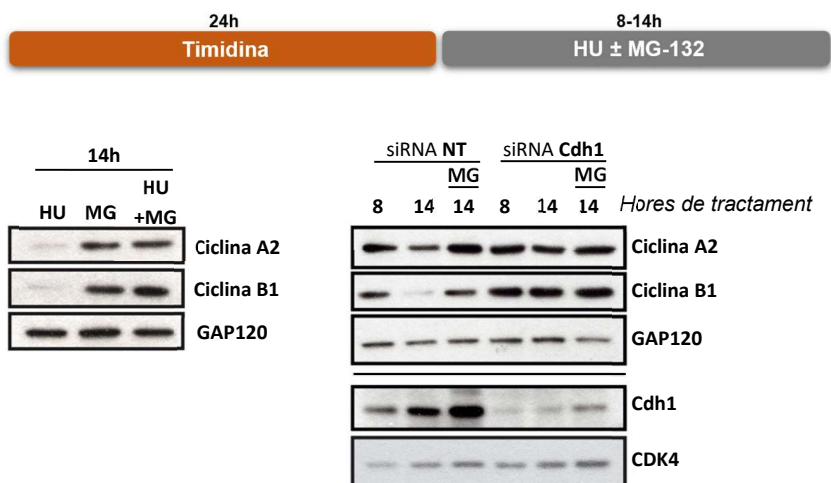


Figura 3. Durant l'estrès replicatiu sever s'activa APC/ C^{Cdh1} en cèl·lules hTERT-RPE. Tal com indica l'esquema, es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosi MG-132 (MG): 10µM. Es va utilitzar GAP120 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 3 experiments independents. En el cas del WB de la dreta abans de la sincronització amb timidina es van transfectar les cèl·lules amb el siRNA indicat (NT: *non-target*). Després es van tractar les diferents condicions i recollir-les al temps indicat per fer el WB. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosi MG-132 (MG): 10µM. Vàrem utilitzar CDK4 o GAP120 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 3 experiments independents.

3.1.2. LES CÈL·LULES HCT116 RECUPEREN LA REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER

A diferència de l'observat en cèl·lules hTERT-RPE, després d'un estrès replicatiu sever, les cèl·lules HCT116 eren capaces de reiniciar i finalitzar la replicació. Durant les 12 hores que vàrem deixar a les cèl·lules recuperar-se, gairebé la meitat de la població va arribar a mitosi (**figura 4**).

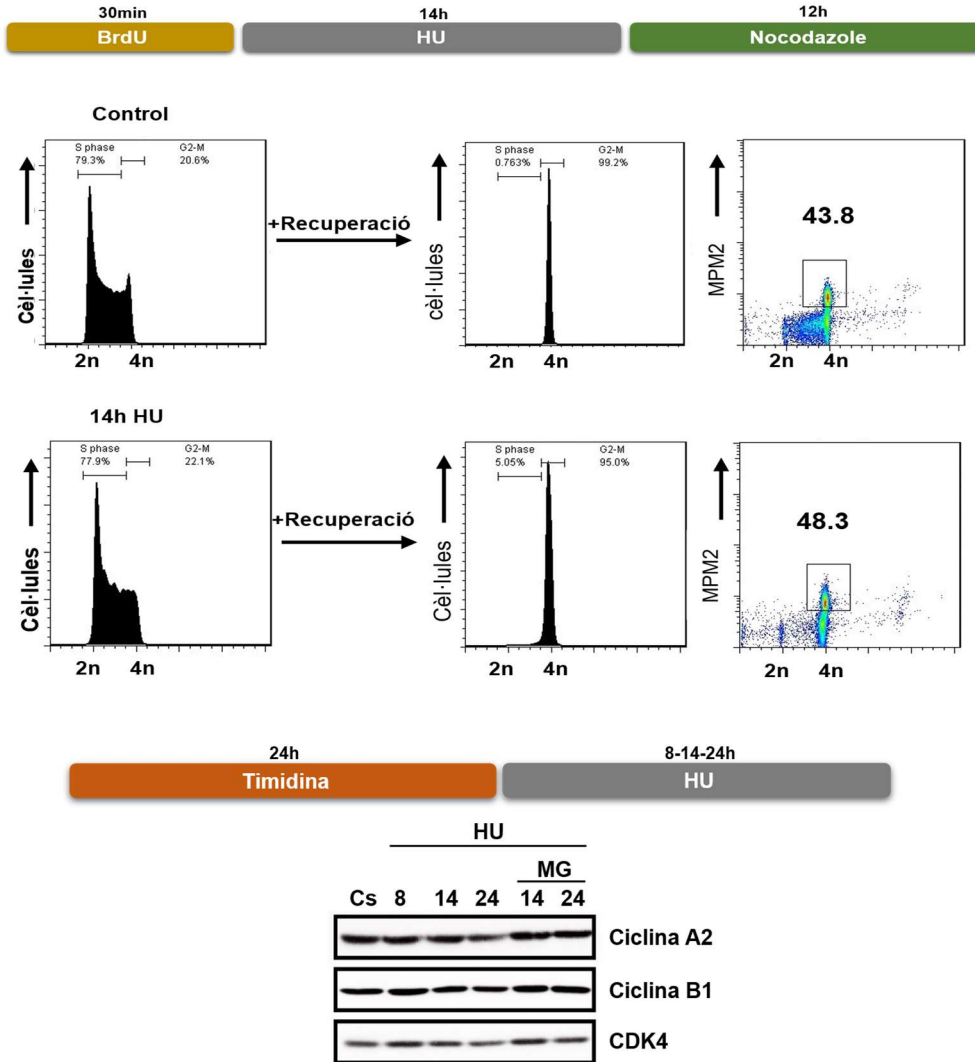


Figura 4. Les cèl·lules HCT116 finalitzen la replicació i progressen en el cicle cel·lular després d'un estrès replicatiu sever sense activar APC/C^{Cdh1}. Es va fer un marcatge amb BrdU i tractament de les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema de dalt. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Només es va analitzar la població amb marcatge de BrdU. Es va calcular el percentatge de cèl·lules en fase S i el de cèl·lules mitòtiques (Amb marcatge de MPM2). Es mostren els resultats de citometria d'un experiment representatiu de 3. Pel WB es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosi MG-132 (MG): 10µM. Al tractament de 14MG es va afegir MG-132 a les 8 hores de tractament amb hidroxiurea. Al tractament de 24 MG es va afegir MG-132 a les 14 hores de tractament amb hidroxiurea. Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 3 experiments independents .

RESULTATS

A més a més, el temps que va durar l'estrès replicatiu els nivells de ciclins van romandre estables (**figura 4**). En les cèl·lules HCT116, de manera semblant al que passava amb hTERT-RPE, després d'un estrès replicatiu sever el nivell de reinici de les forquetes es va reduir i en conseqüència el nombre de forquetes que van romandre parades va augmentar. En canvi, a diferència de les cèl·lules hTERT-RPE, el nivell d'activació de nous orígens va augmentar de manera considerable (**figura 5**).

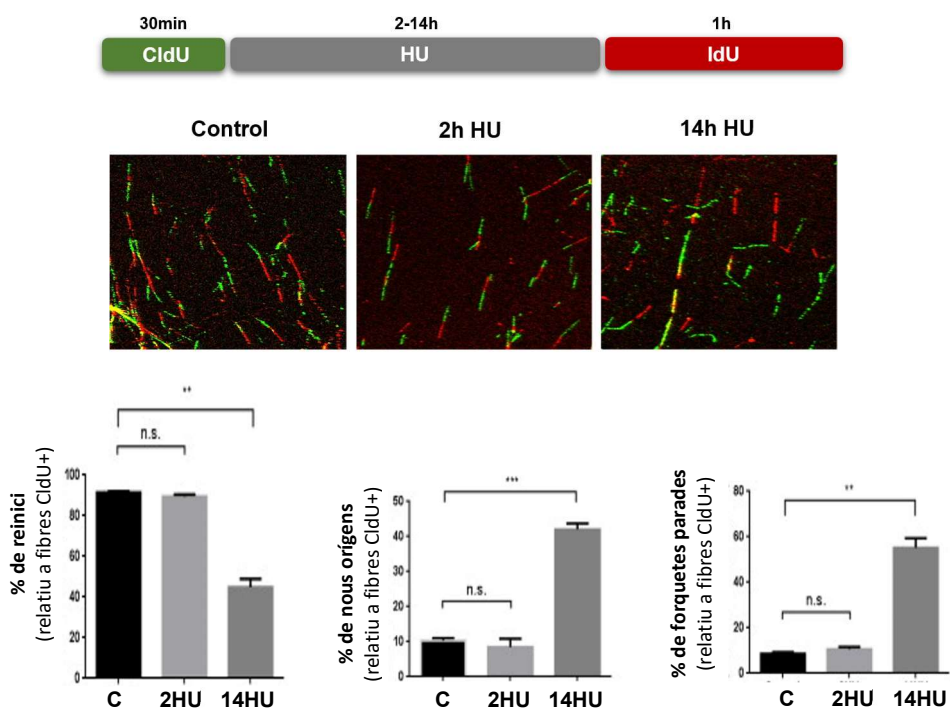


Figura 5. Durant la recuperació de l'estrès replicatiu les cèl·lules HCT116 activen nous orígens de replicació. Vàrem fer un marcatge tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Les imatges són representatives de cada condició. Vàrem analitzar la dinàmica de replicació i quantificar el percentatge respecte el total de fibres marcades amb CldU de forquetes que reinicien (fibres marcades amb CldU i IdU, [gràfic a l'esquerra]), de forquetes parades (fibres marcades només amb CldU [gràfic del centre]) i de l'activació de nous orígens (fibres marcades amb IdU [gràfic a la dreta]). C: Control; 2HU: 2 hores amb HU; 14HU: 14 hores amb HU. Es mostra la mitjana i desviació estàndard de tres experiments independents (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.01). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició i experiment.

3.2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest capítol són:

- I. Comprovar si l'efecte produït per aquest estrès replicatiu també es dona amb altres compostos o amb una dosi més baixa d'hidroxiurea.
- II. Comprovar si després d'un estrès replicatiu sever la inhibició de l'activació de nous orígens produeix una alteració en la recuperació de la replicació en cèl·lules tumorals.

3.3. RESULTATS

3.3.1. LA GEMCITABINA REPRODUEIX ELS EFECTES DE LA HU EN hTERT-RPE I HCT116.

El primer que volíem saber era si amb altres compostos que indueixen un estrès replicatiu podríem observar el mateix que amb la hidroxiurea. Vàrem seleccionar la gemcitabina, que també és un inhibidor de la ribonucleòtid sintasa ⁵⁰³. Així doncs, vàrem tractar les cèl·lules amb 20nM de gemcitabina durant 14 hores. Després d'eliminar el fàrmac les vàrem deixar recuperar durant 12 hores. En el cas de les hTERT-RPE, després de la recuperació gran part de la població romanien en fase S (**figura 6**). A diferència de les cèl·lules no transformades, durant la recuperació les HCT116 varen acabar de replicar el DNA i progressar en el cicle cel·lular (**figura 6**).

RESULTATS

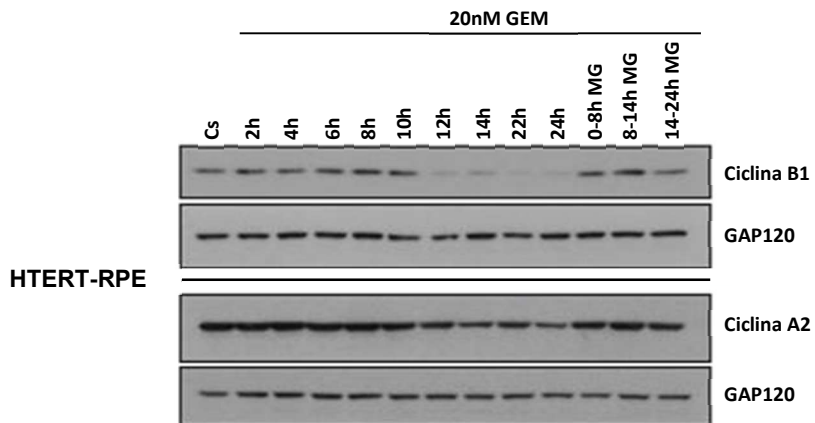
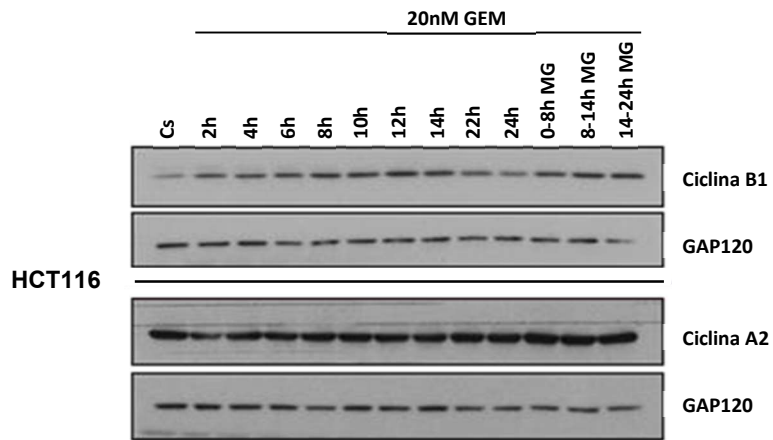
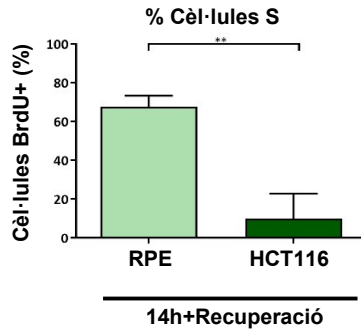


Figura 6. Les cèl·lules HCT116 no activen APC/C^{Cdh1}, finalitzen la replicació i progressen en el cicle cel·lular després d'un estrès replicatiu sever induït amb Gemcitabina. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema de dalt. Dosi Gemcitabina (GEM): 20nM. Només es va analitzar la població amb marcatge de BrdU. Es va calcular el percentatge de cèl·lules en fase S (per contingut de DNA). Es mostra la mitjana de 3 experiments independents (t-test, **: P valor <0.01). Les cèl·lules per l'anàlisi per WB es van sincronitzar amb timidina abans de fer els tractaments tal com s'indica a l'esquema de baix. Dosi Gemcitabina (GEM): 20nM. Dosi MG-132 (MG): 10µM. L'interval de les hores davant de MG indica el temps on es va afegir l'inhibidor durant el tractament amb gemcitabina. Les mostres tractades amb gemcitabina i MG-132 es van recollir en acabar el tractament amb MG-132. També es va utilitzar un control de sincronització (Cs). Es va utilitzar GAP120 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 3 experiments independents.

A més a més, per WB es va veure una disminució dels nivells de ciclina B i ciclina A en les cèl·lules hTERT-RPE (**figura 6**). Els nivells d'aquestes ciclins es recuperaven amb l'addició de MG-132. De manera que durant l'estrès replicatiu provocat amb gemcitabina també es va produir la degradació de les ciclins per part del proteasoma (**figura 6**).

En canvi, en les cèl·lules HCT116, després de l'estrès replicatiu sever induït amb gemcitabina, les cèl·lules es van recuperar i acabar la replicació (les cèl·lules prèviament marcades en BrdU ja no estaven en fase S) (**figura 6**). Durant el tractament el nivells de ciclina A i ciclina B van romandre estables, indicant que no s'havia produït l'activació de l'APC/C^{Cdh1} (**figura 6**).

Així doncs, amb tots els resultats anteriors vàrem veure com la gemcitabina reproduïa els mateixos efectes que la hidroxiurea.

3.3.2. 2mM HU INDUEIX UNA ACTIVACIÓ D'APC/C^{Cdh1} A TEMPS MÉS LLARGS QUE 10mM HU

Prèviament al laboratori es va decidir utilitzar 10mM d'hidroxiurea (HU) perquè amb aquesta dosi s'aconseguia una inhibició completa de la replicació i no s'observava la incorporació de nucleòtids per *DNA fibre assay*.

Vist això, vàrem comprovar si amb dosis més baixes d'hidroxiurea també es produïa una resposta diferencial entre cèl·lules tumorals i no tumorals, promoguda per l'activació d'APC/C^{Cdh1}. En aquest cas vàrem fer un tractament de 2mM d'hidroxiurea i vàrem comprovar per

citometria la recuperació de la replicació i per WB si s'activava APC/C^{Cdh1} i es degradaven les ciclines A i B.

En consonància amb els resultats obtinguts per WB, es va veure com per citometria de flux, després de 14 hores de tractament, les cèl·lules hTERT-RPE eren capaces de finalitzar la replicació i progressar en el cicle cel·lular (**figura 7**). En canvi durant les 12 hores de recuperació després de 24 hores d'estrès replicatiu induït per 2mM d'hidroxiurea, part de les cèl·lules no van poder finalitzar la replicació i van romandre parades en fase S (**figura 7**). En el cas d'HCT116 les cèl·lules van ser capaces d'acabar la replicació i progressar en el cicle cel·lular després de 14 i de 24 hores d'estrès replicatiu amb 2mM d'hidroxiurea.

A diferència de l'estrès replicatiu induït amb 10mM d'hidroxiurea, el qual en hTERT-RPE produïa una degradació de les ciclines abans de les 14 hores (**figura 3**), amb 2mM la degradació es produeix a les 22-24 hores (**figura 7**). Aquesta degradació es va revertir amb la inhibició del proteasoma, per tant hi va haver activació de l'APC/C^{Cdh1}. En canvi en les cèl·lules HCT116 els nivells de ciclines es van mantenir estables les 24 hores del tractament, tal com succeïa amb 10mM d'hidroxiurea (**figura 7**).

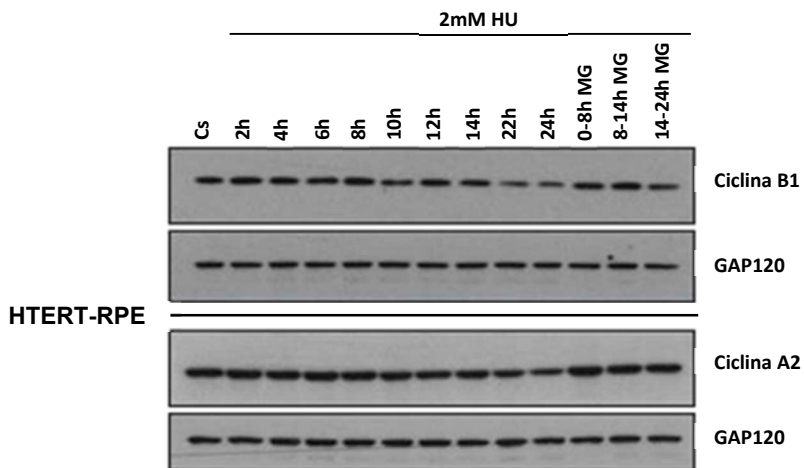
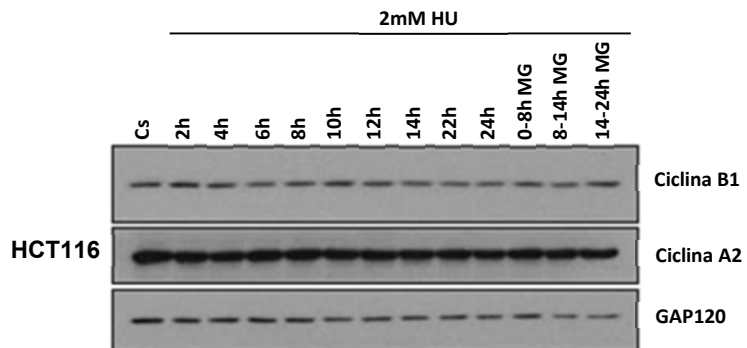
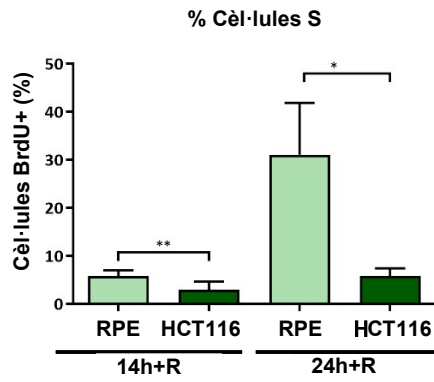


Figura 7. Les cèl·lules HCT116 no activen APC/C^{Cdh1}, finalitzen la replicació i progressen en el cicle cel·lular després d'un estrès replicatiu sever induït per 24 hores amb 2mM d'hidroxiurea. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema de dalt. Dosi hidroxiurea (HU): 2mM. Només es va analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase S. Es mostra la mitjana de 3 experiments independents (t-test, **: P valor <0.01). Les cèl·lules per l'anàlisi per WB es van sincronitzar amb timidina abans de fer els tractaments tal com s'indica a l'esquema de baix. Dosi hidroxiurea (HU): 2mM. Dosi MG-132 (MG): 10µM. L'interval de les hores davant de MG indica el temps on es va afegir l'inhibidor durant el tractament amb hidroxiurea. Les mostres tractades amb gemcitabina i MG-132 es van recollir en acabar el tractament amb MG-132. També es va utilitzar un control de sincronització (Cs). Es va utilitzar GAP120 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 3 experiments independents.

Un cop analitzats aquests resultats, vàrem veure si el fet d'inhibir els nous orígens, tal com succeeix a les cèl·lules no tumorals amb l'activació d'APC/C^{Cdh1}, podria afectar les cèl·lules tumorals i sensibilitzar-les a l'estrès replicatiu. Els inhibidors que vàrem seleccionar per tal d'inhibir els nous orígens foren: Roscovitina i CDK2 inhibitor II. Cada un d'aquests inhibidors el tractarem en apartats diferents dintre d'aquest capítol.

ROSCOVITINA

La roscovitina és un inhibidor de les CDKs, concretament CDK1 i CDK2⁵⁰⁴. Prèviament l'havíem utilitzat al laboratori per inhibir l'activació de nous orígens en experiments de *DNA fibre assay*⁵⁰⁵.

3.3.3. LA ROSCOVITINA SENSIBILITZA A LES CÈL·LULES HCT116 A L'ESTRÈS REPLICATIU INDUÏT AMB GEMCITABINA.

Vàrem avaluar la viabilitat cel·lular després d'un estrès replicatiu sever induït amb gemcitabina (20nM), i la posterior inhibició de l'activació de nous orígens amb roscovitina en cèl·lules HCT116. Vàrem realitzar un assaig de clonogenicitat per estudiar si les cèl·lules eren capaces de resistir el tractament i poder formar colònies.

El tractament es va fer de manera seqüencial tal com està indicat a l'esquema de la **figura 8**. Primer vàrem generar l'estrès replicatiu amb 20nM de gemcitabina durant 14 hores. Un cop fet l'estrès replicatiu vàrem fer un tractament de 12 hores amb la roscovitina per tal d'inhibir els nous orígens durant la recuperació. Vàrem deixar el mateix temps de recuperació amb l'inhibidor que havíem fet en els experiments de citometria (12 hores), perquè així es podrien comparar millor els diferents experiments entre si. Després vàrem eliminar l'inhibidor i deixar les cèl·lules en medi durant 8 hores més. Així permetíem que les cèl·lules es recuperessin del tractament en condicions òptimes i replantar-les després d'haver-se recuperat. Si no ho haguéssim fet així, les cèl·lules es recollirien just després del tractament i un cop replantades es recuperarien a la placa, on només hi hauria cèl·lules individuals separades de la resta, cosa que afegiria nous estressos a l'experiment.

L'última hora de tractament amb hidroxiurea (a les 13 hores) vàrem afegir la roscovitina, perquè al moment de treure la hidroxiurea les CDK ja estiguin inhibides.

Vàrem utilitzar 3 dosis de roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Com a control de l'inhibidor, vàrem fer un tractament de 13 hores només amb

RESULTATS

roscovitina per veure com afectava la inhibició de les ciclines durant aquest temps a la viabilitat cel·lular.

Per replantar només vàrem recollir les cèl·lules que estaven enganxades a la placa, de manera que les que haguessin mort com a conseqüència del tractament no les replantaríem, ja que aquestes es trobarien en suspensió al medi.

Comparat amb l'efecte del tractament només amb gemcitabina, el fet de combinar-la amb la roscovitina va disminuir encara més el nombre de clons formats (**figura 8**). Cal destacar que el tractament control només amb 5µM o 10µM de roscovitina, no produïa cap efecte sobre la viabilitat cel·lular. Per tant amb aquestes dosis de roscovitina es va obtenir un efecte sinèrgic al augmentar l'efecte produït per la gemcitabina (**figura 8**).

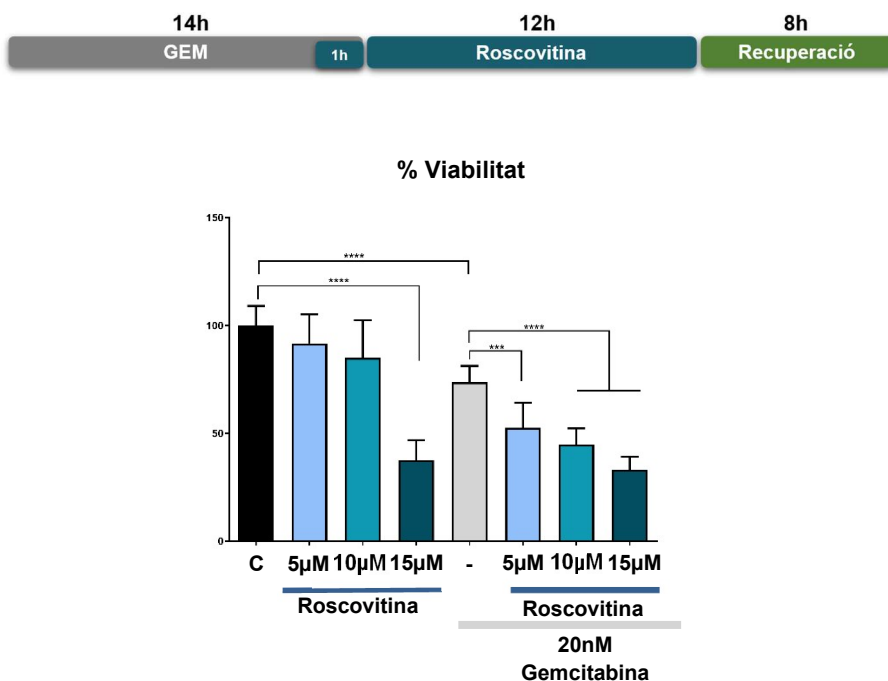


Figura 8. L'addició de Roscovitina després d'un estrès replicatiu sever induït amb gemcitabina redueix la capacitat per formar colònies en cèl·lules HCT116. Vàrem fer els tractaments tal qual s'indica a l'esquema. Dosi gemcitabina (GEM): 20nM. Dosis Roscovitina: 5 µM , 10 µM i 15 µM. Després de les 8 hores amb medi sense cap inhibidor vàrem replantar les cèl·lules per diluir-les (200 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous [per triplicat]). 7 dies després vàrem fixar, tenyir i contar les colònies. Vàrem calcular la

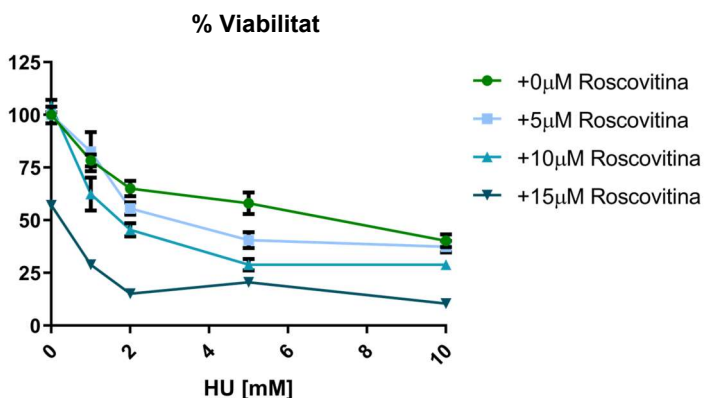
mitjana de cada triplicat i normalitzar pel control. El gràfic mostra la mitjana de tres experiments independents (t-test, ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001).

Per tant podem veure com afegint un inhibidor de nous orígens durant la recuperació després d'un estrès replicatiu sever induït amb 20nM de gemcitabina, la viabilitat es reduïa. Després de comprovar l'efecte de la roscovitina amb la gemcitabina vàrem analitzar si també es produïa després d'un estrès replicatiu induït amb hidroxiiurea.

3.3.4. LA ROSCOVITINA SENSIBILITZA A LES CÈL·LULES HCT116 A L'ESTRÈS REPLICATIU INDUÏT AMB HIDROXIUREA.

Prèviament ja havíem observat que, tot i que ambdues condicions aturaven les forquetes de replicació, hi havia diferències en l'efecte que produeix la hidroxiiurea a 2mM i a 10mM durant 14 hores (**figura 7**). En aquest cas vàrem fer un tractament seqüencial igual que amb la gemcitabina, però testant diferents dosis d'hidroxiiurea (1mM, 2mM, 5mM i 10mM) amb les de roscovitina utilitzades abans (5µM, 10µM i 15µM).

La inhibició de l'activació de nous orígens després de l'estrès replicatiu sever va provocar una major disminució de la viabilitat cel·lular (**figura 9**). Hi ha diverses combinacions amb les que vàrem obtenir efectes sinèrgics. El control només amb 15µM de roscovitina durant 13 hores ja va reduir la viabilitat al voltant del 50%. En canvi, els tractaments control durant 13 hores només amb 5µM o 10µM de roscovitina no produïen cap alteració en la viabilitat cel·lular, i en afegir-les després de 5mM d'hidroxiiurea es reduïa la viabilitat (**figura 9**). Per tant aquestes combinacions mostraven un efecte sinèrgic entre la hidroxiiurea i la roscovitina al combinar-les de manera seqüencial.



		0mM HU			
		+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM
0mM HU	5 µM	n.s.	-	-	-
	10 µM	n.s.	n.s.	-	-
	15 µM	****	****	****	-

		1mM HU			
		+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM
1mM HU	5 µM	n.s.	-	-	-
	10 µM	n.s.	n.s.	-	-
	15 µM	****	****	***	-

		2mM HU			
		+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM
2mM HU	5 µM	n.s.	-	-	-
	10 µM	***	*	-	-
	15 µM	****	****	****	****

		5mM HU			
		+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM
5mM HU	5 µM	*	-	-	-
	10 µM	****	*	-	-
	15 µM	****	****	***	*

		10mM HU			
		+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM
10mM HU	5 µM	n.s.	-	-	-
	10 µM	**	*	-	-
	15 µM	****	****	****	****

Figura 9. L'addició de roscovitina després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea redueix la capacitat per formar colònies en cèl·lules HCT116. Vàrem fer els tractaments tal com s'indica a l'esquema de dalt. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis Roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Després de les 8 hores amb medi sense cap inhibidor, vàrem replantar les cèl·lules per diluir-les (200 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous [per triplicat]). 7 dies després vàrem fixar, tenyir i contar les colònies. Vàrem calcular la mitjana de cada triplicat i normalitzar pel control. El gràfic mostra la mitjana i desviació estàndard de tres experiments independents. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hydroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de la taula).

Un cop vist que en afegir la roscovitina després d'un tractament amb hidroxiurea potenciava l'efecte d'aquesta sobre la viabilitat cel·lular, vàrem determinar quin percentatge de cèl·lules era capaç de finalitzar la replicació amb la inhibició de nous orígens. Així podríem veure

realment la conseqüència d'inhibir els nous orígens en el reinici de la replicació i la finalització de la fase S.

El procediment va ser semblant a la resta d'experiments de citometria que hem realitzat (amb marcatge de BrdU i nocodazole durant la recuperació). Els tractaments varen ser iguals que amb els clonogènics, amb la diferència que durant les 12 hores de recuperació amb presència o no de l'inhibidor es va afegir nocodazole per evitar que les cèl·lules acabessin la mitosi i es divideixin. Just després de les 12 hores de recuperació amb nocodazole i amb o sense roscovitina, les mostres es varen recollir per fer l'anàlisi per citometria de flux. Com a control per veure com afectaven les dosis de roscovitina utilitzades a la replicació, vàrem fer un tractament amb roscovitina i nocodazole durant 12 hores.

Amb aquestes condicions, en afegir l'inhibidor després de l'estrès replicatiu sever, es produïa mort cel·lular. Per tant, per fer la citometria només vàrem recollir les cèl·lules adherides a la placa, per a determinar la recuperació només en les cèl·lules viables. D'aquesta manera podríem comparar millor els percentatges entre les diferents combinacions. Més endavant per altres mètodes ja quantificaríem la mortalitat cel·lular fruit de l'addició dels inhibidors.

Cap de les dosis d'hidroxiurea va tenir un efecte sobre el nombre de cèl·lules que acabaren la replicació i arribaren a G2/M (**figura 10**).

Amb els tractament control només amb roscovitina, les dosis més baixes (5 μ M i 10 μ M) no varen tenir cap efecte. En canvi la més elevada (15 μ M) sí que va produir un petit efecte sobre el nombre de cèl·lules que acabaven la replicació (**figura 10**). No obstant això, el fet de combinar hidroxiurea amb roscovitina durant la recuperació, va fer que una part de la població encara seguís en fase S al final de les 12 hores de recuperació després de l'estrès replicatiu. Els majors efectes es van observar amb 5mM i 10mM d'hidroxiurea. Algunes combinacions produïen efectes sinèrgics, ja que hi ha combinacions on cap dels dos compostos per separat tenien cap efecte i el fet de combinar-los va fer que hi hagués una població de cèl·lules que no va arribar a G2/M. Per

RESULTATS

exemple la combinació de 5mM o 10mM d'hidroxiurea amb 10µM de roscovitina (**figura 10**).

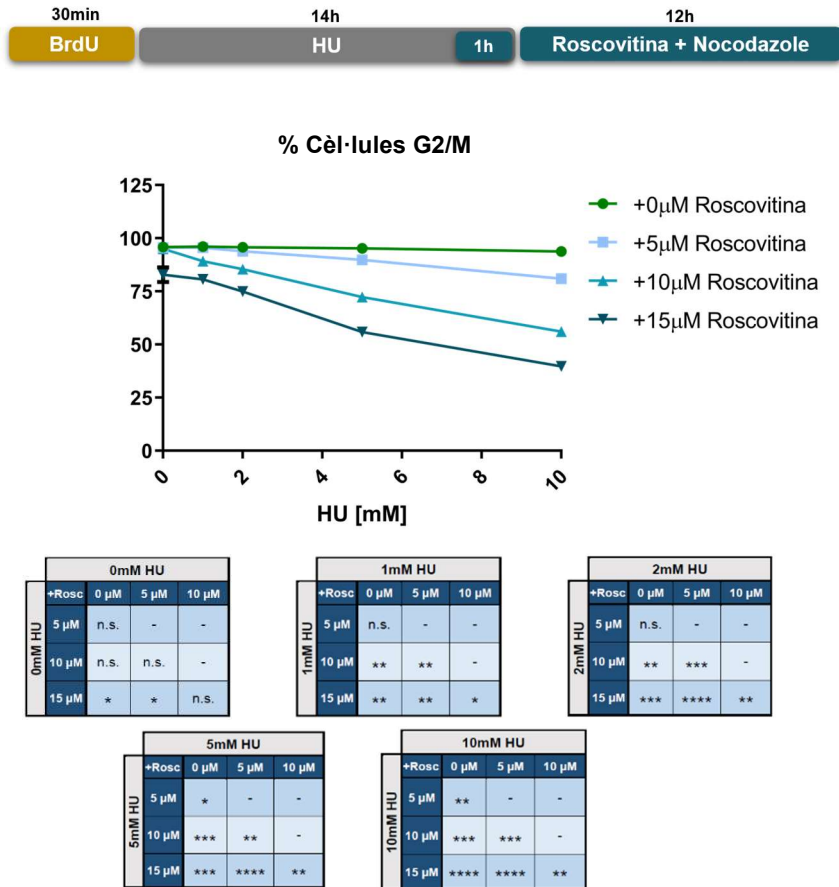


Figura 10. L'addició de roscovitina després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea redueix la població que finalitza la replicació en cèl·lules HCT116. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i després tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis Roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Només vàrem analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase G2/M. Es mostra la mitjana i desviació estàndard de 3 experiments independents. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hidroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de la taula).

Amb aquests resultats vàrem poder comprovar com afegint roscovitina després d'un estrès replicatiu sever, les cèl·lules HCT116 veuen compromesa la recuperació de la replicació i la seva viabilitat cel·lular.

3.3.5. LA ROSCOVITINA INHIBEIX L'ACTIVACIÓ DE NOUS ORÍGENS.

El següent que vàrem analitzar va ser si les dosis utilitzades de roscovitina estaven inhibint l'activació dels nous orígens de replicació. Ja havíem comprovat que la roscovitina inhibia l'activació de nous orígens ⁵⁰⁵, però en aquest cas vàrem utilitzar dosis més baixes de les que utilitzàvem prèviament al laboratori. La comprovació de la inhibició de nous orígens la vàrem fer per *DNA fibre assay*. Així podíem comprovar si afegint 5µM, 10µM o 15µM de roscovitina després d'un estrès replicatiu sever, s'inhibia o es reduïa l'activació de nous orígens.

L'experiment el vàrem realitzar amb 10mM d'hidroxiurea i utilitzant el mateix temps de tractament que amb l'assaig de clonogenicitat o de citometria (14h). En aquest cas durant l'última hora del tractament amb hidroxiurea s'afegeix l'inhibidor i després es manté durant el pols amb IdU. Prèviament al laboratori havíem comprovat com el reinici de la replicació en cèl·lules tumorals tarda 30 minuts en poder-se detectar per immunofluorescència (*DNA fibre assay*) i les forquetes de replicació avancen a menor velocitat ⁴⁹⁹. Per tant amb una hora donàvem temps suficient per a què la cèl·lula es recuperés i activés els nous orígens.

Després d'un estrès replicatiu sever es pot veure com la roscovitina reduïa els nivells d'activació de nous orígens de manera dosiddependent (**figura 11**). No observarem una inhibició completa però amb la major dosi de roscovitina (15µM) els nivells d'activació de nous orígens són baixos (≈7%) comparats amb els de la condició control sense inhibidors (≈35%). A més a més vàrem comprovar que l'addició de roscovitina no produïa cap efecte en la quantitat de forquetes que romanien parades (**figura 11**).

RESULTATS

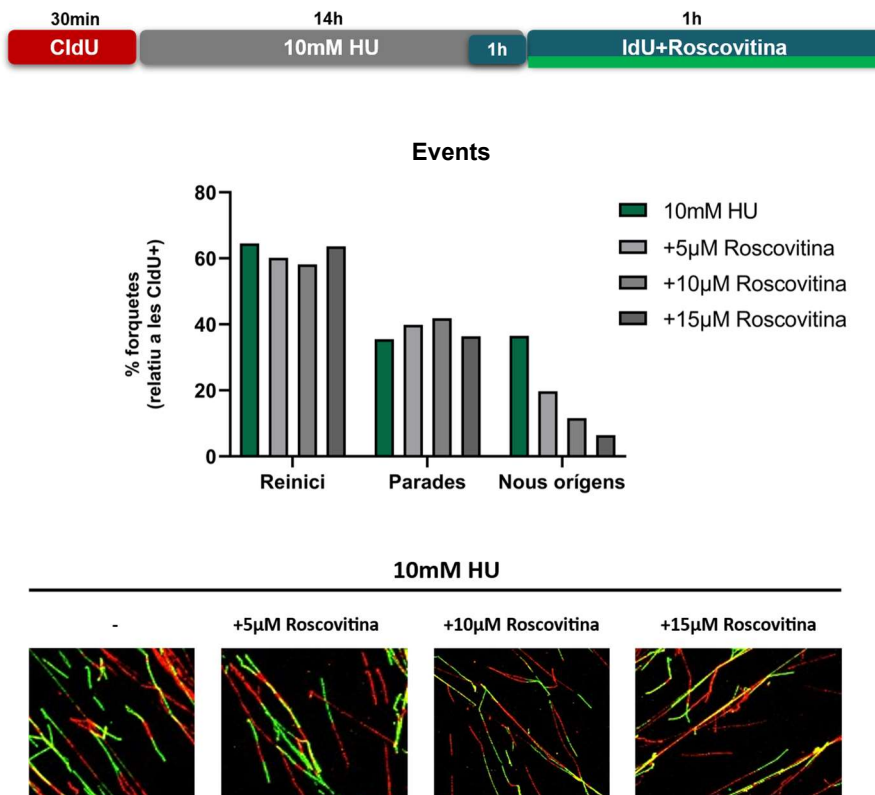


Figura 11. La roscovitina inhibeix l'activació de nous orígens de replicació després d'un estrès replicatiu induït per 10mM d'hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem fer un marcatge i tractament tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis Roscovitina: 5μM, 10μM i 15μM. Les imatges de baix són representatives de cada condició. Vàrem analitzar la dinàmica de replicació i quantificar el percentatge respecte el total de fibres marcades amb CldU de forquetes parades (fibres marcades només amb CldU) i d'activació de nous orígens (fibres marcades amb IdU). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició.

Després d'analitzar la combinació de 10mM d'hidroxiurea amb roscovitina, vàrem comprovar si amb 5mM d'hidroxiurea les cèl·lules seguien necessitant l'activació de nous orígens i si la roscovitina era capaç de reduir aquesta activació.

Amb el *DNA fiber assay* vàrem observar com la roscovitina també inhibia l'activació de nous orígens de manera dosiddependent, igual que amb 10mM d'hidroxiurea (**figura 12**). No obstant això, només amb un estrès replicatiu produït per 5mM d'hidroxiurea, tant el nivell de forquetes que romanen parades, com el d'activació de nous orígens es redueix considerablement comparant amb 10mM (**figura 12**).

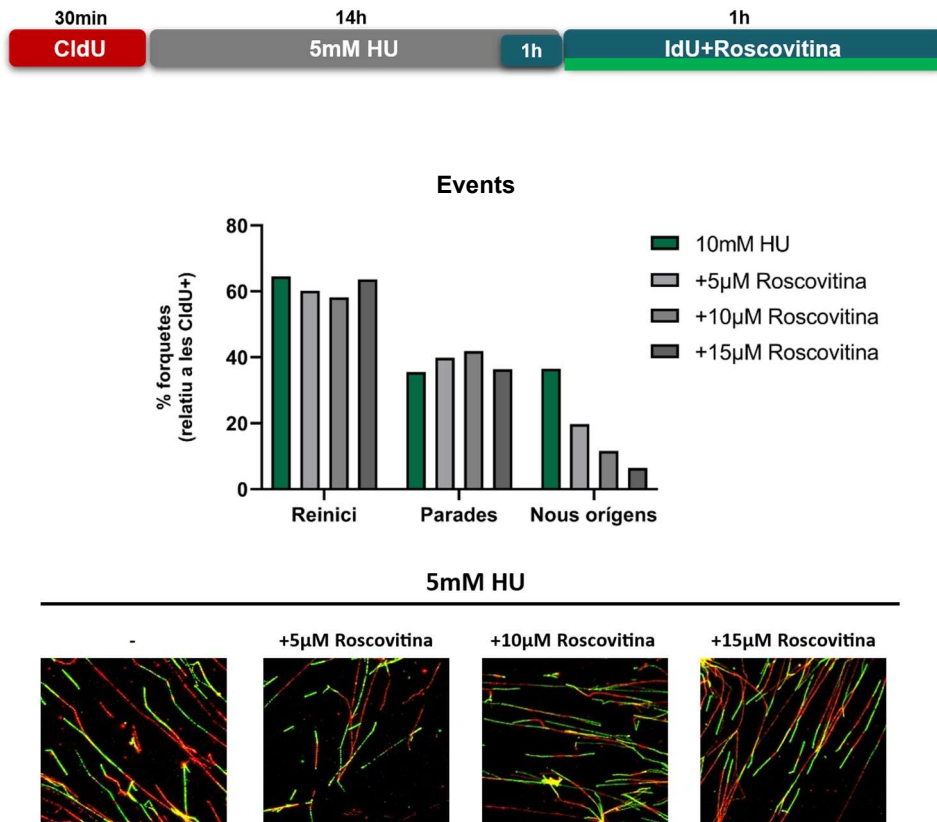


Figura 12. La roscovitina inhibeix l'activació de nous orígens de replicació després d'un estrès replicatiu induït per 5mM d'hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem fer un marcatge i tractament tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 5mM. Dosis Roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Les imatges de baix són representatives de cada condició. Vàrem analitzar la dinàmica de replicació i quantificar el percentatge respecte el total de fibres marcades amb CldU de forquetes parades (fibres marcades només amb CldU [gràfic del centre]) i d'activació de nous orígens (fibres marcades amb IdU [gràfic a la dreta]). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició.

3.3.6. LA ROSCOVITINA SENSIBILITZA A LES CÈL·LULES HCT116 A L'ESTRÈS REPLICATIU SEVER INDUÏT AMB HIDROXIUREA.

En reduir la dosi d'hidroxiurea de 10mM a 5mM es va reduir la quantitat de forquetes que quedaven parades i el nombre d'activació de nous orígens (**figures 11 i 12**).

Per altra banda, en experiments anteriors, el fet d'allargar el tractament de 2mM d'hidroxiurea a 24 hores, va fer que part les cèl·lules no tumorals no es recuperessin i quedessin parades en fase S (**figura 7**). És important remarcar que amb el tractament de 14 hores la recuperació no es veu afectada.

Per tant, el temps i la dosi d'hidroxiurea semblaven ser importants. Així doncs, vàrem fer una prova repetint l'experiment de citometria combinant hidroxiurea i roscovitina, però aquest cop fent un estrès replicatiu de 24 hores.

El fet d'allargar el temps d'estrès replicatiu va fer que en condicions tractades només amb hidroxiurea ja hi hagués una reducció de la quantitat de cèl·lules que acaben la replicació i arriben a G2-M (**figura 13**). Amb 1, 2 i 5mM la reducció no és gaire gran, però amb 10mM va arribar quasi al 50%.

El fet d'afegir roscovitina va incrementar l'efecte de la hidroxiurea i es va reduir el nombre de cèl·lules que arribaven a G2-M (**figura 13**).

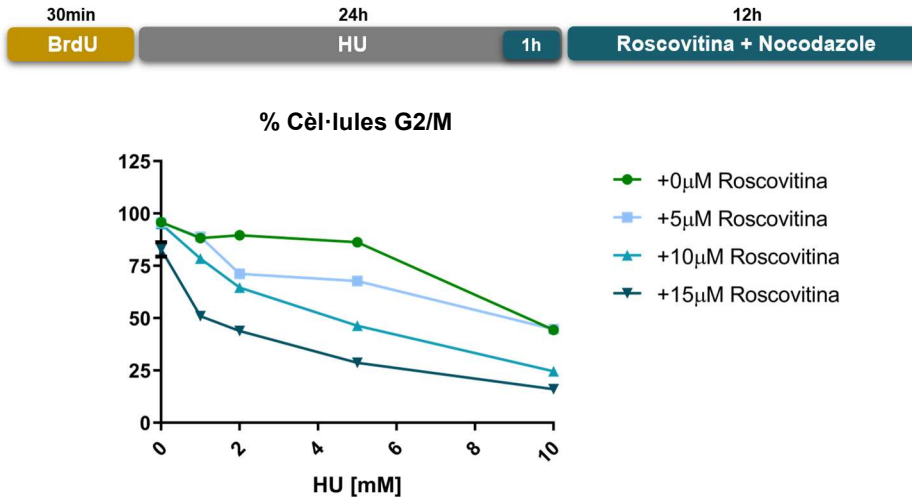


Figura 13. L'addició de roscovitina després d'un estrès replicatiu de 24 hores induït amb hidroxiurea redueix el nombre de cèl·lules que finalitzen la replicació en HCT116. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i després tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis Roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Només vàrem analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase G2/M. Es mostren els percentatges d'un experiment.

3.3.7. LA COMBINACIÓ SEQÜENCIAL D'HIDROXIUREA AMB ROSCOVITINA INCREMENTA LA MORTALITAT CEL·LULAR.

En els assajos de clonogenicitat i citometria vàrem descartar les cèl·lules en suspensió per només analitzar la població viable en aquell moment. Ara volíem determinar quina era la població de cèl·lules mortes. Per tant, vàrem utilitzar el mateix disseny de tractament que corresponia a cada un dels experiments, i vàrem recollir totes les cèl·lules (medi i placa) per realitzar una tinció amb Anexina V i iodur de propidi. Així podríem saber quin era el percentatge real de cèl·lules viables en el moment de replantar (clonogènics) o de passar les cèl·lules pel citòmetre.

Com que per fer citometria recollíem les cèl·lules just després de les 12 hores de recuperació, aquest va ser el primer tractament del qual en vàrem estudiar la viabilitat.

Un cop analitzats els resultats per citometria, vàrem veure que ni durant la recuperació després d'un estrès replicatiu sever (només hidroxiurea), ni amb un tractament només amb roscovitina, es va produir un increment en la mortalitat cel·lular (**figura 14**). No obstant això, si durant la recuperació afegíem 10µM o 15µM de roscovitina, la mortalitat cel·lular augmentava, disminuint la viabilitat cel·lular entre un 10-20%. Aquesta reducció de la viabilitat no va ser dependent de de la dosi d'hidroxiurea (**figura 14**).

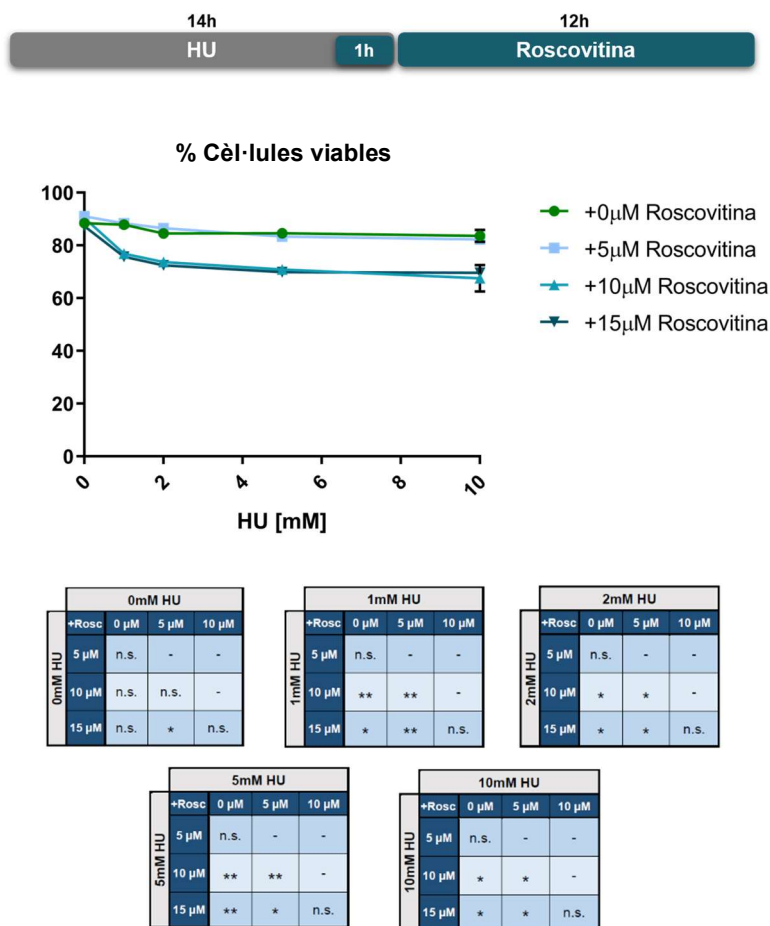


Figura 14. La roscovitina indueix mort cel·lular durant la recuperació d'un estrès replicatiu produït per hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com es detalla a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis Roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Vàrem analitzar la viabilitat cel·lular amb un marcatge d'Anexina V-PI. Es representa la mitjana de viabilitat de 4 experiments independents. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hidroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor

<0.01;***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de la taula).

Així doncs la combinació seqüencial d'hidroxiurea i roscovitina incrementa la mortalitat, tal com havíem vist a experiments previs.

Per fer els assajos de clonogenicitat, després del tractament amb hidroxiurea i posteriorment amb roscovitina, vàrem deixar les cèl·lules recuperar-se en medi sense cap tractament durant 8 hores. Com que ja vàrem determinar la viabilitat cel·lular després del tractament amb la combinació seqüencial d'hidroxiurea i roscovitina (**figura 14**), aquest cop vàrem recollir les mostres 8 hores després d'eliminar l'inhibidor. D'aquesta manera podríem saber com evolucionava la mortalitat al llarg d'aquestes 8 hores.

En cèl·lules tractades només amb hidroxiurea, la viabilitat cel·lular no va variar (**figura 15**). Amb els controls tractats només amb roscovitina, aquesta sí que va disminuir lleugerament amb 15 μ M. En canvi en afegir-la després de la hidroxiurea la mortalitat va incrementar considerablement (de l'ordre del 20%). Amb 10 μ M de roscovitina la mortalitat va augmentar només al combinar-la després de la hidroxiurea (excepte a 1 i 10mM), tot i que aquest increment fou baix. Contràriament, en les condicions amb 5 μ M de roscovitina ni en el control només amb l'inhibidor, ni les combinacions van tenir cap efecte sobre la mortalitat (**figura 15**).

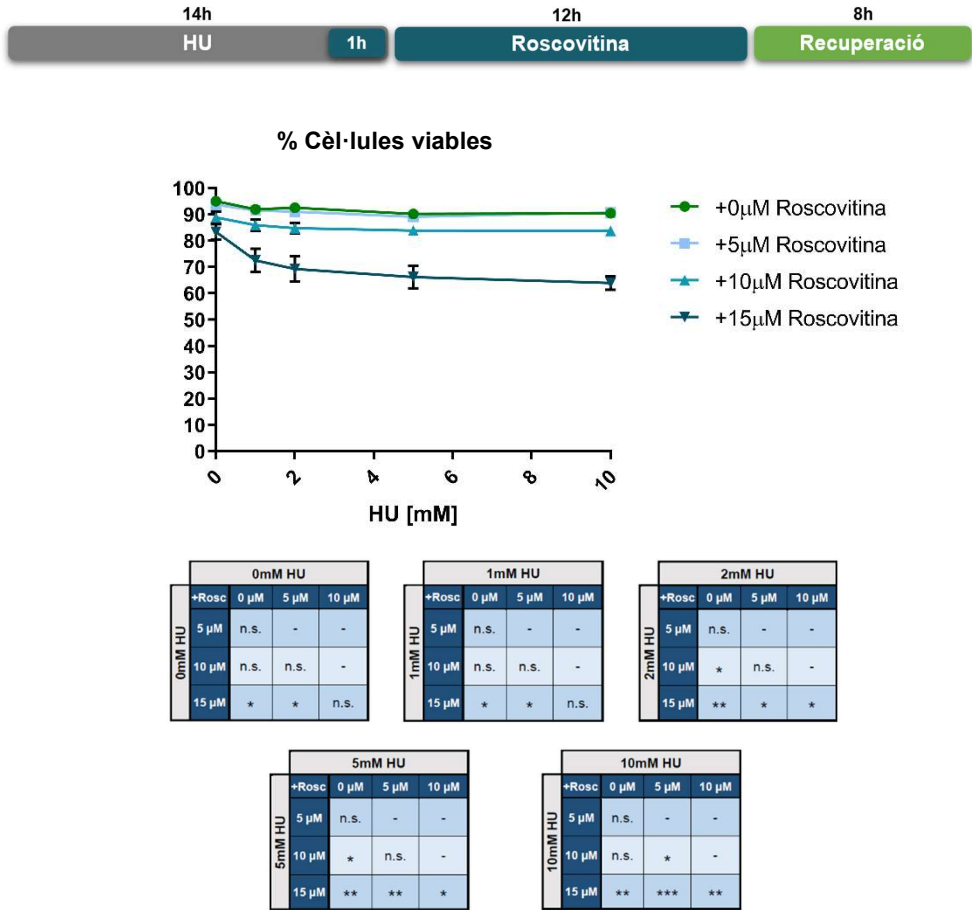


Figura 15. La mortalitat cel·lular incrementa després d'eliminar la roscovitina afegida a la recuperació d'un tractament amb hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis Roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM. Vàrem analitzar la viabilitat cel·lular amb un marcatge d'Anexina V-PI. Es representa la mitjana de viabilitat de 3 experiments independents. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hidroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (-: test fet a una altra casella de la taula).

De manera que la inhibició de nous orígens de replicació amb roscovitina després d'un estrès replicatiu provoca la mort d'una part de les cèl·lules. Aquesta mort continua succeint després d'eliminar l'inhibidor.

3.3.8. LA COMBINACIÓ SEQÜENCIAL D'HIDROXIUREA I ROSCOVITINA INCREMENTA ELS NIVELLS DE γ H2AX I MARCADORS DE SENESCÈNCIA EN HCT116

Al laboratori, prèviament s'havia descrit que en cèl·lules hTERT-RPE la senescència incrementa després d'un estrès replicatiu sever⁵⁰⁶. A més a més, durant la recuperació després d'aquest estrès, es produeix un augment en p21, conegut per ser un marcador de senescència⁵⁰⁶.

Vist això, vàrem analitzar en les cèl·lules HCT116 com l'estrès replicatiu sever i la posterior inhibició dels nous orígens de replicació afectava a proteïnes que controlen el cicle i protegeixen l'estabilitat del genoma. Vàrem analitzar per WB els nivells de p53, p21 i γ H2AX. Així podríem veure l'evolució d'aquestes proteïnes durant el tractament amb hidroxidurea, roscovitina i la seva recuperació.

Per produir l'estrès replicatiu vàrem provar les quatre dosis d'hidroxidurea utilitzades prèviament (1mM, 2mM, 5mM, i 10mM) i les vàrem combinar amb 10 μ M i 15 μ M de roscovitina durant l'última hora de l'estrès i durant la recuperació (12h). Després vàrem deixar les cèl·lules en medi sense cap tractament durant 24 hores més.

L'experiment el vàrem realitzar en cèl·lules sincronitzades en fase S amb timidina per veure així el possible efecte amb més claredat, atès que totes les cèl·lules hauran estat les 14 hores amb l'estrès replicatiu.

Vàrem agafar mostres a diferents temps per poder fer el seguiment dels nivells d'aquestes proteïnes. Així doncs, vàrem recollir mostres després de la sincronització (C), després del tractament amb hidroxidurea, a les 12 hores de recuperació (amb o sense inhibidor), i durant la recuperació sense inhibidor a les 12 i 24 hores.

Com a controls vàrem fer un amb roscovitina, on vàrem fer un tractament de 13 hores (10 μ M o 15 μ M) per veure els possibles canvis només amb l'inhibidor. Aquest control es va carregar amb els gels d'1 i 10mM d'hidroxidurea per així poder comparar, en posar-la amb la dosi més baixa i amb la més elevada. A més a més, vàrem afegir un tractament només amb adriamicina, que sabem que produeix un

augment en les tres proteïnes que analitzarem. Igual que els controls amb roscovitina, el vàrem afegir als gels d'1mM i 10mM d'hidroxiurea per poder veure i comparar l'efecte produït per la hidroxiurea i la roscovitina.

Com que amb la sincronització els nivells de γ H2AX augmenten lleugerament, vàrem afegir també una condició amb cèl·lules asincròniques (C Asinc.) per poder comparar el control amb els nivells basals sense sincronització. Aquest control l'hem carregat al gel de 5mM d'hidroxiurea.

Pel que fa a γ H2AX -excepte amb 1mM d'hidroxiurea- els nivells d'aquesta proteïna varen augmentar després de l'estrès replicatiu en major o menor mesura depenent de la dosi. Durant la recuperació els nivells es van reduir (**figura 16**). La roscovitina per si sola ja va incrementar els nivells de γ H2AX, no obstant el fet d'afegir-la després de l'estrès replicatiu va fer que augmentessin en major mesura (**figura 16**). Tot i que quan es va eliminar la roscovitina, els nivells també es van reduir i 24 hores després no hi havia diferència entre la combinació i el tractament només amb hidroxiurea. No obstant això, es va produir un augment dels nivells de γ H2AX força més elevat que només amb l'estrès replicatiu i es va retardar la recuperació.

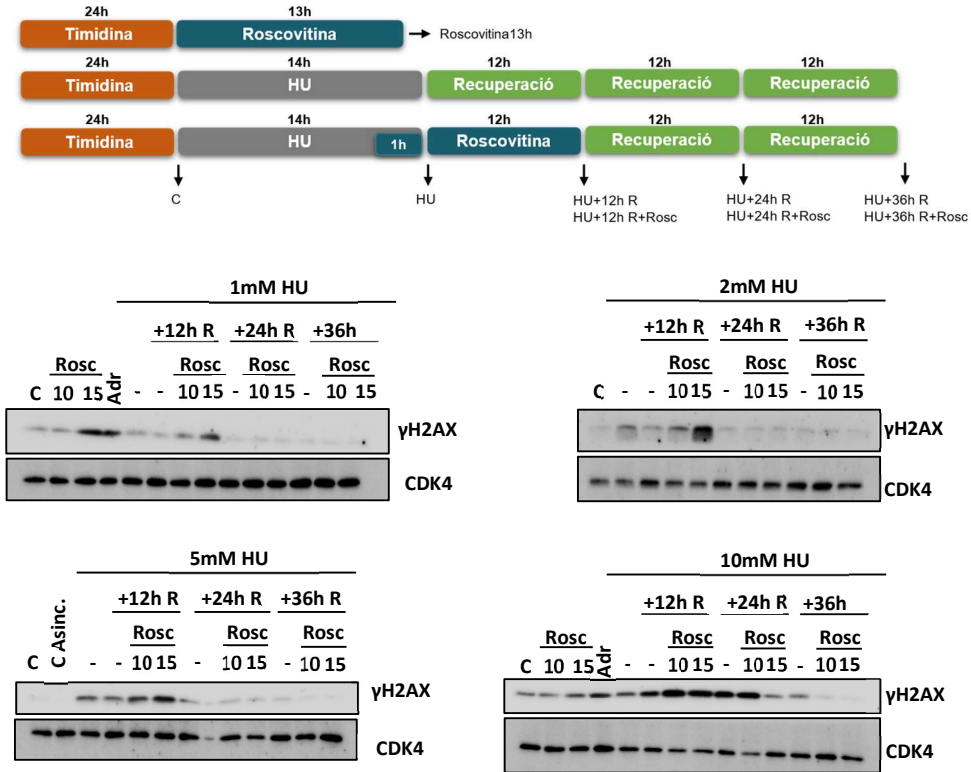


Figura 16. La roscovitina incrementa els nivells de γ H2AX després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Varem tractar les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. R: Recuperació. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis Roscovitina (Rosc): 10 μ M i 15 μ M. Es va utilitzar un control de sincronització (C) i un control asincrònic (C Asinc.). Com a control positiu varem utilitzar un tractament amb Adriamicina (Adr). Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 2 experiments independents (2n).

En el cas de p53 no va haver-hi variacions rellevants com amb γ H2AX, ni es va observar cap tendència clara. Tot i que amb 1mM d'hidroxiurea no va haver-hi canvis, amb 2mM, 5mM i 10mM sí que es va produir un petit increment en els nivells basals p53 que amb el pas del temps van disminuir. El fet d'afegir roscovitina no va induir canvis clars en els nivells de p53 (**figura 17**).

RESULTATS

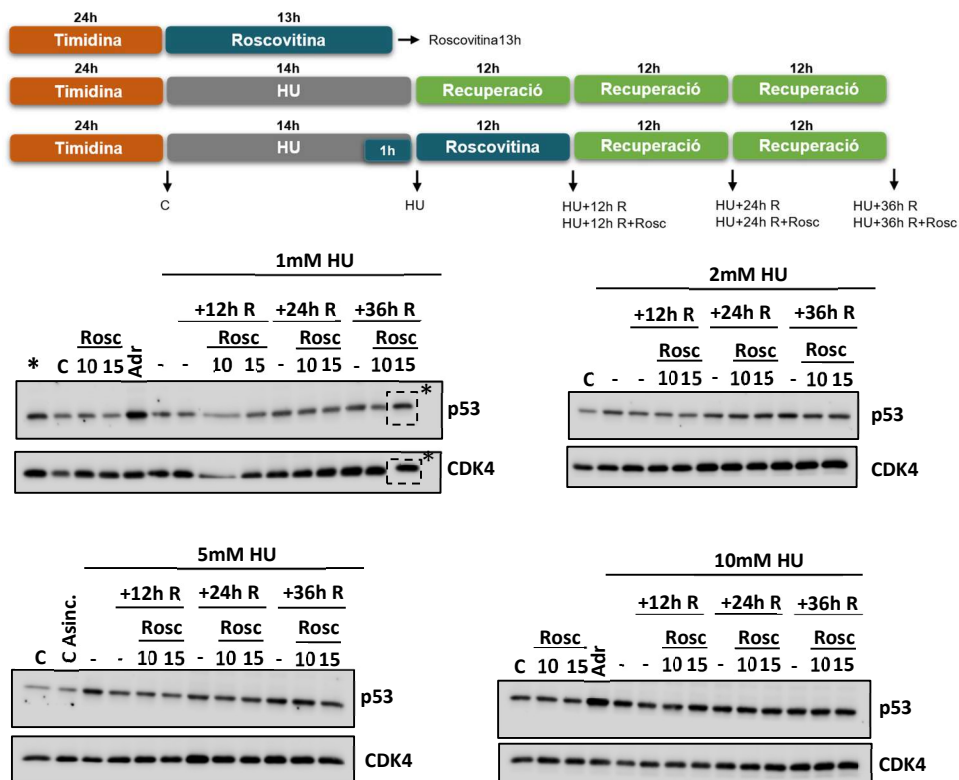


Figura 17. La roscovitina no modifica els nivells de p53 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Vàrem tractar les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema l'esquema. R: Recuperació. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis Roscovitina (Rosc): 10µM i 15µM. Es va utilitzar un control de sincronització (C) i un control asincrònic (C Asinc.). Com a control positiu vàrem utilitzar un tractament amb Adriamicina (Adr). Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 2 experiments independents .

p21 va augmentar en tots els tractaments amb hidroxiurea (**figura 18**). Però, a diferència de p53 i γH2AX, no ho va fer durant el tractament, sinó que els nivells de p21 van augmentar després d'eliminar la hidroxiurea i es van mantenir elevats durant tot el temps que es va deixar de recuperació. La roscovitina per si sola va incrementar els nivells de p21, però al combinar-la amb hidroxiurea, aquests no van incrementar més (**figura 18**).

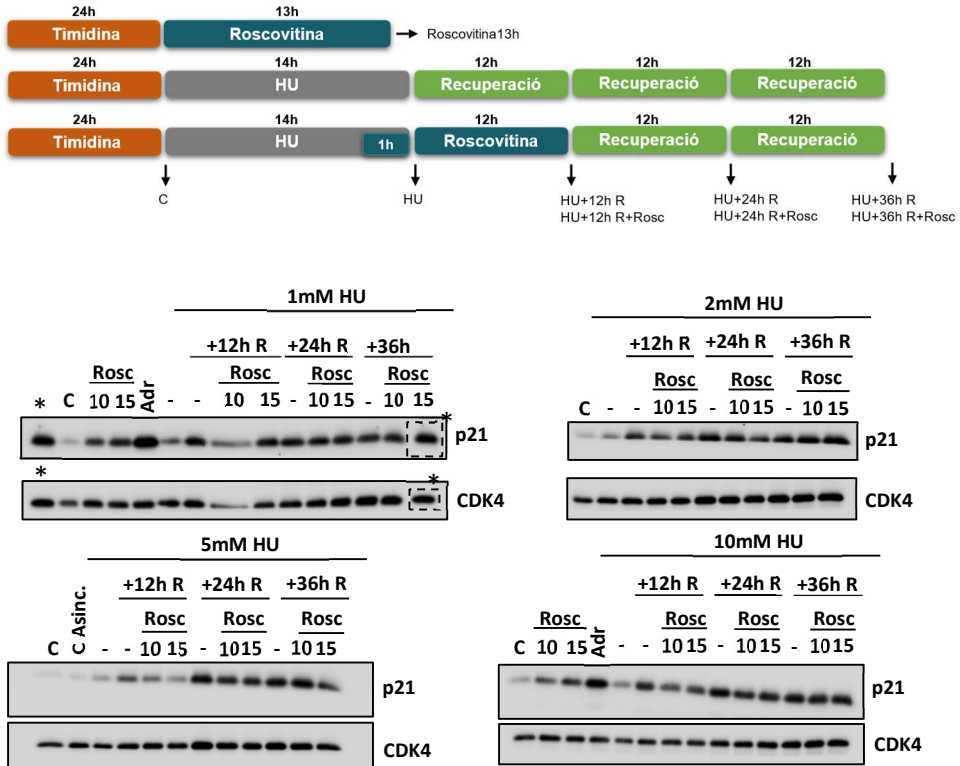


Figura 18. La roscovitina no modifica els nivells de p21 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Varem tractar les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis Roscovitina (Rosc): 10μM i 15μM. Es va utilitzar un control de sincronització (C) i un control asincrònic (C Asinc.). Com a control positiu vàrem utilitzar un tractament amb Adriamicina (Adr). Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega. Es mostra un WB representatiu de 2 experiments independents.

En resum podem veure com el tractament amb hidroxiurea va incrementar els nivells de la proteïna relacionada amb el dany γH2AX. El fet d'afegir roscovitina va fer que augmentessin els nivells d'aquesta i es retardés la recuperació de les cèl·lules. En canvi en p21 l'augment es va produir durant la recuperació a l'estrès s'afegís o no l'inhibidor.

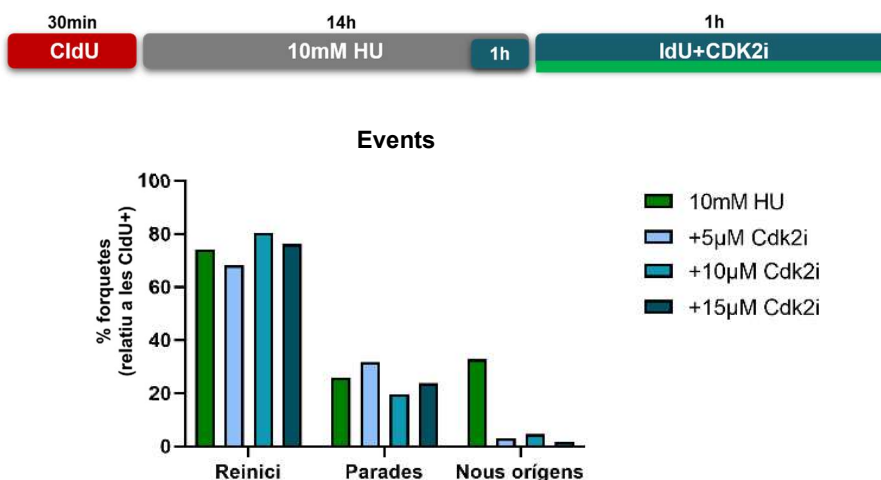
CDK2 INHIBITOR II

La roscovitina a més d'inhibir la CDK2 també inhibeix la CDK1, per tant volíem utilitzar un inhibidor específic de la CDK2. Entre totes les opcions disponibles al vàrem escollir el CDK2 *inhibitor* II (CDK2i).

3.3.9. CDK2i INHIBEIX L'ACTIVACIÓ DE NOUS ORÍGENS DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER.

El primer que vàrem fer fou comprovar si amb CDK2i aconseguíem inhibir els nous orígens. Ho vàrem fer per DNA fibre assay. El disseny experimental va ser el mateix que férem amb la roscovitina. En aquest cas també vàrem utilitzar les dues dosis més elevades d'hidroxiurea: 5mM i 10mM. Pel que fa a l'inhibidor vàrem provar les mateixes dosis que la roscovitina: 5µM, 10µM i 15µM.

Tant amb 5mM d'hidroxiurea (**figura 19**), com amb 10mM d'hidroxiurea (**figura 20**), CDK2i va inhibir de manera eficient l'activació de nous orígens. Cal destacar que amb 5µM de CDK2i ja es produeix una inhibició de l'activació de nous orígens considerable, obtenint el major efecte amb 15µM de CDK2i (**figures 19 i 20**).



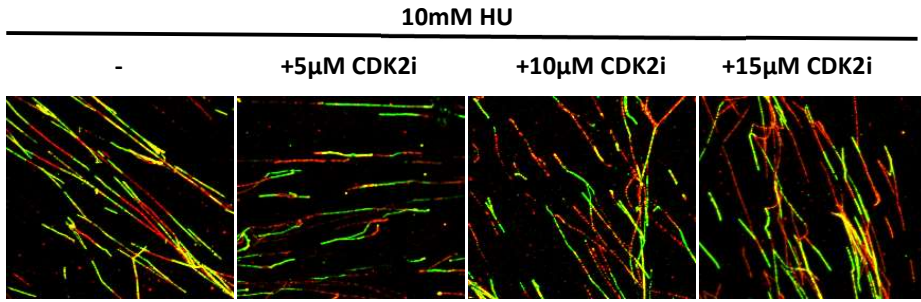


Figura 19 La inhibició de CDK2 redueix l'activació de nous orígens de replicació després d'un estrès replicatiu induït per 10mM d'hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem fer un marcatge i tractament tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 5µM, 10µM i 15µM. Vàrem analitzar la dinàmica de replicació i quantificar el percentatge respecte el total de fibres marcades amb CldU de forquetes reiniciades (fibres marcades amb CldU i IdU), de parades (fibres marcades només amb CldU) i d'activació de nous orígens (fibres marcades amb IdU). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició. A sota es mostren imatges representatives de l'experiment.

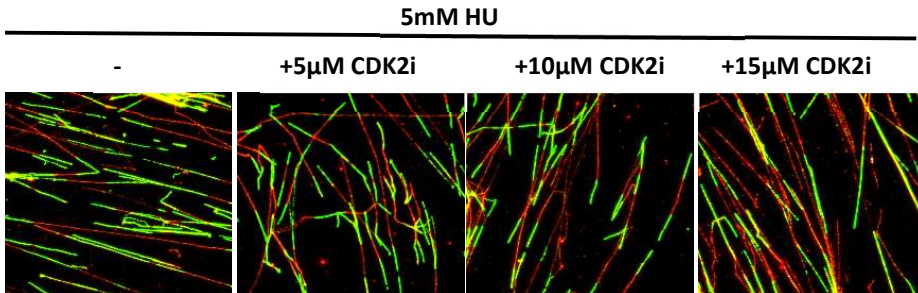
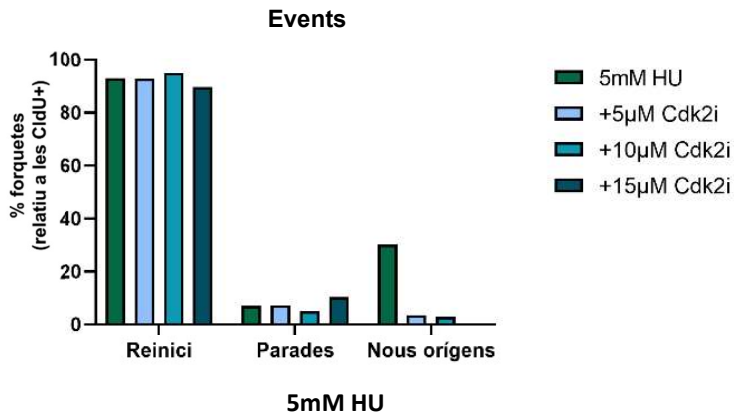


Figura 20. La inhibició de CDK2 redueix l'activació de nous orígens de replicació després d'un estrès replicatiu induït per 5mM d'hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem fer un marcatge i tractament tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 5mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 5µM, 10µM i 15µM. Vàrem analitzar la dinàmica de replicació i quantificar el percentatge respecte el total de fibres marcades amb CldU de forquetes reiniciades (fibres marcades amb CldU i IdU), de parades (fibres marcades només amb CldU) i d'activació de nous orígens (fibres marcades amb IdU). Com a mínim es van quantificar 500 fibres per condició. A sota es mostren imatges representatives de l'experiment.

3.3.10. CDK2i SENSIBILITZA A LES CÈL·LULES HCT116 A L'ESTRÈS REPLICATIU INDUÏT AMB HIDROXIUREA.

En primer lloc vàrem repetir l'assaig de clonogenicitat que havíem fet amb la roscovitina, però en aquest cas utilitzant CDK2i per tal d'inhibir els nous orígens. També vàrem afegir l'inhibidor durant l'última hora del tractament amb hidroxiurea i la recuperació. Com a control del tractament individual amb CDK2i, vàrem fer un tractament de 13 hores i una recuperació de 8 hores.

En aquest cas, cap dels tractaments amb CDK2i van afectar la viabilitat cel·lular (**figura 21**). Al combinar CDK2i després de la hidroxiurea, es va produir un descens en la viabilitat, sobretot amb 10 i 15µM (**figura 21**). Tenint en compte que CDK2i per si sol no afecta la viabilitat, podem afirmar que la combinació presentava efectes sinèrgics en algunes de les dosis utilitzades, com és el cas de les combinacions amb 5mM d'hidroxiurea.

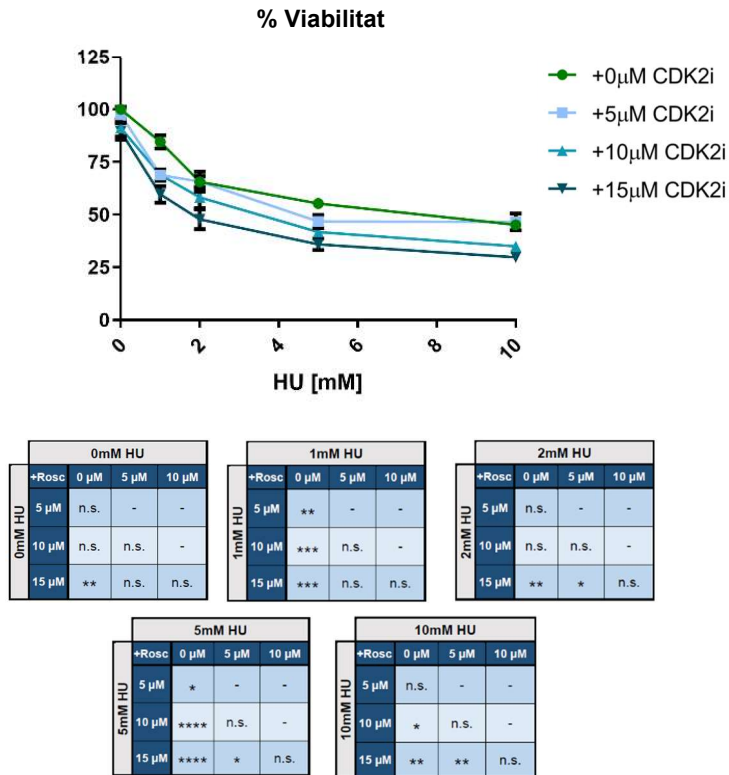


Figura 21. La inhibició de CDK2 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea redueix la capacitat per formar colònies en cèl·lules HCT116. Vàrem fer els tractaments tal qual s'indica a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis CDK2 *inhibitor* II (CDK2i): 5µM, 10µM i 15µM. Després de les 8 hores amb medi sense cap inhibidor, vàrem replantar les cèl·lules per diluir-les (200 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous [per triplicat]). 7 dies després vàrem fixar, tenyir i contar les colònies. Vàrem calcular la mitjana de cada triplicat i normalitzar pel control. El gràfic mostra la mitjana i desviació estàndard de tres experiments independents. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hidroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de la taula).

Després de confirmar un efecte sobre la viabilitat volíem veure si el fet d'inhibir la CDK2, i en conseqüència l'activació de nous orígens, reduïa la capacitat de les cèl·lules per recuperar-se de l'estrès replicatiu. Així doncs, vàrem analitzar per citometria de flux si amb presència de

RESULTATS

l'inhibidor, les cèl·lules eren capaces de finalitzar la replicació i arribar a G2/M.

El disseny experimental és el mateix que amb la roscovitina. Al principi un marcatge amb BrdU per analitzar només la població en fase S en el moment d'induir l'estrès replicatiu, i també vàrem afegir nocodazole durant les 12 hores de recuperació perquè no es divideixin i alterin els percentatges.

En afegir CDK2i després del tractament amb hidroxiiurea es va reduir el nombre de cèl·lules que arribaven a G2/M, però només a dosis elevades d'hidroxiiurea (5mM i 10mM) (**figura 22**). Al no tenir CDK2i cap efecte sobre el nombre de cèl·lules que en 12 hores arriben a G2/M, la combinació de qualsevol de les 3 dosis d'inhibidor utilitzades amb 5 o 10mM d'hidroxiiurea produïa un efecte sinèrgic.

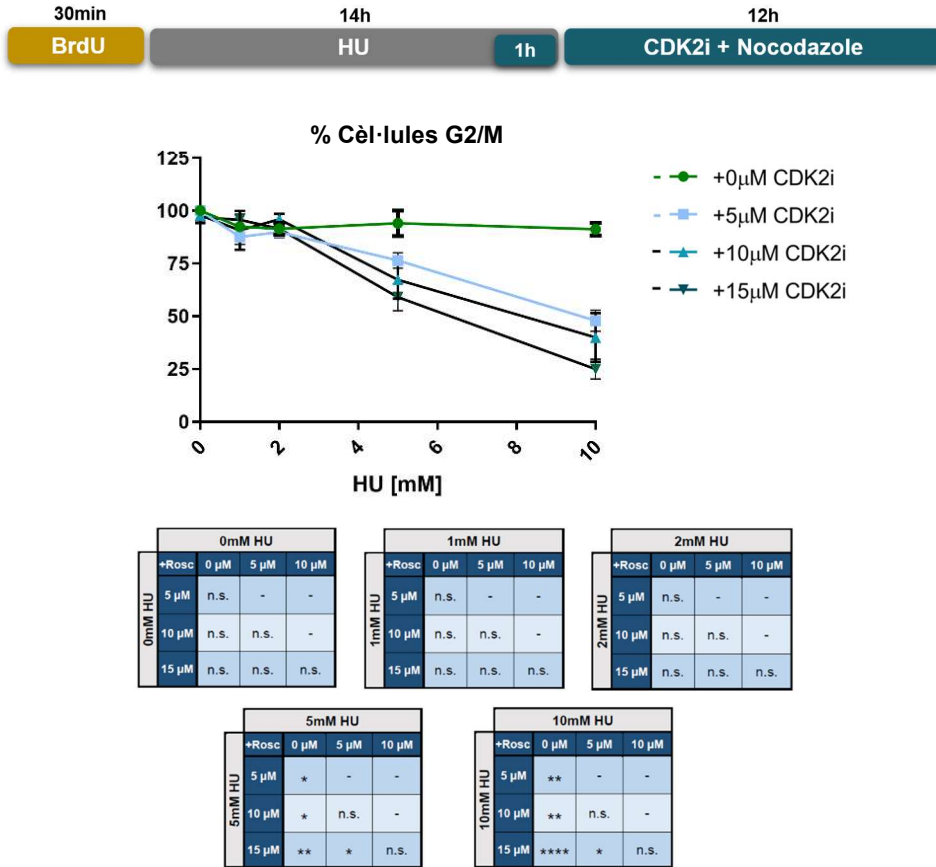


Figura 22. La inhibició de CDK2 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea redueix el nombre de cèl·lules que finalitzen la replicació. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i després tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 5 μ M, 10 μ M i 15 μ M. Només vàrem analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase G2/M. Es mostra la mitjana i desviació estàndard de 3 experiments independents (3n). A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hydroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de la taula).

Per tant l'addició de CDK2i després d'un estrès replicatiu sever amb 5 i 10mM d'hydroxiurea, va provocar que una part considerable de les cèl·lules no poguessin finalitzar la replicació i no arribessin a G2/M durant les 12 hores de recuperació posteriors a l'estrès.

En veure com el tractament amb CDK2i després d'un estrès replicatiu va impedir la recuperació d'una part de les cèl·lules, ens vàrem qüestionar l'efecte que tindria a temps curts durant la recuperació.

Teníem interès en veure com es recuperaven les cèl·lules al llarg de les 12 hores posteriors a l'estrès i quin efecte tenia afegir l'inhibidor de l'activació de nous orígens.

Per aquest anàlisis vàrem recollir les mostres a diferents temps durant la recuperació després de l'estrès replicatiu generat amb 10mM d'hidroxiurea. Aquest cop no vàrem utilitzar nocodazole, ja que estàvem més interessats en temps curts. A més a més, vàrem optimitzar la tècnica per tal d'aconseguir una millor separació entre la població BrdU positiva i la negativa. Això també ens permetria veure el moment en que les cèl·lules arriben a la següent G1. Cal tenir en compte que a la propera G1 hi haurà dues cèl·lules per cada cèl·lula que ha acabat l'anterior cicle cel·lular. No obstant això, tot i que els percentatges no serien del tot fiables, sí que es podrien analitzar tendències.

Amb el resultat d'aquesta prova vàrem poder analitzar diverses tendències. Després d'un estrès replicatiu sever induït amb 10mM d'hidroxiurea, les cèl·lules van finalitzar la replicació entre les 4 i les 6 hores posteriors (**figura 23**). A més a més si ens fixem en les cèl·lules que varen arribar a G1 l'augment més pronunciat es va produir entre les 10 i les 12 hores (s'ha de tenir en compte la distorsió dels percentatges que causa la duplicació cel·lular).

L'addició de CDK2i després de l'estrès va ocasionar un retard en la quantitat de cèl·lules que finalitzaren la replicació (**figura 23**). Amb cap de les tres dosis hi havia aquesta progressió a la G2/M tan clara com amb el tractament només amb hidroxiurea, que entre les 4 i 6 hores posteriors finalitzaren la replicació. La progressió en el cicle va ser més lenta. A les 6 hores algunes cèl·lules tractades amb 5µM de CDK2i acabaren la replicació, en canvi amb 10 i 15µM aquest fenomen era menys pronunciat i es donava a partir de les 10 hores. Entre les 10 i 12 hores de tractament amb 5µM de CDK2i, algunes cèl·lules començaven

el cicle següent, fet que no va ocórrer amb les altres dues dosis de CDK2i (**figura 23**).

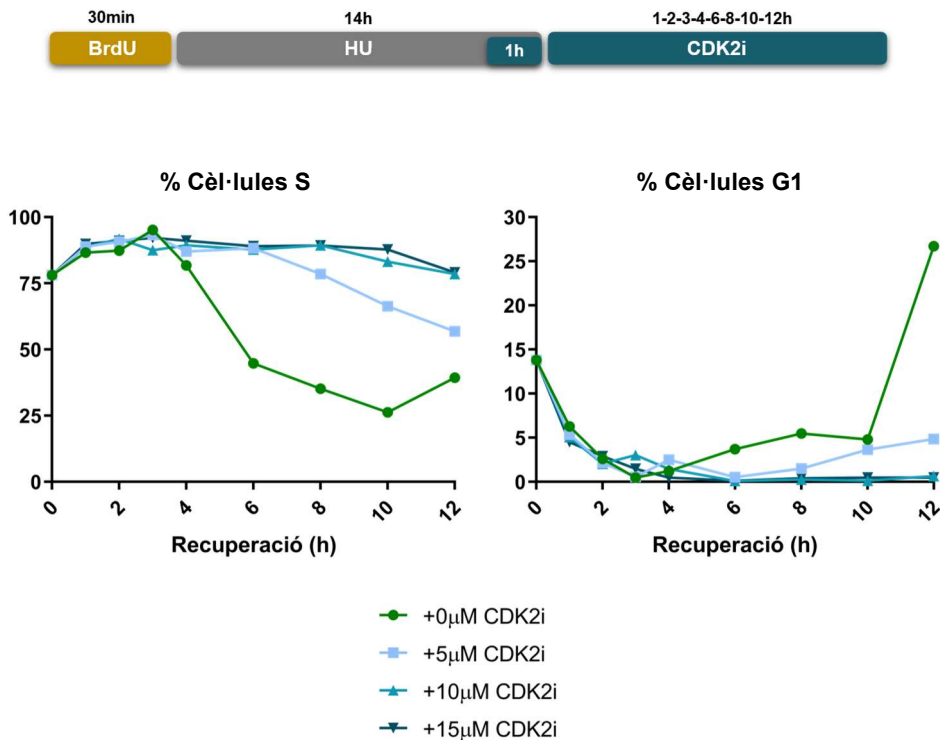


Figura 23. La inhibició de CDK2 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea redueix el reinici de la replicació. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i després de tractar les diferents condicions les vàrem recollir als temps específics, tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis CDK2 *inhibitor* II (CDK2i): 5μM, 10μM i 15μM. Només vàrem analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem mesurar el contingut de DNA per citometria i calcular el percentatge de cèl·lules en fase S (gràfic de l'esquerra) i en la G1 (gràfic de la dreta).

En veure com es produïa el retard en la progressió del cicle gràcies a l'addició de CDK2i, vàrem estudiar el que succeïa a temps més llargs. Es a dir si amb l'experiment anterior vàrem fer una prova per tal d'estudiar les primeres 12 hores, ara en fariem una altra de 12 a 24 hores.

Fins ara en els experiments on havíem allargat el temps de recuperació havíem eliminat l'inhibidor a les 12 hores. És el que vàrem fer amb els experiments de clonogenicitat, o amb els de WB, on a les 12 hores després del tractament amb roscovitina, la vàrem eliminar i veure la

recuperació (**figures 16-18**). En el cas dels experiments amb WB vàrem veure com en eliminar l'inhibidor les cèl·lules es recuperaven. Per tant, vàrem decidir substituir la dosi de 5µM de CDK2i per una altra on podríem veure l'efecte en la progressió en el cicle després d'eliminar la CDK2i. Durant les 12 hores posteriors després de l'estrès replicatiu sever, vàrem tractar les cèl·lules amb 10µM de CDK2i, després vàrem eliminar l'inhibidor i es varen deixar les cèl·lules en medi perquè poguessin progressar sense cap tipus d'impediment. D'aquesta manera podríem comparar aquesta condició amb la de 10µM de CDK2i durant tot el temps de recuperació a l'estrès replicatiu, i veure com afecta l'eliminació de l'inhibidor a la progressió en el cicle. En aquest es recolliran les mostres cada 2 hores entre les 10 i les 24 hores.

El punt inicial varen ser les 10 hores, ja que abans havíem vist que entre 10 i 12 hores era quan les cèl·lules tractada només amb hidroxiiurea finalitzaven la mitosi. Així podríem confirmar aquesta tendència.

Amb el tractament només amb hidroxiiurea es pot veure com entre les 10 i les 12 hores es va produir un augment gran de cèl·lules que van finalitzar el cicle i passar a la següent G1 (**figura 24**).

En afegir CDK2i, les cèl·lules no varen finalitzar el cicle cel·lular. Només en el cas on vàrem eliminar l'inhibidor, algunes cèl·lules eren capaces de passar al següent cicle cel·lular a partir de les 18 hores (12 amb inhibidor i 6 sense ell). Les altres dues condicions sembla que eren capaces de finalitzar la fase S entre les 14 i les 22 hores, però en cap cas acabaven el cicle (**figura 24**).

Tot i estar present l'inhibidor, sembla que les cèl·lules finalitzen la replicació i arriben a G2/M tot i que amb un retard considerable respecte al tractament només amb hidroxiiurea (4-6 hores [**figura 23**]). A més a més, es pot veure com en els casos on utilitzem inhibidor, la població en S no arriba a disminuir a nivells del control només amb hidroxiiurea, indicant que hi ha una part d'elles cèl·lules que es queda en fase S. El fet d'eliminar l'inhibidor a les 12 hores no sembla que canviï el nombre de cèl·lules que romanen a la fase S (**figura 24**).

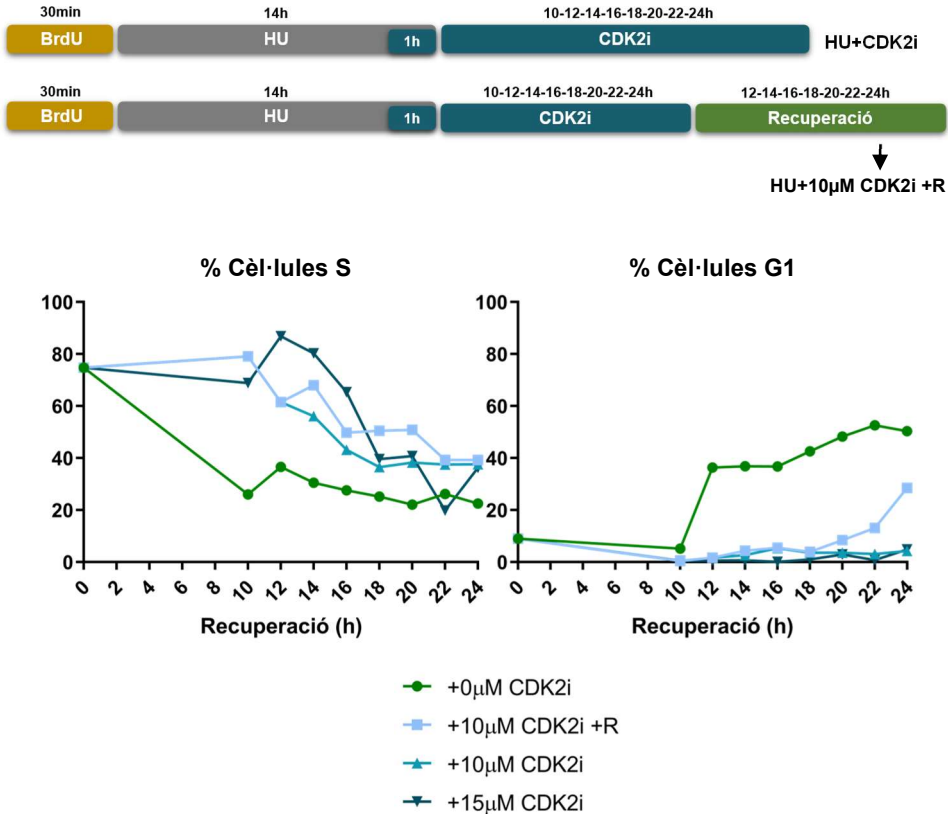


Figura 24. La inhibició de CDK2 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea redueix la progressió en la fase S. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i després de tractar les diferents condicions les vàrem recollir als temps específics, tal com es detalla a l'esquema. L'esquema inferior correspon a la condició 10µM CDK2i +R. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis CDK2 *inhibitor* II (CDK2i): 10µM i 15µM. Hi ha dues condicions amb 10µM de CDK2i: una on es manté durant tota la recuperació i una altra on s'elimina a les 12 hores i es deixen les cèl·lules recuperar-se en medi (10 µM CDK2i 12h+ R). Només vàrem analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase S (gràfic de l'esquerra) i en la G1 (gràfic de la dreta).

Així doncs, en afegir CDK2i després de l'estrès replicatiu sever es va retardar considerablement la recuperació tot i que finalment acaben replicant molt lentament. En eliminar l'inhibidor a les 12 hores després de l'estrès, les cèl·lules vàren progressar més ràpidament en el cicle. Així que en eliminar l'inhibidor les cèl·lules acceleren la seva recuperació, possiblement perquè poden activar de nou els nous orígens.

3.3.11. LA COMBINACIÓ SEQÜENCIAL D'HIDROXIUREA AMB CDK2i INCREMENTA LA MORTALITAT CEL·LULAR EN HCT116.

Pel que vàrem observar al recollir les mostres en experiments de citometria i clonogènics, l'addició de CDK2i després de l'estrès replicatiu sever també va augmentar la mortalitat cel·lular. De manera que com als experiments anteriors vàrem deprecia aquesta població, ara la volíem quantificar per citometria amb un marcatge anexina V i iodur de propidi.

Primer vàrem analitzar la mortalitat després de la recuperació -amb o sense CDK2i- Després d'un estrès replicatiu sever.

Tal com va succeir en els experiments anteriors (**figures 13 i 14**), el tractament només amb hidroxiurea no va produir un increment de la mortalitat (**figura 25**). Tampoc va augmentar la mortalitat amb un tractament només amb CDK2i.

En afegir 5µM de CDK2i durant la recuperació a l'estrès replicatiu no va haver-hi diferències respecte la recuperació sense l'inhibidor. No obstant això, en afegir 10µM o 15µM de CDK2i durant la recuperació, la mortalitat va augmentar. Aquest increment de la mortalitat va ser dependent de la dosi de CDK2i, però no es va veure afectat per la dosi d'hidroxiurea (**figura 25**).

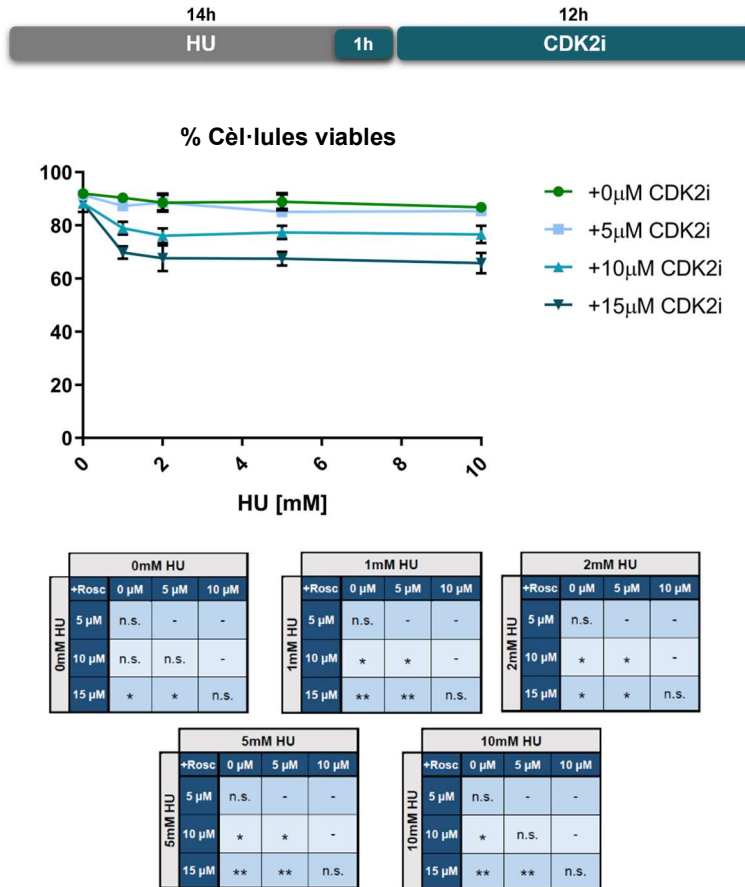


Figura 25. La inhibició de CDK2 induïx mort cel·lular durant la recuperació d'un estrès replicatiu produït per hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com es detalla a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 5μM, 10μM i 15μM. Vàrem analitzar la viabilitat cel·lular amb un marcatge amb Anexina V-PI. Es representa la mitjana de viabilitat de 3 experiments independents. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres de cada condició d'hidroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de la taula).

Després de veure la mortalitat amb la presència de l'inhibidor durant la recuperació, vàrem analitzar com evoluciona aquesta després de deixar les cèl·lules recuperar-se durant 8 hores en medi. Així podríem determinar el percentatge de cèl·lules que han mort abans de replantar per fer l'assaig de clonogenicitat.

En les tres condicions amb CDK2i es va produir un increment en la mortalitat, que augmenta amb la dosi de CDK2i (**figura 26**). Tot i que amb 5µM de CDK2i la viabilitat és molt semblant a les condicions control sense l'inhibidor (**figura 26**).

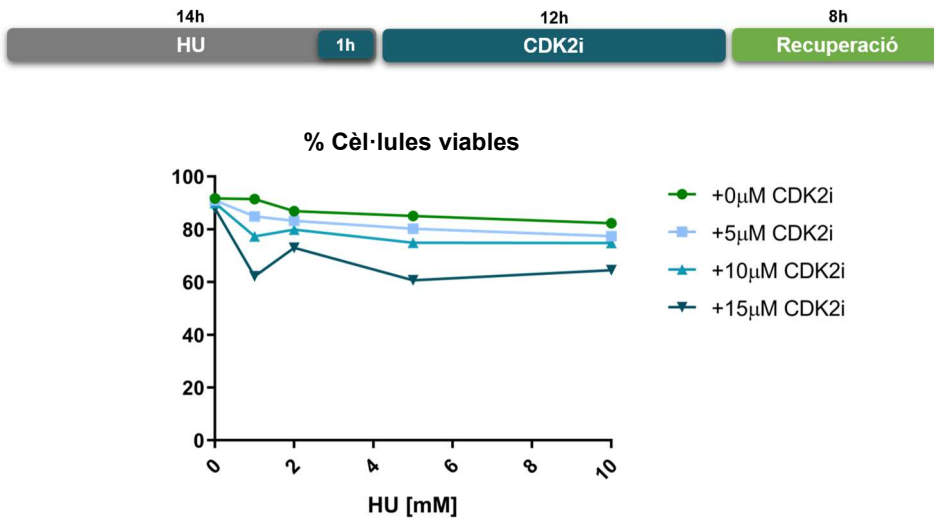


Figura 26. La mortalitat cel·lular incrementa després d'eliminar el CDK2 *inhibitor II* a la recuperació d'un tractament amb hidroxiurea en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com es detalla a l'esquema de baix. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Dosis CDK2 *inhibitor II* (CDK2i): 5µM, 10µM i 15µM. Vàrem analitzar la viabilitat cel·lular amb un marcatge d'Anexina V-PI. Al gràfic es representa el percentatge de cèl·lules viables d'un experiment.

3.3.12. LA COMBINACIÓ SEQÜENCIAL DE HU I CDK2i INCREMENTA ELS NIVELLS DE γH2AX I MARCADORS DE SENESCÈNCIA EN HCT116

Igual que vàrem fer amb la roscovitina, vàrem analitzar marcadors de dany i senescència per estudiar millor l'efecte de la combinació d'hydroxiurea amb CDK2i. El disseny experimental va ser el mateix: primer la sincronització amb timidina, un cop sincronitzades es va generar l'estrès replicatiu amb hidroxiurea, després es van inhibir els nous orígens durant les 12 hores de recuperació. Passades aquestes 12 hores es va eliminar l'inhibidor i es varen deixar les cèl·lules en medi per veure la recuperació a aquest tractament. Les mostres es van

obtenir a diferents punts per fer un seguiment dels nivells de γ H2AX, p53 i p21.

També vàrem afegir els mateixos controls que els fets amb la roscovitina: controls individuals amb CDK2i, adriamicina i control asincrònic.

Els resultats obtinguts van ser molt semblants als de la combinació d'hidroxiurea i roscovitina (**figures 16-18**).

Els nivells de γ H2AX van augmentar de manera dosiddependent durant les 14 hores de tractament amb 2mM, 5mM i 10mM d'hidroxiurea (**figura 27**). Durant la recuperació els nivells es van reduir considerablement conforme avançava el temps. En afegir 15 μ M de CDK2i a la recuperació, els nivells de γ H2AX van ser més elevats que sense l'inhibidor. Un cop eliminat l'inhibidor els nivells de γ H2AX es van reduir. Amb 10 μ M de CDK2i l'augment de γ H2AX va ser baix. També cal destacar que per si sol 10 μ M de CDK2i no va provocar cap canvi en els nivells de γ H2AX, mentre que amb 15 μ M es va produir un lleuger increment (**figura 27**).

RESULTATS

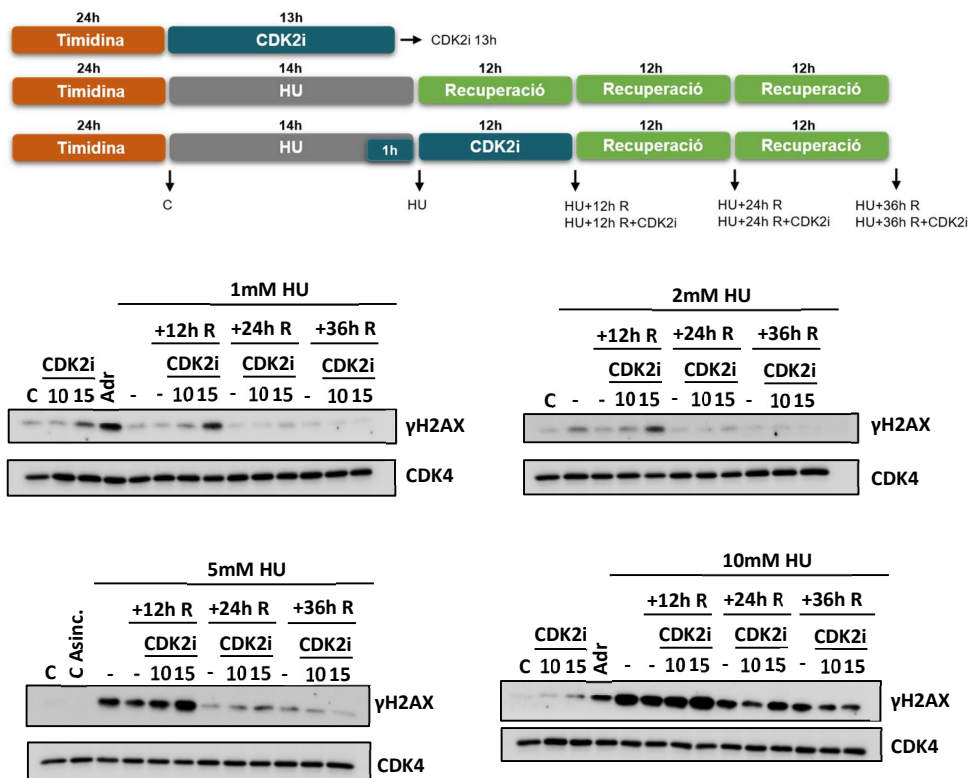


Figura 27. La inhibició de CDK2 incrementa els nivells de γ H2AX després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxidreia en cèl·lules HCT116. Es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Vàrem tractar les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxidreia (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 10 μ M i 15 μ M. Es va utilitzar un control de sincronització (C) i un control asincrònic (C Asinc.). Com a control positiu vàrem utilitzar un tractament amb Adriamicina (Adr). Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega.

Els nivells de p53 no van canviar de manera rellevant com els de γ H2AX. Els nivells basals van augmentar lleugerament després de l'estrès replicatiu (**figura 27** i **28**). Tampoc semblava que fos gaire dependent de la dosi d'hidroxidreia utilitzada. Després d'aquest petit increment, els nivells de p53 van tornar a baixar. Quan es va combinar la hidroxidreia amb l'inhibidor no hi havia gaire diferències respecte al tractament amb només amb hidroxidreia (**figura 28**).

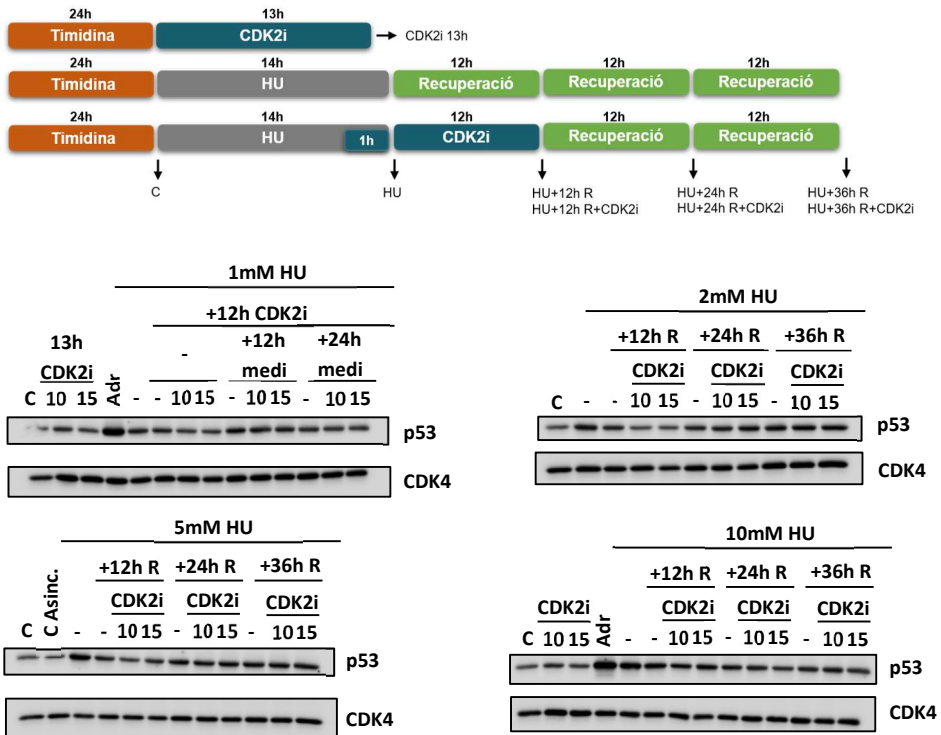


Figura 28. La inhibició de CDK2 no modifica els nivells de p53 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxidurea en cèl·lules HCT116. Es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Varem tractar les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxidurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 10µM i 15µM. Es va utilitzar un control de sincronització (C) i un control asincrònic (C Asinc.). Com a control positiu vàrem utilitzar un tractament amb Adriamicina (Adr). Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega.

En canvi els nivells de p21 no van variar durant cap dels tractaments amb hidroxidurea (**figura 29**). Igual que va succeir amb la roscovitina (**figura 18**), els nivells de p21 van incrementar durant la recuperació, un cop eliminada la hidroxidurea. La combinació amb CDK2i va fer que aquest augment fos menor, tot i que després d'eliminar l'inhibidor els nivells incrementen fins arribar als del tractament amb només amb hidroxidurea (**figura 29**).

RESULTATS

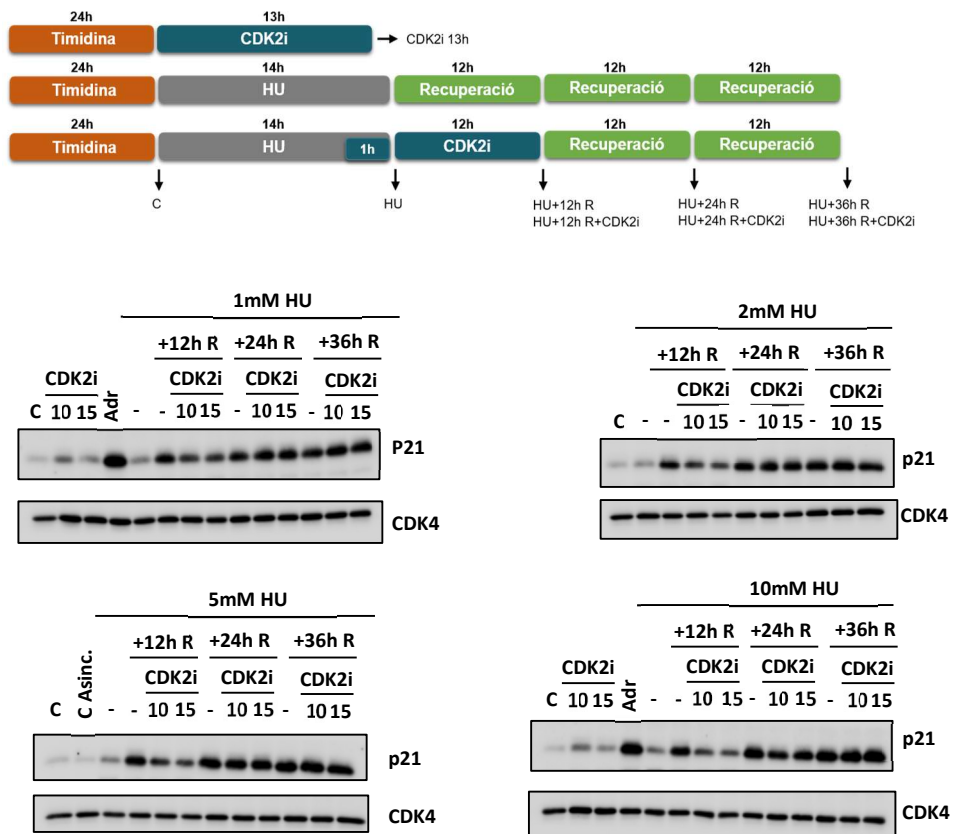


Figura 29. La inhibició de CDK2 no modifica els nivells de p21 després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxidurea en cèl·lules HCT116. Es van sincronitzar les cèl·lules amb timidina abans de fer els tractaments. Varem tractar les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxidurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 10 μ M i 15 μ M. Es va utilitzar un control de sincronització (C) i un control asincrònic (C Asinc.). Com a control positiu vàrem utilitzar un tractament amb Adriamicina (Adr). Es va utilitzar CDK4 com a control de càrrega.

Vist l'augment de p21 durant la recuperació després d'un estrès replicatiu sever, volíem veure a temps curts de recuperació quan augmentava. A més a més volíem comprovar per immunofluorescència aquest augment, ja que gràcies a la immunofluorescència podríem saber si l'augment era general o només es donava en algunes cèl·lules.

Per WB vàrem veure com després d'un tractament de 14 hores amb 10mM d'hidroxiurea, entre 1 i 2 hores després d'eliminar la hidroxiurea, els nivells de p21 comencen a augmentar fins les 6-8 hores on a partir d'aquí romanen estables (**figura 30**). Per immunofluorescència vàrem veure com a les 4 hores hi havia cèl·lules positives per p21 (**figura 30**). Com a marcador positiu de p21 vàrem utilitzar un tractament amb adriamicina. En canvi ni en el control ni en la condició només amb l'estrès replicatiu hi havia cèl·lules p21 positives.

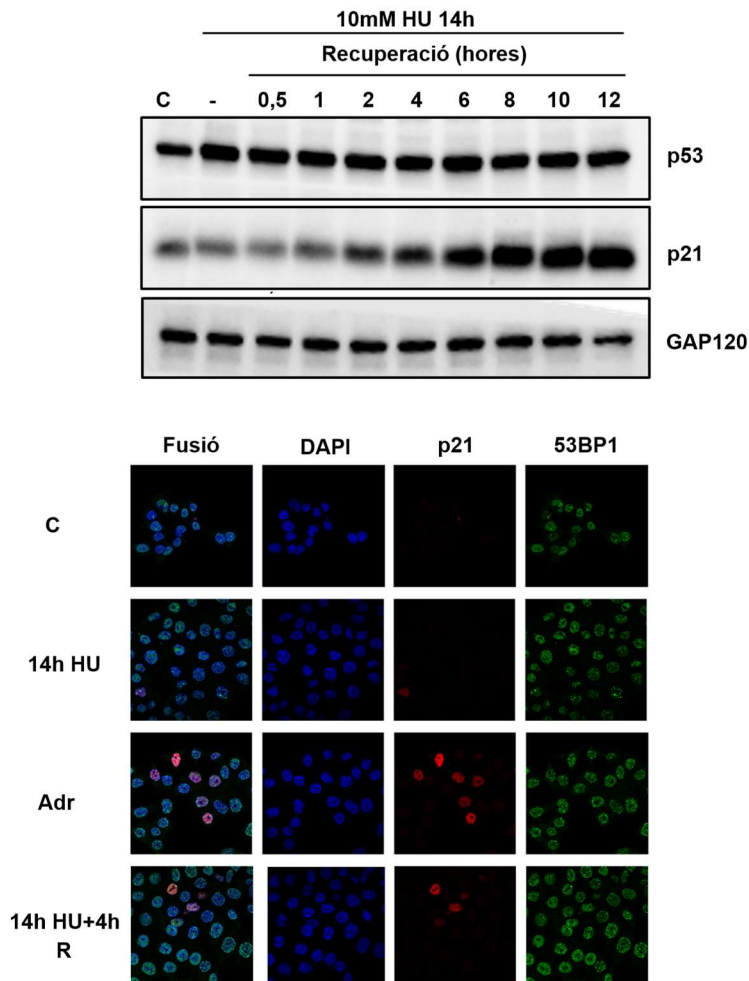


Figura 30. Durant la recuperació de l'estrès replicatiu incrementen les cèl·lules que expressen p21 en HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Després per una banda vàrem recollir per WB i per altra vàrem fixar i fer la immunofluorescència als temps indicats. Dosi d'hidroxiurea (HU): 10mM. En el cas del WB vàrem utilitzar GAP120 com a control de càrrega. En el cas de la

RESULTATS

immunofluorescència s'ha utilitzat un tractament amb adriamicina (Adr) com a control positiu. Es mostren imatges representatives de l'experiment (1n).

Com que per immunofluorescència vàrem comprovar que l'augment de p21 es dona en algunes cèl·lules, vàrem analitzar si més tard les cèl·lules p21 positives eren capaces de progressar en el cicle i arribar a la següent fase S.

Vàrem veure com cap de les cèl·lules p21 positives replicaven el DNA 24 hores després de l'estrès. A més a més hi havia cèl·lules p21 positives que eren bastant més grans que la resta, indicant que possiblement siguin cèl·lules senescentes (**figura 31**).

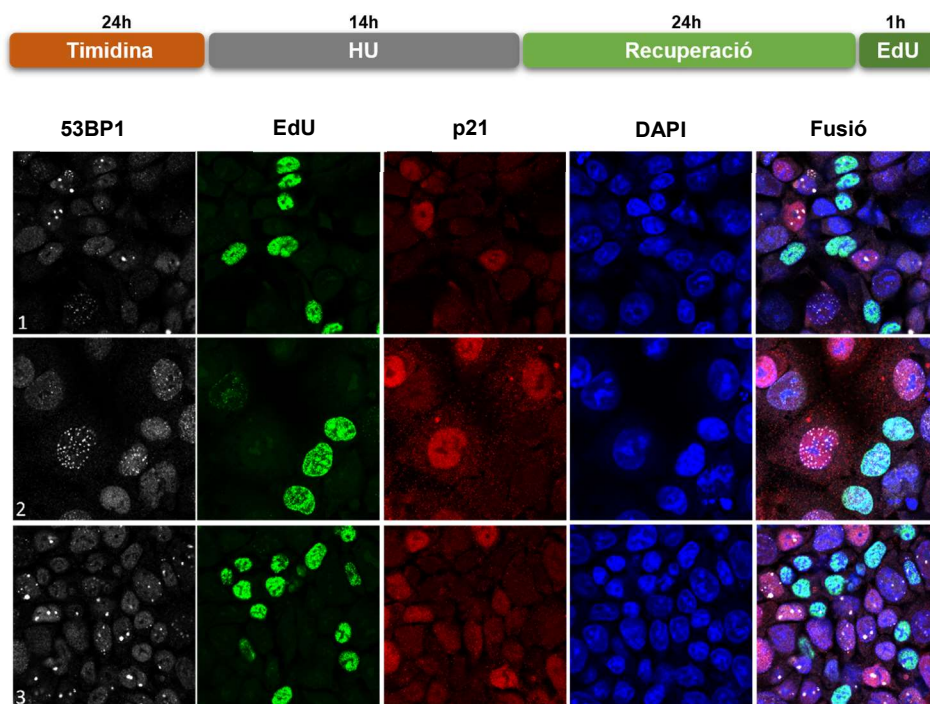


Figura 31. Les cèl·lules HCT116 que expressen p21 durant la recuperació d'un estrès replicatiu sever no repliquen el DNA 24 hores després de l'estrès. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Vàrem fixar i fer la immunofluorescència als temps indicats. Dosi d'hidroxiurea (HU): 10mM. Es mostren 3 imatges representatives de l'experiment.

3.3.13. L'ADDICIÓ DE B02 NO INCREMENTA L'EFECTE DE CDK2i EN LA RECUPERACIÓ DE LA REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER EN HCT116.

Al capítol 2 hem vist com RAD51 era important pel reinici de les forquetes i la seva progressió després d'un estrès replicatiu agut. Com que després de l'estrès replicatiu sever, a més de l'augment de l'activació de nous orígens, també observàvem nivells importants de reinici (**figures 11-12 i 19-20**), vàrem fer una prova i combinar l'inhibidor de RAD51 (B02) amb el de CDK2 (CDK2i). D'aquesta manera intentaríem afectar per una banda el reinici i per l'altra l'activació de nous orígens.

Els resultats de citometria van mostrar com el B02 no va augmentar l'efecte de CDK2i en el retard de la recuperació després d'un estrès replicatiu sever (**figura 22**). Com ja havíem vist, la combinació de la hidroxiurea amb l'inhibidor de la CDK2 va reduir el nombre de cèl·lules que van acabar la replicació. No obstant això, en afegir B02 a aquesta combinació no es va reduir més aquesta població cel·lular. Per si sol, B02 tampoc va tenir cap efecte sobre la recuperació a les 12 hores (**figura 32**).

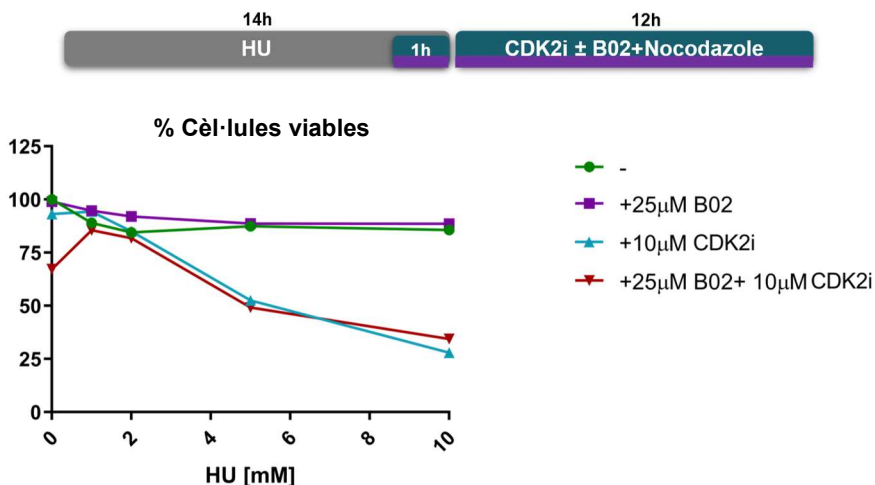


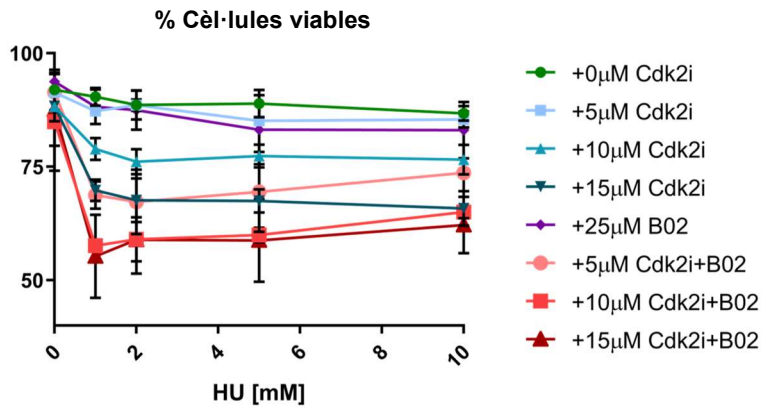
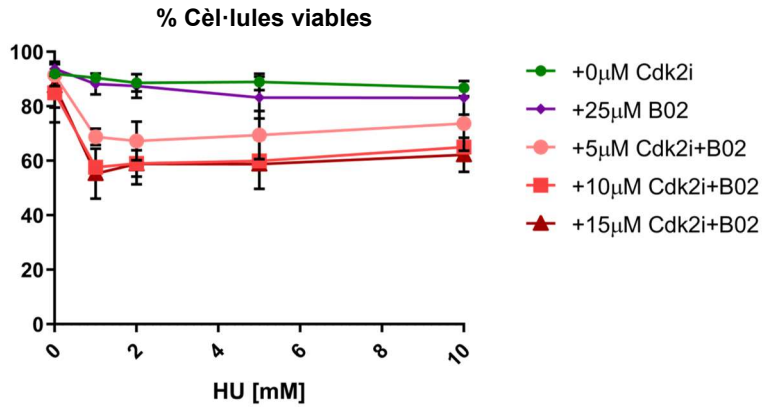
Figura 32. La inhibició de CDK2 i RAD51 Després d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea no té efecte additiu ni sinèrgic en la reducció del nombre de cèl·lules que finalitzen la replicació. Vàrem fer un marcatge amb BrdU i després tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosi CDK2 inhibitor II (CDK2i): 10µM. Dosi B02: 25 µM. Només vàrem

analitzar la població amb marcatge de BrdU. Vàrem calcular el percentatge de cèl·lules en fase G2/M.

3.3.14. LA COMBINACIÓ DE B02 I CDK2i DURANT LA RECUPERACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER INCREMENTA LA MORTALITAT EN HCT116.

Al fer l'experiment de citometria anterior (**figura 32**), vàrem descartar la població de cèl·lules mortes, així que vàrem quantificar-la amb una tinció amb anexina V i iodur de propidi.

El fet de combinar B02 amb 5 μ M i 10 μ M de CDK2i va incrementar de manera notable la mortalitat (**figura 33**), comparat amb l'efecte de només la combinació hidroxiurea amb 5 μ M i 10 μ M de CDK2i (**figura 33**). No obstant això, combinant B02 amb 15 μ M de CDK2i després de l'estrès replicatiu sever, no va produir diferències significatives respecte el tractament d'hidroxiurea amb 15 μ M de CDK2i.



		0mM HU						
0mM HU	+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM	15 µM	B02	10 µM B02	10 µM B02
	5 µM	n.s.	-	-	-	-	-	-
	10 µM	n.s.	n.s.	-	-	-	-	-
	15 µM	*	*	n.s.	-	-	-	-
	B02	n.s.	n.s.	n.s.	*	-	-	-
	5 B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	-
	10 B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
	15 B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

		1mM HU							
1mM HU	+Rosc	0 µM	5 µM	10 µM	15 µM	B02	10 µM B02	10 µM B02	
	5 µM	n.s.	-	-	-	-	-	-	
	10 µM	*	*	-	-	-	-	-	
	15 µM	**	**	n.s.	-	-	-	-	
	B02	n.s.	n.s.	n.s.	*	-	-	-	
	5 B02	**	**	n.s.	n.s.	*	-	-	
	10 B02	**	***	**	*	**	*	-	
	15 B02	**	**	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	

RESULTATS

		2mM HU							
2mM HU	+Rosc	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	B02	10 μ M B02	10 μ M B02	
	5 μ M	n.s.	-	-	-	-	-	-	
	10 μ M	*	*	-	-	-	-	-	
	15 μ M	*	*	n.s.	-	-	-	-	
	B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	-	
	5 B02	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	
	10 B02	**	**	*	n.s.	*	n.s.	-	
	15 B02	*	**	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	

		5mM HU							
5mM HU	+Rosc	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	B02	10 μ M B02	10 μ M B02	
	5 μ M	n.s.	-	-	-	-	-	-	
	10 μ M	*	*	-	-	-	-	-	
	15 μ M	**	**	n.s.	-	-	-	-	
	B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	-	
	5 B02	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	
	10 B02	**	***	*	n.s.	n.s.	n.s.	-	
	15 B02	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

		10mM HU							
10mM HU	+Rosc	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	B02	10 μ M B02	10 μ M B02	
	5 μ M	n.s.	-	-	-	-	-	-	
	10 μ M	*	n.s.	-	-	-	-	-	
	15 μ M	**	**	n.s.	-	-	-	-	
	B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	-	
	5 B02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	
	10 B02	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	
	15 B02	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Figura 33. La inhibició de RAD51 conjuntament amb CDK2 durant la recuperació després d'un estrès replicatiu sever incrementa la mort cel·lular en cèl·lules HCT116. Varem tractar les cèl·lules tal com es detalla a l'esquema. Dosis hidroxiurea (HU): 1mM, 2mM, 5mM i 10mM. Dosis CDK2 inhibitor II (CDK2i): 5 μ M, 10 μ M i 15 μ M. Dosi B02: 25 μ M. Varem analitzar la viabilitat cel·lular amb un marcatge d'Anexina V-PI. Es representa la mitjana de viabilitat de 2 experiments independents (2n). Al gràfic de dalt només hi ha els resultats d'aquests experiments amb les combinacions hidroxiurea+B02 i hidroxiurea+B02+CDK2i. En el gràfic de baix hem afegit les dades d'hidroxiurea+B02 de la **figura 25**. A les taules de sota es mostren els tests estadístics comparant totes les mostres agrupades de cada condició d'hidroxiurea (t-test, n.s.: estadísticament no significatiu; *: P valor <0.05; **: P valor <0.01; ***: P valor <0.001; ****: P valor <0.0001) (- : test fet a una altra casella de

CAPÍTOL 4

LA RECUPERACIÓ D'UN ESTRÈS
REPLICATIU SEVER ALTERA LA
DINÀMICA DELS DOMINIS DE
REPLICACIÓ I L'ACCESSIBILITAT DE LA
CROMATINA EN CÈL·LULES HCT116

4.1. INTRODUCCIÓ

En eucariotes la grandària del genoma fa gairebé impossible que es pugui replicar a partir d'un sol origen. La forqueta de replicació avança aproximadament entre 1-2Kb/min. Això implica que si la cèl·lula hagués de replicar un cromosoma sencer a partir d'un sol origen de replicació, podria tardar un mes en replicar-lo ^{507,508}.

A més a més, la replicació del genoma complet es fa per parts, ja que la quantitat de proteïnes que intervenen a l'inici de la replicació, i les que formen part de la forqueta de replicació són insuficients per replicar tot el genoma simultàniament. De manera que aquestes proteïnes implicades en la replicació esdevenen un factor limitant, com també ho són la quantitat de nucleòtids disponibles que té la cèl·lula per sintetitzar el nou DNA ^{509,510}.

Això implica una regulació molt precisa de l'activació dels orígens i també de les regions del genoma que es repliquen ⁵¹¹. Aquesta divisió permet una resposta ràpida a l'estrès replicatiu i assegura que el genoma es repliqui completament ⁵¹².

L'estudi dels patrons de replicació va començar fa aproximadament 60 anys, on van veure els primers indicis de que hi havia zones dels cromosomes que es replicaven abans que altres. A més a més varen demostrar que aquest ordre es mantenia en els cicles cel·lulars successius ⁵¹³. Gràcies als avanços que s'han fet en aquest camp, ara sabem que tots els eucariotes tenen un programa o patró robust de replicació del DNA. Aquest roman estable entre cèl·lules del mateix tipus ^{514,515}. De fet s'ha observat com hi ha malalties que alteren el patró de replicació, fent que es puguin detectar gràcies a la identificació dels canvis que produeixen ^{516,517}.

Amb l'evolució de les tècniques per a l'estudi dels cromosomes i la seva dinàmica, el grup de David Gilbert va aconseguir realitzar el mapeig dels cromosomes segons el temps de replicació ⁵¹⁸. Varen identificar dues regions als cromosomes: les *Constant Timing regions* (CTRs) i les *Timing Transition Regions* (TTRs).

- CTRs: Són segments cromosòmics, que es repliquen en un moment determinat de la fase S gràcies a l'acció coordinada dels replicons adjacents que formen el segment. La mida és de l'ordre de les megabases, tot i que varia en funció de la mida del genoma. Es poden classificar en primerencs o tardans, segons es repliquin a la primera part de la fase S o a la segona respectivament ⁵¹⁸⁻⁵²¹.
- TTRs: Són els fragments que es troben entre els CTRs i els delimiten, actuant com a fronteres. Els TTRs marquen la separació dels CTR i el seu temps de replicació varia abruptament de primerenc a tardà o a la inversa ⁵¹⁸⁻⁵²¹.

El patró de replicació es modifica durant el desenvolupament. Durant el desenvolupament i la diferenciació cel·lular, cada cèl·lula canvia el patró de replicació d'aproximadament la meitat del genoma. Aquestes variacions ocorren en fragments de l'ordre de 400-800Kb anomenats dominis de replicació ^{518,522-525}. En cèl·lules de mamífer s'han identificat aproximadament uns 5000 dominis de replicació, que divideixen el genoma ⁵²⁶. Els dominis de replicació són més petits que els CTRs descrits prèviament, i estan formats per clústers d'entre 1 i 4 replicons que activen la replicació de manera simultània ⁵²⁷. Aquest fet implica que els CTRs grans estiguin formats per diversos dominis de replicació que tenen el mateix *timing* de replicació ⁵²⁴.

En funció del moment de la fase S en que es repliquin, podem classificar els dominis de replicació en constitutivament inicials, constitutivament tardans i regulats pel desenvolupament ⁵¹². La divisió del genoma en dominis de replicació comporta beneficis en la resposta a l'estrès replicatiu, ja que permet que aquesta sigui ràpida i diferencial entre els dominis actius i els inactius durant l'estrès ^{512,526}. Quan es produeix estrès replicatiu, la cèl·lula inhibeix l'activació de nous dominis i es focalitza en la replicació dels dominis actius ⁵²⁶.

Tal com es fa amb el *DNA fiber assay*, es poden fer marcatges curts amb anàlegs de la timidina i després realitzar la immunofluorescència sense alterar la integritat del nucli. Així es poden marcar les zones del nucli que s'estan replicant en un moment determinat. Aquestes regions

reben el nom de focus de replicació, que corresponen als dominis de replicació actius en el moment de la incubació amb l'anàleg de timidina ^{528,529}.

Els dominis de replicació tenen una distribució característica dintre del nucli, mentre que els que es repliquen al principi es localitzen a la part central del nucli, els tardans es localitzen a la perifèria nuclear i al nuclèol. Aquesta distribució es manté entre els organismes eucariotes i vincula el *timing* de replicació amb l'estructura i disposició de la cromatina al nucli ⁵³⁰.

Els cromosomes es distribueixen en àrees delimitades en el nucli ⁵³¹. En una cèl·lula on només hi ha marcats els focus de replicació d'un sol cromosoma, aquests no es troben dispersos pel nucli, si no que estan concentrats a una zona molt concreta ⁵³¹⁻⁵³³.

A més de la distribució dels cromosomes en regions concretes, un altre factor clau a tenir en compte és que la cromatina interacciona entre ella. Hi ha tècniques com el Hi-C que permeten l'estudi de la interacció cromatina en 3D ⁵³⁴. Gràcies a la combinació d'aquesta tècnica combinada amb l'anàlisi de components principals (conegut com a PCA), es va clusteritzar la cromatina en dos compartiments, anomenats compartiment A i compartiment B ⁵³⁵. Com a tret característic, les regions B tenen un major nivell de interaccions entre elles. Això fa que la cromatina que forma les regions B sigui més compacta i condensada ⁵³⁶.

Els compartiments A correlacionen molt be amb la eucromatina, menys condensada i amb major activitat transcripcional. En canvi els compartiments B s'associen millor amb la heterocromatina ^{537,538}. Aquests compartiments també s'han relacionat amb el *timing* de replicació. En cèl·lules diferenciades, els dominis de replicació primerencs s'associen principalment als compartiment A i els tardans al compartiment B ^{537,538}. L'associació compartiment-domini de replicació és més dèbil en cèl·lules embrionàries que en diferenciades ⁵³⁹. El fet que els dominis de replicació canviïn la seva posició al nucli està relacionat amb la consolidació en els compartiments A o B ⁵⁴⁰.

Tal com passa amb els CTRs i TTRs, que es poden subdividir en dominis de replicació, els compartiments també es poden dividir en regions de menor mida anomenades domini topològicament associat (TAD). Amb la tècnica de Hi-C s'estudia la freqüència amb la que diferents regions interaccionen. Aquests TADs son regions de la cromatina que tenen una freqüència de interacció elevada entre elles i menor amb les regions de fora del TAD ⁵⁴¹. Aquests TADs estan separats per regions que actuen com a frontera i contenen llocs d'unió de proteïnes com les cohesines o el factor de transcripció CTCF ⁵⁴². Aquestes regions frontera s'han alineat amb les regions que separen els dominis de replicació ^{537,543}. A més a més gràcies a l'ús de la microscòpia de superresolució, s'ha pogut determinar que els TADs correspondrien a unitats estructurals directament relacionades amb els focus de replicació observats ⁵²⁷.

Com que part de la cromatina interacciona amb la làmina nuclear o el nuclèol, hi ha dominis associats tant a la làmina nuclear (LADs), com al nuclèol (NADs) ^{544,545}. Aquests dominis es relacionen amb el compartiment B de la cromatina i amb els dominis de replicació tardana ⁵⁴⁶. No obstant això, els LADs no només contenen dominis de replicació tardana. Si tenim en compte la divisió dels cromosomes en CTRs i TTRs, els LADs no sols estan formats per CTRs tardans, alguns estan formats també per TTRs. El que succeeix és que s'ha vist com els límits dels dominis de replicació més primerencs es solapen amb els límits dels LADs. Això fa que les forquetes de replicació activades en aquests dominis primerencs es puguin desplaçar als LADs i aquests es puguin replicar de manera primerenca ⁵³⁷.

Per tant, hi ha una relació entre la estructura de la cromatina, la localització al nucli i el *timing* de replicació. S'ha vist com en funció de si el TAD es troba localitzat en el nucli en el compartiment A o B es replicarà abans o després. De fet, en llevats es va veure com la inserció de regions que normalment es repliquen de manera primerenca en regions que es repliquen de manera tardana, provoca la replicació tardana dels orígens inserits ⁵⁴⁷.

Tant els TADs com els seus límits es mantenen relativament constants entre els diferents tipus cel·lulars ^{535,541}. En canvi els compartiments A i B, i els LADs varien sovint entre tipus cel·lulars ⁵³⁹. El model més acceptat fins ara és que la cromatina es divideix en unitats estructurals, que serien els dominis de replicació i el que varia durant el desenvolupament, és la seva organització al nucli i el temps en que es replica ⁵⁴⁸.

4.1.1. **TIMING DE REPLICACIÓ I CICLE CEL·LULAR**

El *timing* de replicació s'estableix al principi del cicle cel·lular, durant la G1 a un moment concret conegut com a *timing decision point* (TDP). Aquest és un període curt del cicle on els dominis de replicació de la cromatina es mouen als llocs pertinents ^{549,550}. Aquest període coincideix amb el reestabliment de les interaccions 3D de la cromatina per formar els TADs i els compartiments A o B ⁵⁵¹. No obstant això, l'establiment del *timing* de replicació es desfà en acabar la fase S, mentre que la seva estructura 3D es manté fins la mitosi ^{551,552}.

S'ha vist com si es força la replicació quan no està establert aquest *timing* de replicació (G1 abans del TDP o G2), aquesta ocorre en un ordre temporal aleatori ^{550,552}.

L'establiment del *timing* de replicació és independent de la selecció dels origen que utilitzaran els diferents dominis de replicació ⁵⁵³. El TDP precedeix el moment en el cicle on es selecciona l'origen que s'activarà (*origin decision point*) ⁵⁵⁴. El *timing* de replicació és robust en la cèl·lula, les regions que es marquen al principi de la replicació en una cèl·lula són les mateixes en el cicle següent ^{514,515}. En canvi la selecció d'origen és estocàstica, en una mateixa cèl·lula varia entre els successius cicles cel·lulars ⁵⁵⁵.

4.1.2. **TIMING DE REPLICACIÓ I EPIGENÈTICA**

Els dominis de replicació primerencs es relacionen amb la cromatina menys condensada, amb una elevada densitat gènica i transcripcionalment activa ⁵²³. A més a més, s'ha vist que tenen una alta densitat d'orígens de replicació i un enriquiment en GC ^{518,556}. En canvi

els dominis de replicació tardans estan associats a zones del DNA més condensades, amb menor densitat de gens, riques amb elements repetitius ⁵¹⁸. En resum, els dominis de replicació primerencs es relacionen amb la eucromatina i formen part del compartiment A i els tardans amb l'heterocromatina i formen part del compartiment B ^{525,536,537}.

No obstant això, aquesta correlació entre les característiques esmentades i el *timing* de replicació, només encaixa al 100% amb la meitat del genoma, la que no es veu afectada pel desenvolupament i la diferenciació cel·lular ⁵¹². Això té a veure amb que hi ha uns dominis primerencs o tardans constitutius i d'altres que es regulen en funció del desenvolupament i diferenciació cel·lular. Tot i que es repliquin al principi de la fase S, aquests últims tenen algunes característiques de dominis de replicació tardans com la baixa densitat d'origens de replicació ⁵⁵⁷⁻⁵⁶¹. Succeeix el mateix que amb l'heterocromatina facultativa, que en funció del tipus cel·lular, pot ser heterocromatina o no. Depenent de si forma part de l'heterocromatina o no, tindrà diferents marques epigenètiques ⁵⁶².

Com que la condensació i estructura de la cromatina és important pel *timing* de replicació, és important analitzar la influència de diverses marques epigenètiques en aquest. Actualment s'han vinculat diverses marques epigenètiques al *timing* de replicació. Per exemple els dominis de replicació primerencs es relacionen amb marques de transcripció activa com les mono, di o trimetilacions en H3K4, la monometilació en H3K20, la H3K36 i amb acetilacions en H3K9 i H3K27 ⁵⁶³. Els dominis de replicació tardans s'han relacionat amb la trimetilació H4K20 ⁵⁶⁴. A més a més, no només l'epigenètica pot influir en el *timing* de replicació, s'ha descrit que també succeeix al revés, és a dir el *timing* de replicació pot influir en els nivells d'acetilació de la cromatina ⁵⁶⁵.

4.2. RESULTATS PREVIS

Com ja vàrem veure al capítol 3, després d'un estrès replicatiu sever, s'activen nous orígens de replicació. Amb la tècnica de *DNA fiber assay* no podíem saber on estaven localitzats aquests nous orígens, si en els dominis de replicació que ja estaven actius o s'estan activant nous dominis de replicació. Si s'estan activant nous dominis, aquesta activació pot ser està alterant el *timing* de replicació. Tal com hem vist abans, això podria tenir un impacte sobre les marques epigenètiques i l'expressió gènica.

4.3. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest capítol són:

- I. Comprovar si l'activació de nous orígens després d'un estrès replicatiu sever es dona en nous dominis de replicació.
- II. En cas afirmatiu, analitzar si aquesta activació de nous dominis té conseqüències en la condensació de la cromatina i l'expressió gènica.

4.4. RESULTATS

4.4.1. LES CÈL·LULES HCT116 ACTIVEN NOVES FACTORIES DE REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER

Per tal d'abordar el primer objectiu vàrem fer un anàlisi semblant al *DNA fiber assay* però en aquest cas sense lisar les cèl·lules. Vàrem fer un marcatge amb un primer anàleg de la timidina (CldU) just abans de la inducció de l'estrès replicatiu. D'aquesta manera podíem marcar els dominis actius que patirien l'estrès replicatiu. Després vàrem induir l'estrès replicatiu amb hidroxiurea amb la presència del primer anàleg, així seguiríem marcant els dominis actius fins que aquests es paressin a conseqüència de l'estrès. En acabar el temps del tractament amb hidroxiurea, vàrem eliminar tant la hidroxiurea com l'anàleg de timidina. A continuació, tal com es fa amb el *DNA fiber assay*, vàrem fer un segon

marcatge amb un altre anàleg de la timidina (IdU). Així podríem marcar les factories actives després de l'estrès replicatiu amb un altre anàleg. Després es van fixar les cèl·lules i es va fer una immunofluorescència per marcar amb dos fluorocroms diferents les factories actives abans i després de l'estrès.

D'aquesta manera vàrem poder veure si el domini de replicació on s'activava el nou origen era el mateix, i per tant les dues senyals de fluorescència col·localitzaven; o en canvi hi havia senyals de fluorescència corresponents al segon anàleg que no col·localitzaven amb el primer, indicant que són nous dominis de replicació activats després de l'estrès replicatiu. Tot i això no era possible distingir si la col·localització es devia al reinici de la forqueta o a l'activació d'un nou origen dintre de la factoria. No obstant això, el que ens interessava estudiar era si es produïa l'activació de nous orígens en noves factories. Aquest fet es podia comptabilitzar de forma clara i corresponia al nombre de factories marcades només amb el segon anàleg.

Les imatges les vàrem analitzar amb una macro feta amb ImageJ. Per saber si el senyal del segon anàleg corresponia a un domini nou o provenia del mateix, vàrem tenir en compte la mida dels focus de replicació, que és aproximadament de 130nm de diàmetre ⁵⁶⁶. Per cada focus detectat vàrem crear una regió on el focus estès al centre. La regió creada pel primer anàleg (CIdU) la vàrem fer amb el doble de la mida dels focus i la del segon amb la mida dels focus de replicació descrita a altres estudis ⁵⁶⁶. Si les dues regions estaven en contacte assumiríem que el senyal del segon anàleg provenia del mateix domini marcat amb el primer anàleg.

Per comprovar si la tècnica funcionava adequadament, vàrem utilitzar diversos controls, detallats a l'esquema de la **figura 1**. Un on la col·localització fos la màxima (C-I) i a més fos l'esperable si només es produís un reinici o activació dels nous orígens dintre dels dominis que ja estaven actius abans de l'estrès replicatiu.

També vàrem afegir un altre control on la col·localització fos la mínima (C-1h-I). En aquest últim cas s'elimina el CIdU i després es deixa

replicar una hora sense cap anàleg de la timidina. S'ha vist que una hora és el temps que tarda un foci en desaparèixer amb aquesta tècnica ⁵²⁷. D'aquesta manera després d'aquesta hora els dominis actius seran diferents i així podrem veure el mínim de col·localització al que podem arribar amb la tècnica.

Després de l'estrès replicatiu, es triga aproximadament 30 minuts en tornar a detectar per immunofluorescència la incorporació del segon anàleg de la timidina a les forquetes de replicació actives ⁴⁹⁹. Per això, després de l'estrès replicatiu vàrem fer un marcatge de 30 minuts enlloc del 15 que fèiem en condicions control.

Per a descartar que les diferències que es puguin observar siguin degudes a aquesta diferència en el temps de incubació amb IdU, vàrem utilitzar una altre condició on també vàrem fer un marcatge amb 15 minuts de CIdU i després 30 minuts de IdU per poder veure si hi havia un augment en l'activació de nous dominis.

A la **figura 1** es pot veure representat el percentatge de col·localització dels dominis de replicació marcades amb el segon anàleg en cada una de les cèl·lules analitzades. El control de C-1h-I, tal com esperàvem va ser la condició amb menys col·localització es va observar. Les cèl·lules sotmeses a un estrès replicatiu sever van presentar un percentatge de col·localització més proper a les de C-1h-I que a C-I. Això ens va indicar que després d'un estrès replicatiu sever hi havia nous orígens de replicació que s'activaven a nous dominis de replicació. A més, si analitzem la distribució dels valors obtinguda, observem una major dispersió de les dades en la condició que va patir l'estrès replicatiu que en els controls.

RESULTATS

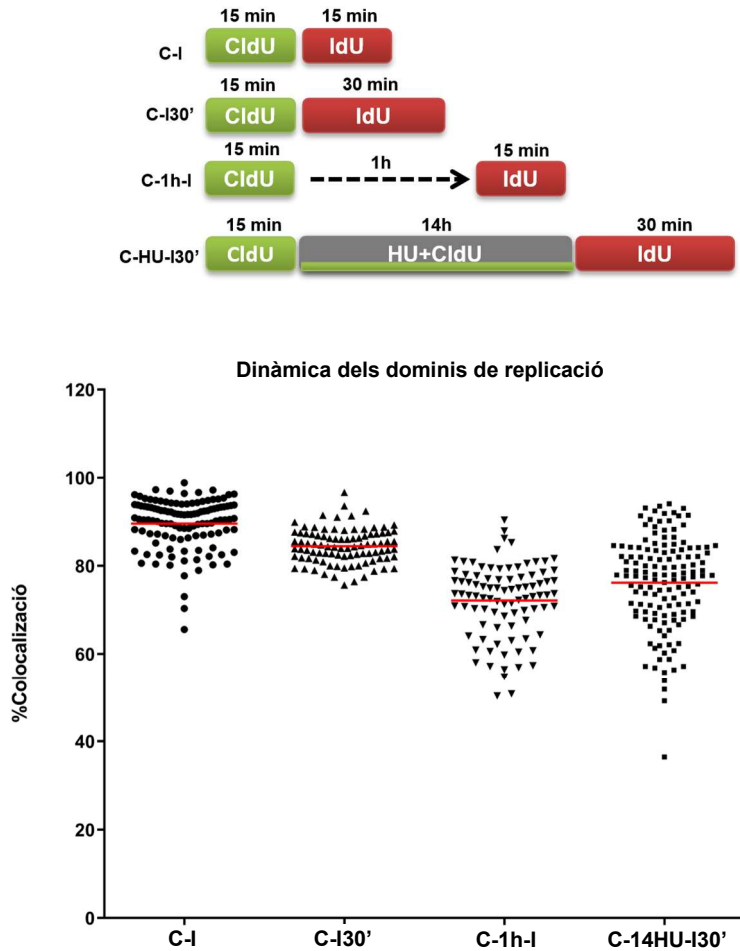


Figura 1. L'estrès replicatiu sever altera la dinàmica dels dominis de replicació en cèl·lules HCT116. Vàrem fer el marcatge i tractament de les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Es representa el percentatge de colocalització dels dos marcatges (CldU i IdU). Cada punt correspon a una cèl·lula diferent. La línia vermella representa la mediana de cada condició. Es mostren els resultats d'un experiment representatiu de 5 (5n).

En veure la dispersió de dades i que tot i que obteníem moltes imatges, el nombre de cèl·lules analitzades per experiment no era elevat, vàrem replicar aquest experiment però utilitzant la tècnica de *high content screening*. D'aquesta manera aconseguiríem estudiar un nombre major de cèl·lules i obtenir uns resultats més robustos.

Els resultats foren molt semblants als obtinguts anteriorment, on podem veure com després d'un estrès replicatiu es va produir una disminució de la col·localització, es a dir, hi havia major nombre de nous dominis de replicació que s'activaven després de l'estrès replicatiu (**figura 2**).

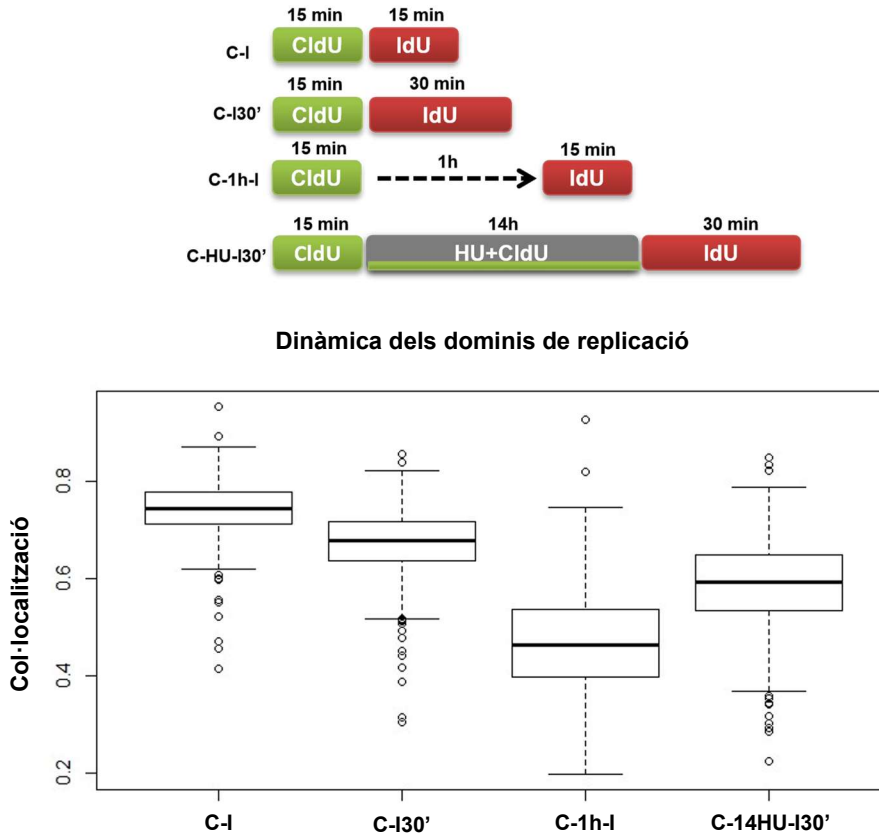


Figura 2. L'estrès replicatiu sever altera la dinàmica dels dominis de replicació en cèl·lules HCT116 per HCS. Vàrem fer el marcatge i tractament de les diferents condicions tal com s'indica a l'esquema. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Es representa el diagrama de caixa de la col·localització dels dos marcatges (CldU i IdU). Es mostren els resultats d'un experiment representatiu de 2. Es varen analitzar entre 1000 i 1800 cèl·lules per condició.

4.4.2. LA RECUPERACIÓ DE L'ESTRÈS REPLICATIU SEVER NO AFECTA L'EXPRESSIÓ D'ORF1p EN CÈL·LULES HCT116

Una vegada comprovat que s'activaven nous orígens a nous dominis de replicació, la pregunta va ser si aquest fet podria causar alteracions

en l'expressió gènica, possiblement derivats dels canvis en el *timing* de replicació i en les marques epigenètiques.

La nostra hipòtesi era que aquest fenomen d'activació de nous dominis de replicació succeeix a regions aleatòries del genoma, per tant no teníem gens diana on estudiar el possible canvi epigenètic degut a l'estrès replicatiu. El primer que vàrem fer per comprovar si la recuperació a l'estrès replicatiu produeix canvis en l'expressió gènica, va ser estudiar l'expressió d'ORF1p abans i després de l'estrès replicatiu.

ORF1p és una proteïna que prové de la transcripció de LINE-1, un retrotransposó de la família dels LINE (*Long interspersed Nuclear Element*). Aquest LINE-1 es troba reprimat per metilació, de manera que si s'altera la metilació d'aquest gen es pot produir l'expressió d'ORF1p^{567,568}. Com que aquest retrotransposó comprèn aproximadament el 17% del genoma humà, si es produeixen alteracions a l'atzar en el *timing* de replicació, és possible que trobem alguna cèl·lula que després de l'estrès replicatiu pugui expressar ORF1p. Es a dir utilitzarem ORF1p com un sensor de possibles canvis epigenètics derivats de l'estrès replicatiu que afectin la expressió gènica^{568,569}.

Les cèl·lules de càncer de mama MCF-7 tenen una expressió basal d'aquest retrotransposó⁵⁷⁰. De manera que vàrem utilitzar les MCF-7 com a control positiu. En canvi les cèl·lules HCT116 no expressen aquesta proteïna, ja que el gen de LINE-1 es troba fortament reprimat⁵⁷⁰.

Analitzant l'expressió per *western blot* (WB) vàrem veure com després d'un estrès replicatiu sever no hi havia cap indicatiu d'expressió d'ORF1p (**figura 3**).

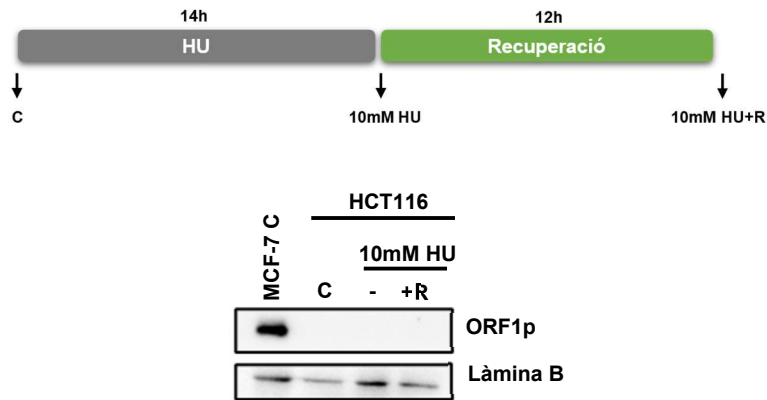


Figura 3. No es detecten diferències per *Western Blot* en els nivells d'ORF1p després de l'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema i recollir per WB. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Vàrem utilitzar la làmina B com a control de càrrega i les cèl·lules MCF-7 com a control positiu. Es mostren els resultats d'un experiment representatiu de 3. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Rosell.

En vista dels resultats obtinguts, volíem descartar que l'expressió no es donés en un nombre insuficient de cèl·lules que fes que les diferències fossin indetectables per WB. Per això, vàrem fer el mateix experiment però per analitzant els nivells d'ORF1p per immunofluorescència, així podríem analitzar diverses cèl·lules per separat, a veure si en alguna es produïa algun canvi en l'expressió. El resultat va ser idèntic al de WB. L'anticòs funciona correctament, perquè detectàvem senyal en el control positiu (MCF-7), però en cèl·lules HCT116 no es varen produir canvis en els nivells d'expressió d'ORF1p ni en condicions control ni després d'un estrès replicatiu (**figura 4**).

RESULTATS

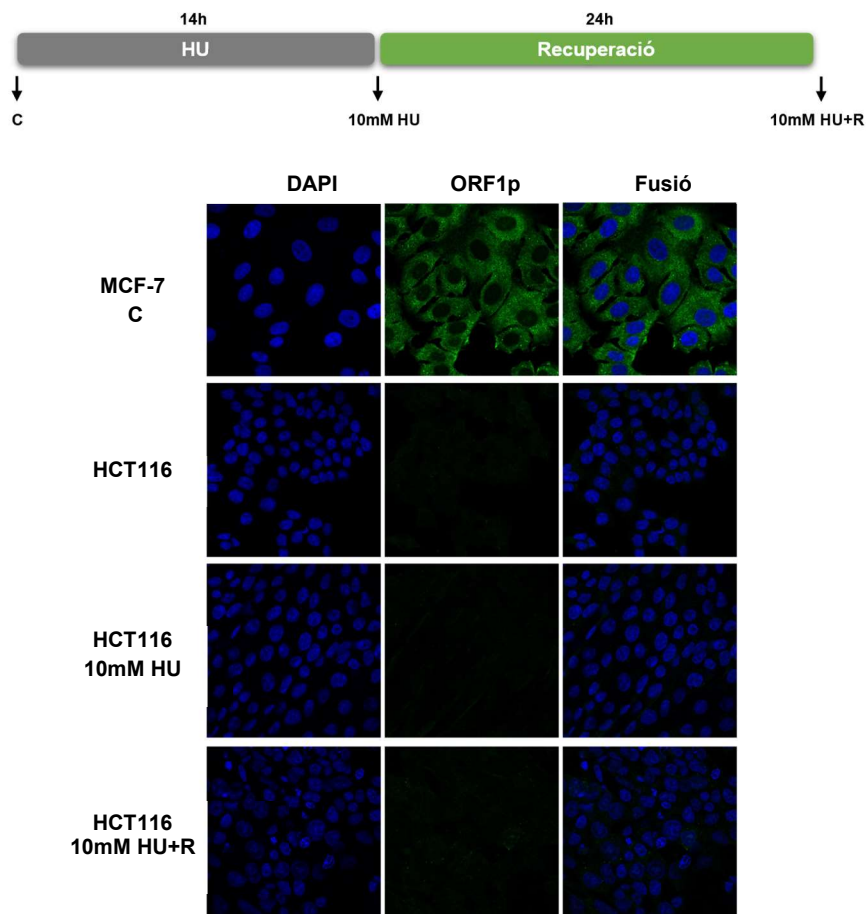


Figura 4. Els nivells d'ORF1p no varien per immunofluorescència després de l'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema, fixar i fer la immunofluorescència. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Vàrem utilitzar les cèl·lules MCF-7 com a control positiu. Es mostren les imatges d'un experiment representatiu de 3. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Rosell.

Durant el tractament amb la hidroxiurea, només les cèl·lules que ja estiguin en fase S al principi serien les que tindrien un estrès replicatiu de 14 hores. De manera que els possibles efectes d'un estrès replicatiu sever (14 hores amb les forquetes de replicació parades) només els veuríem en un percentatge de les cèl·lules.

Per tal d'incrementar la població cel·lular afectada, el que vàrem fer fou tractar les cèl·lules amb varis cicles de 14 hores amb hidroxiiurea combinada amb un temps de recuperació després de cada tractament (10 hores). Vàrem provar a fer dos i quatre cicles de tractament amb hidroxiiurea i recuperació. Tant per WB com per immunofluorescència els resultats foren idèntics als obtinguts només amb un cicle d'estrès replicatiu, ja que no hi havia expressió d'ORF1p després de 2 o 4 cicles d'estrès replicatiu (**figura 5**).

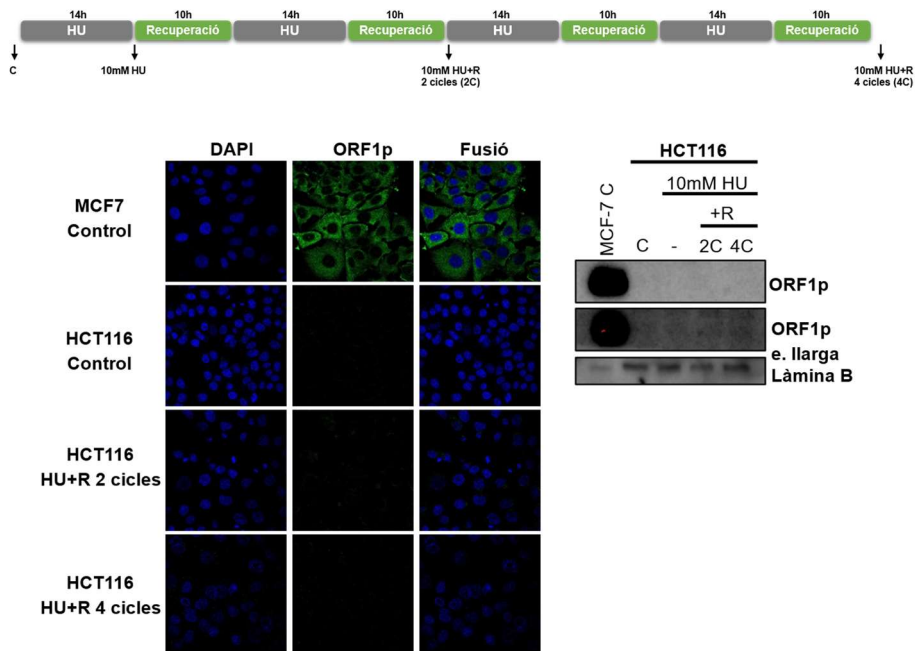


Figura 5. Els nivells d'ORF1p no varien després de varis cicles d'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema. Després per una banda vàrem recollir per WB i per l'altra vàrem fixar i fer la immunofluorescència. Dosi d'hidroxiiurea (HU): 10mM. Vàrem utilitzar les cèl·lules MCF-7 com a control positiu. En el cas del WB vàrem utilitzar la làmina B com a control de càrrega. Es mostra un WB i imatges de la immunofluorescència representatius de tres experiments independents. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Rosell.

Al no haver trobat diferències a nivell de proteïna vàrem estudiar els nivells d'mRNA d'ORF1p, a veure si aquests incrementaven després d'un estrès replicatiu sever. Al ser aquesta tècnica molt sensible podríem detectar els petits canvis que hi poguéss haver a nivell

RESULTATS

d'expressió gènica. No obstant això, no va haver-hi diferències entre les diferents condicions estudiades (**figura 6**).

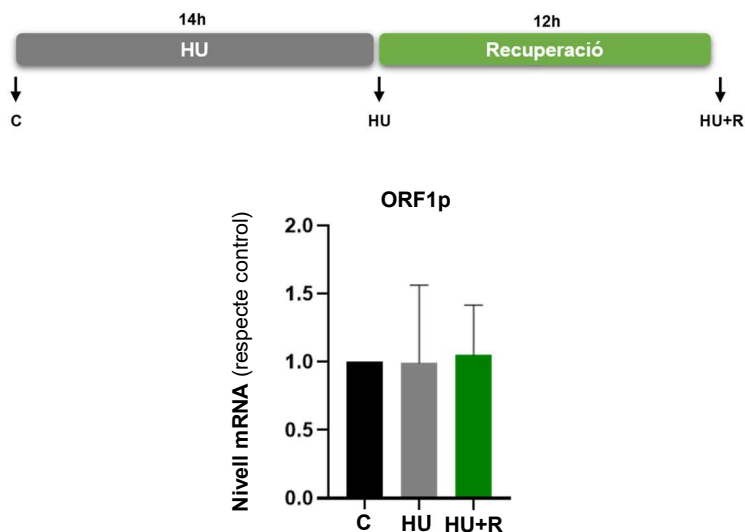


Figura 6. Els nivells d'ORF1p no varien per RT-qPCR després de l'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema i extreure el mRNA per a fer la RT-qPCR. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Els nivells de mRNA són relatius al control. Es representa la mitjana de 3 experiments independents (3n).

4.4.3. ELS NIVELLS DE CK20 INCREMENTEN DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER EN CÈL·LULES HCT116

Com que no vàrem veure cap canvi amb l'expressió d'ORF1p, ho vàrem intentar amb un panell de gens marcadors de cèl·lula mare tumoral de càncer colorectal⁵⁷¹. Al estar aquests gens afectats per la diferenciació o durant la transformació, vàrem estudiar l'efecte de l'estrès replicatiu sever en l'expressió d'aquests gens. Vàrem escollir aquests gens pel fet que probablement siguin més susceptibles de variar la seva epigenètica (ho fan durant la diferenciació) i potser el *timing* de replicació⁵⁷¹.

De tots el panell analitzat, només en el cas de la CK20 l'expressió gènica va variar després d'un estrès replicatiu sever (**figura 7**). Els nivells d'mRNA en la resta de gens es van mantenir semblants en totes les condicions. En canvi amb CK20, al control i just després de l'estrès replicatiu (HU) els nivells eren iguals, mentre que després de la recuperació aquests van augmentar (HU+R). També ho van fer després de 4 cicles de tractament amb hidroxiurea i recuperació (4HU+R 4c) (**figura 7**).

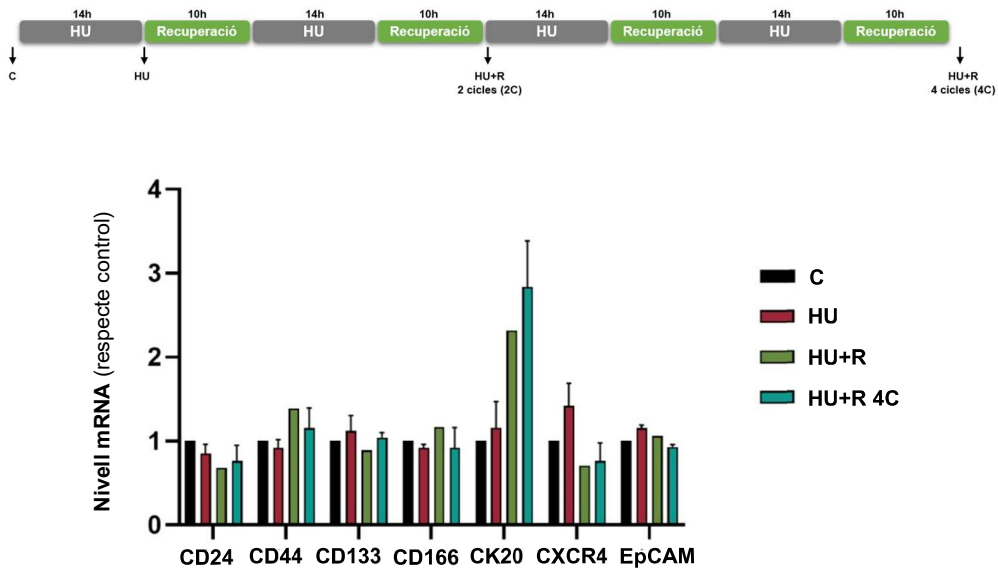


Figura 7. Els nivells de CK20 varien per RT-qPCR després d'un o varis cicles d'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema i extreure el mRNA per a fer la RT-qPCR. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Els nivells de mRNA són relatius al control. Es representa la mitjana de 3 experiments independents. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Pérez.

En veure aquest increment en els nivells d'mRNA vàrem analitzar si també érem capaços de veure el mateix amb els nivells de proteïna. En aquest cas vàrem incrementar el temps de recuperació de 10 hores a 12 hores (l'habitual que havíem estat fent als altres capítols), per veure si hi havia més diferències i també per mantenir les condicions que havíem fet prèviament. En el cas dels cicles vàrem allargar el temps de recuperació de l'últim. A més a més vàrem afegir dues condicions on vàrem augmentar el temps de recuperació a 24 i 48 hores, per veure si aquestes diferències es mantenien en el següent cicle.

RESULTATS

Com a control positiu vàrem utilitzar les cèl·lules DLD-1, que estava descrit que tenien majors nivells de CK20 ⁵⁷².

Tot i que l'expressió de CK20 en HCT116 és pràcticament indetectable, es pot apreciar com els nivells varen augmentar lleugerament després de l'estrès replicatiu (**figura 8**).

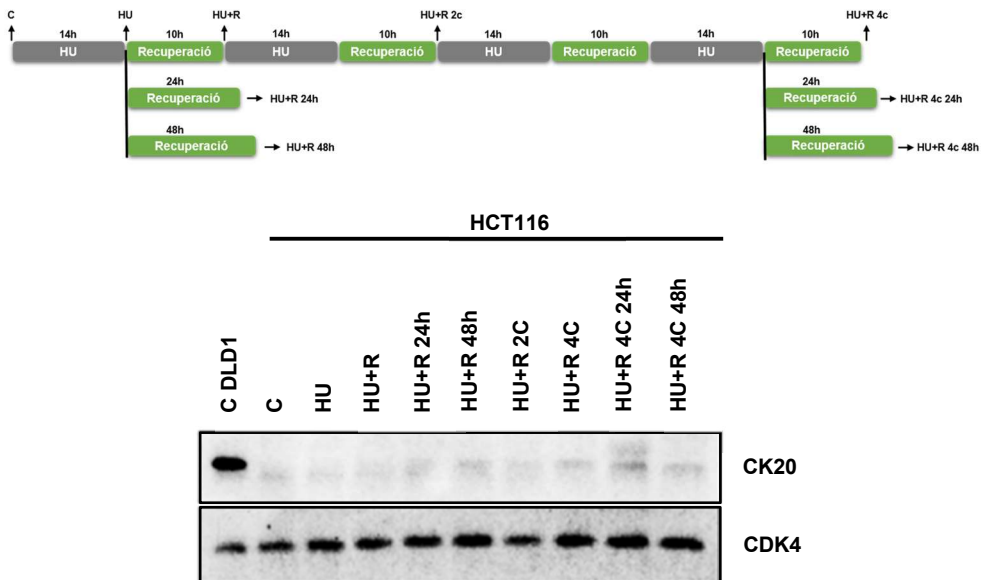


Figura 8. Els nivells de CK20 varien per WB després d'un o varis cicles d'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema i Després recollir per WB. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Vàrem utilitzar la proteïna CDK4 com a control de càrrega i les cèl·lules DLD-1 com a control positiu. Es mostren els resultats d'un experiment representatiu de 3. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Pérez.

Els nivells detectats de CK20 per WB eren baixos, i ja vàrem veure que amb la RT-qPCR no hi havia una gran diferència. Tot i que era possible que es produís un efecte generalitzat però molt lleuger en la expressió de CK20, la nostra hipòtesi fou que es produïen canvis en aquesta proteïna en poques cèl·lules al atzar. Per testar aquesta hipòtesi vàrem repetir l'experiment, però detectant la proteïna CK20 per immunofluorescència.

L'única condició on vàrem trobar cèl·lules amb marcatge positiu de CK20 va ser la que les cèl·lules s'havien recuperat després de l'estrès replicatiu sever (**figura 9**).

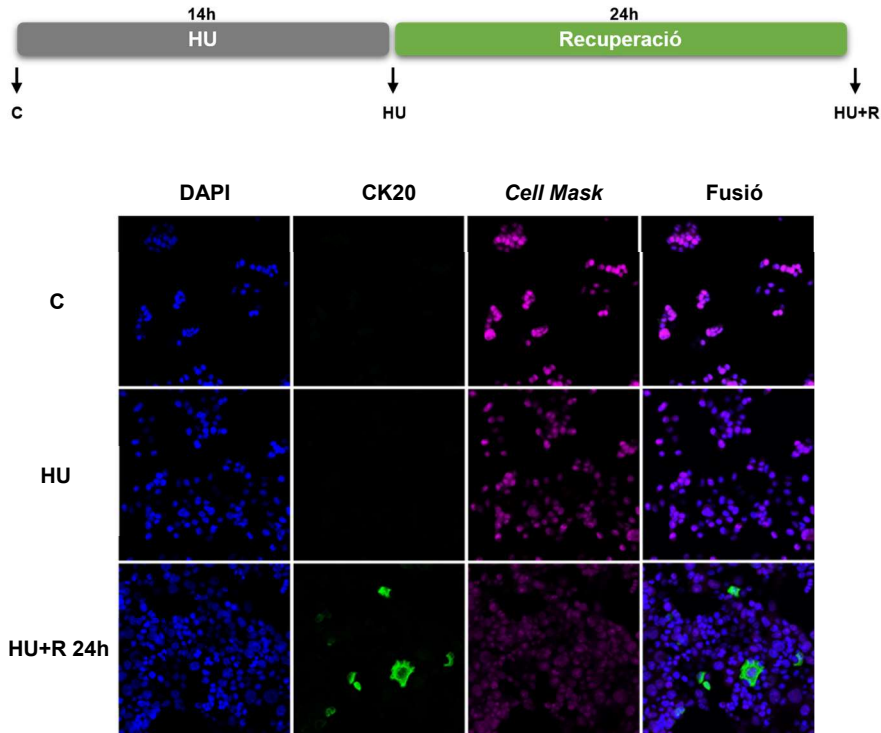


Figura 9. Els nivells de CK20 varien per immunofluorescència després d'un o quatre cicles d'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema, fixar i fer la immunofluorescència. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Es mostren les imatges d'un experiment representatiu de 3. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Pérez.

Tot i trobar cèl·lules positives, aquestes eren un esdeveniment poc freqüent, de fet hi havia imatges on no n'hi havia. De manera que vàrem fer una immunofluorescència amb la tècnica de *high content screening* per incrementar el nombre de cèl·lules positives i poder analitzar percentatges de positivitat d'una manera més fidel i robusta.

Igual que havíem vist a l'experiment anterior (**figura 9**), les cèl·lules CK20 positives només es trobaven a les condicions on les cèl·lules s'havien recuperat d'un estrès replicatiu sever (**figura 10**). Així doncs, tot i que els valors eren baixos -estaven entre el 0.5% i el 5%- cal destacar que tant en la condició control, com amb la que s'havia fet només un tractament amb hidroxiurea (sense recuperació) no va ser possible trobar cap cèl·lula positiva, ni en les imatges de microscòpia de la **figura 9** ni amb les de *High Content Screening* (**figura 10**).

RESULTATS

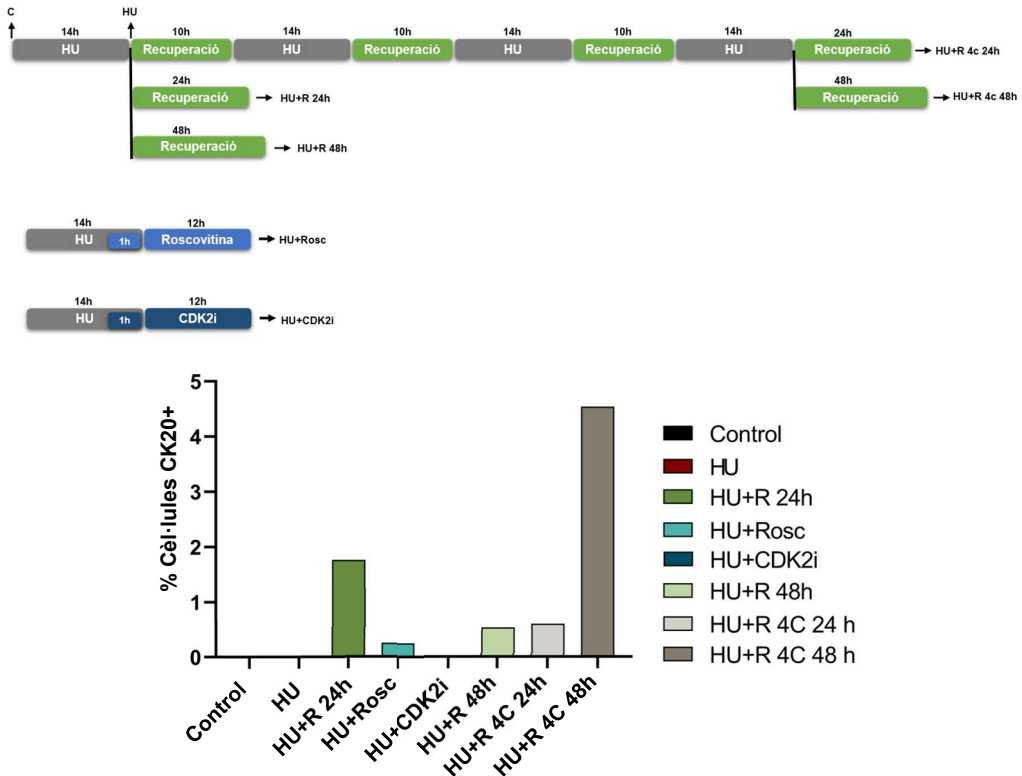


Figura 10. Els nivells de CK20 varien per immunofluorescència de HCS després d'un o quatre cicles d'estrès replicatiu en cèl·lules HCT116. Vàrem tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'esquema, fixar i fer la immunofluorescència. Dosi hidroxiurea (HU): 10mM. Vàrem utilitzar les cèl·lules DLD-1 com a control positiu. Es varen analitzar entre 800 i 1500 cèl·lules per condició. Es mostren els percentatges d'un experiment representatiu de 3. Experiments fets en col·laboració amb Alejandro Pérez.

4.4.4. L'ESTRÈS REPLICATIU INCREMENTA L'ACCESSIBILITAT DE LA CROMATINA EN CÈL·LULES HCT116

En trobar un gen que si canviava la seva expressió en algunes cèl·lules després d'un estrès replicatiu sever, varem analitzar si aquests canvis es produïen a més regions del genoma. Per fer aquesta comprovació varem utilitzar la tècnica ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*). Aquesta permet identificar les regions on la cromatina és accessible i podríem avaluar com varia després de l'estrès replicatiu.

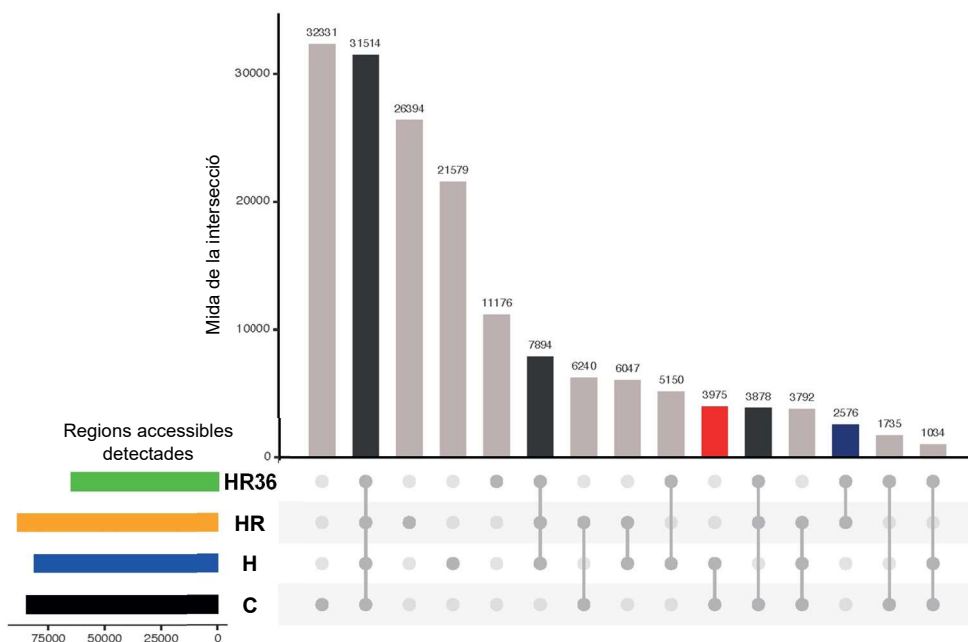
La base d'aquesta tècnica és utilitzar una transposasa hiperactiva (Tn5) que permet introduir adaptadors a les regions on la cromatina és accessible. Després gràcies a una PCR s'amplifiquen aquestes regions que s'identificaran per seqüenciació. Així podrem veure si hi ha diferències en l'accessibilitat de la cromatina en resposta a l'estrès replicatiu.

Vàrem utilitzar quatre condicions diferents:

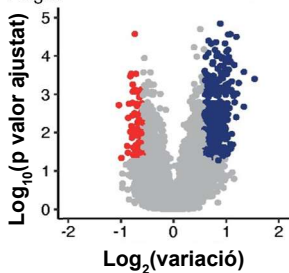
- Control (**C**): Són cèl·lules HCT116 recollides directament sense fer cap tractament.
- Hidroxiurea (**H**): Són cèl·lules recollides després d'un tractament amb 10mM d'hidroxiurea durant 14 hores. Amb aquesta condició podríem veure si l'estrès replicatiu per si sol indueix canvis en l'accessibilitat de la cromatina.
- Hidroxiurea i recuperació (**HR**): Són cèl·lules tractades primer amb hidroxiurea (igual que a la condició anterior) i després es deixen recuperar en medi durant 12 hores.
- Hidroxiurea i recuperació 36 hores (**HR36**): En aquesta condició la recuperació és de 36 hores. Així podríem comprovar si els possibles canvis produïts durant la recuperació es mantenen.

Després de la seqüenciació vàrem alinear les seqüències obtingudes contra el genoma de referència. Les regions on la cromatina es troba més accessible correspondrien a aquelles que s'han amplificat en major mesura durant la PCR, i, per tant, després de la seqüenciació hi haurà moltes més lectures (*reads*) que s'alineen contra elles. De manera que si es representen els histogrames del nombre d'alineaments de les diferents regions podrem identificar matemàticament les regions accessibles com a pics en l'histograma. Com que aquests canvis que volem estudiar es podrien produir de manera estocàstica i poden ser esdeveniments poc freqüents, analitzarem inicialment les regions detectades a algun dels replicats que hem fet per condició (**figura 11**).

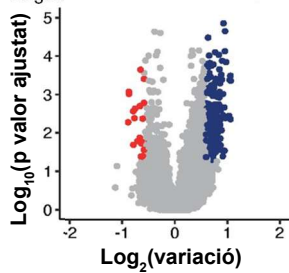
RESULTATS



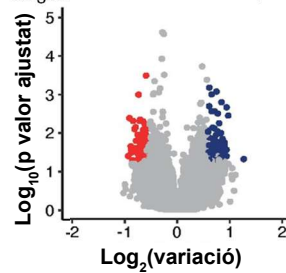
HRmix Vs H
Regions accessibles a totes les mostres



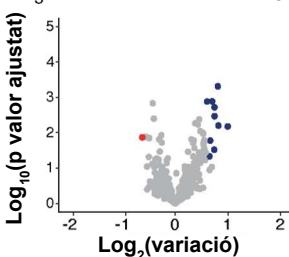
HRmix Vs C
Regions accessibles a totes les mostres



H Vs C
Regions accessibles a totes les mostres



HRmix Vs C
Regions accessibles a HRmix i C



HRmix Vs H
Regions accessibles a HRmix i H

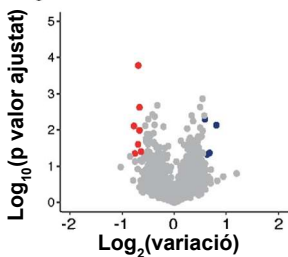


Figura 11. Durant la recuperació de l'estrès replicatiu s'incrementa l'accessibilitat de la cromatina en cèl·lules HCT116. Es mostren el nombre de pics (regions accessibles) detectats en l'histograma agrupats segons la mostra que els conté. Es fa la intersecció de totes les mostres. Es van tenir en compte tots els pics detectats almenys en 1 dels 3 replicats per condició. Els grups que contenen pics que hem analitzat posteriorment es troben acolorits. Vermell: correspon als pics perduts durant la recuperació. Blau: correspon als pics nous que han aparegut durant la recuperació. Negre: pics comuns a totes les mostres o a les dues condicions de recuperació i C o HU. A sota es mostren els *vulcano plot* de les comparacions entre les diferents condicions (només els pics de les interseccions marcades en negre, al subtítol s'indica a quina de les tres correspon). Hem agrupat les dues condicions de la recuperació (HRmix). Per a fer la comparació només hem considerat els pics presents a dues de les rèpliques dels triplicats. En blau: increment de més d'un 50% i p-valor ajustat <0.05. En vermell: reducció de més d'un 30% i p-valor ajustat <0.05. A la filera superior es comparen les condicions dels pics presents a totes les mostres. A la filera de sota hi ha les comparacions dels pics presents només a HRmix i C o HU.

En total vàrem identificar 165315 regions accessibles. Per a cada condició vàrem trobar entre 64975 i 88335 regions amb la cromatina accessible. La condició amb major nombre de regions fou HR i la que en tenia menys va ser HR36 (**figura 11**).

Un cop detectades aquestes regions, ens interessava veure quines havien canviat durant la recuperació (ja sigui en relació al C, a hidroxiurea o a les dues condicions) i la seva localització al genoma. Al tenir en compte totes les regions presents als triplicats, hi ha una variabilitat elevada. Per això per analitzar les noves regions que es tornen accessibles o aquelles en que es perd l'accessibilitat durant la recuperació, vàrem avaluar només les regions comunes a HR i HR36 i que no apareixien a C i H, i a la inversa. Així doncs vàrem poder comprovar com després de la recuperació es van fer accessibles 2576 regions (barra marcada en blau), que són les que no apareixien ni al control ni a la condició tractada només amb hidroxiurea. Per altra banda després de la recuperació de l'estrès replicatiu es va perdre accessibilitat en 3975 regions (barra marcada en vermell) (**figura 11**).

A més d'aquestes regions noves on s'ha guanyat o perdut totalment l'accessibilitat, també es poden produir canvis en l'accessibilitat de regions detectades a totes les condicions. Partint d'aquestes (31514) vàrem comparar els histogrames de cada regió un a un i representar la diferència i la significança en un gràfic conegut com a *volcano plot* (gràfic volcà) (**figura 11**). Només vàrem comparar les regions presents com a mínim a dues rèpliques per condició. Als gràfics podem veure en

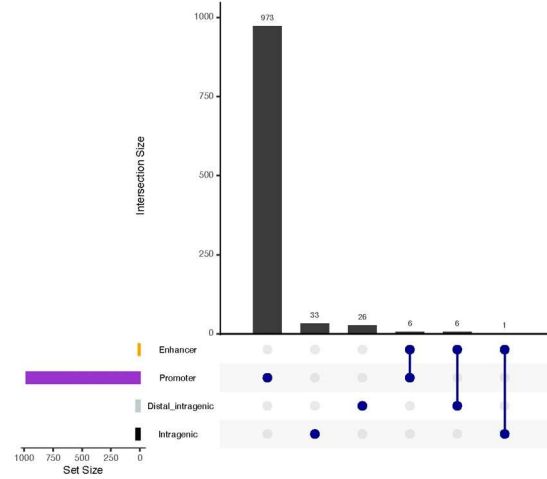
quantas regions es va alterar l'accessibilitat després de la recuperació. Per a facilitar l'anàlisi vàrem agrupar les dues condicions amb la recuperació en una sola, anomenada **HRmix**. Les regions que ens interessaven són les que estan acolorides. Aquestes corresponen a les regions on hi ha una diferència substancial (més d'un 50% d'increment o un decreixement de més del 30%) i significativa (p -valor ajustat < 0.05). En general comparant les condicions que es van recuperar de l'estrès replicatiu amb el control o les tractades només amb hidroxiurea, es pot apreciar com es van produir més increments en l'accessibilitat que reduccions. En canvi, comparant la hidroxiurea amb el control no predominen de manera tan clara els increments en l'accessibilitat sobre les reduccions. També vàrem analitzar les diferències entre les regions accessibles presents a HRmix i C (3878) i les presents només a les condicions tractades amb hidroxiurea (7894), així vàrem obtenir noves regions d'interès (**figura 11**).

Un cop detectades totes les regions d'interès, vàrem analitzar la localització d'aquestes. Vàrem classificar-les segons la seva localització respecte als gens. Així doncs, vàrem distingir tres categories diferents: regions promotores, intragèniques i intergèniques distals. Hem considerat les regions intergèniques com a distals, ja que la regió promotora també conté un fragment que es troba proper al lloc d'inici de la transcripció però fora del gen. De manera que les regions que estaven fora del gen i de la regió promotora les vàrem considerar com a intergèniques distals.

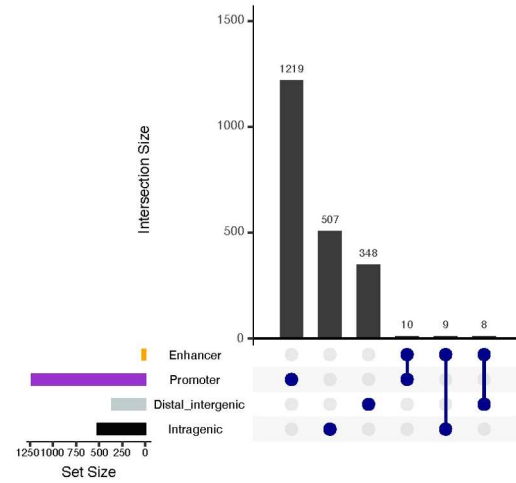
A més a més, també vàrem analitzar la presència d'estimuladors (*enhancers*) coneguts a cada una d'aquestes regions definides.

A la **figura 12**, es pot comprovar com després de l'estrès replicatiu es produeix un augment general en l'accessibilitat, sobretot en les regions detectades en totes les condicions -o totes menys el control o menys hidroxiurea (interseccions marcades en negre a la **figura 11**)- (1045 contra 133) (**figura 12**).

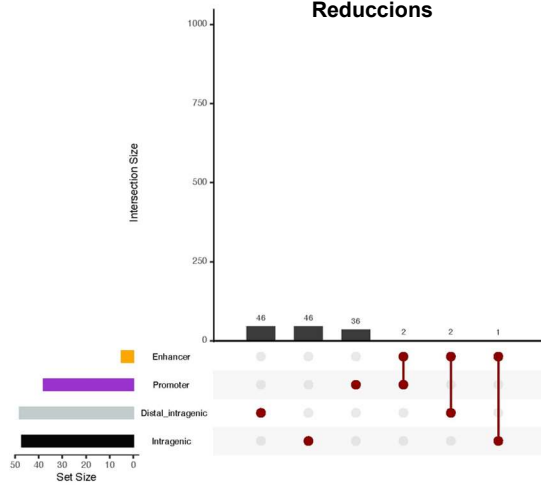
Incrementos



Incrementos i guanys



Reduccions



Reduccions i pèrdues

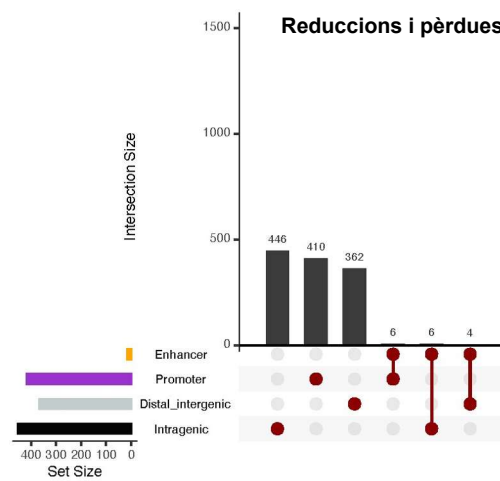


Figura 12. . Durant la recuperació de l'estrès replicatiu s'incrementa l'accessibilitat de la cromatina en regions promotores de gens en cèl·lules HCT116. Es mostra la distribució de les regions d'interès identificades a la figura 11: Aquelles presents a C, HU i HRmix; C i HRmix; HU i HRmix que distribuïm en increments i reduccions segons la variació en l'accessibilitat; Aquelles presents només a HRmix que definim com a guanys; Aquelles presents a C i HU que definim com a pèrdues. Es distribueixen en: regions promotores, intragèniques, i intergèniques distals. Si alguna d'aquestes regions conté un estimulador es considera com a grup diferent. Les barres de la esquerra mostren la suma de cada una de les tres regions en total (considerant amb estimulador i sense), en el cas de les regions estimuladores hi ha la suma de totes elles.

Si només tenim en compte les regions on s'han produït diferències en l'accessibilitat es pot veure com l'increment es produeix pràcticament en la seva totalitat en regions promotores. En canvi les regions noves que es fan accessibles durant la recuperació aquesta dominància de regions promotores respecte a les altres no va succeir (**figura 12**).

Com que prèviament vàrem identificar al gen de CK20 com a gen que canviava la seva expressió durant la recuperació a l'estrès replicatiu en algunes cèl·lules, vàrem comprovar l'accessibilitat de la regió que conté el gen.

En cap de les condicions estudiades va haver-hi variacions en l'accessibilitat en el promotor del gen de CK20 (regió marcada en vermell). No obstant la regió marcada en taronja conté un estimulador del gen de CK20 i aquesta regió sí que es torna més accessible durant la recuperació. La regió groga també es torna més accessible durant la recuperació, però en aquest cas correspon a un estimulador del gen de la proteïna CK23.

Just a dalt de les comparatives (histogrames derivats de la resta de dues condicions), es poden veure els pics detectats per l'algoritme que hem utilitzat. En aquesta regió només ha identificat com a pic i per tant com a regió accessible, la de l'estimulador de la CK-23, no del de la CK-20 (**figura 13**). Això pot ocórrer perquè aquestes dues regions estan properes i només ha detectat la més gran, ja que l'algoritme té en compte les regions del voltant. Això implica que hi ha més regions que no hem detectat amb el nostre anàlisi que després d'un estrès replicatiu sever canvia la seva accessibilitat de la cromatina en algunes cèl·lules. A més a més, és important destacar que en el cas de la regió de CK-20

aquesta obertura comporta la expressió de la proteïna, que en les cèl·lules HCT116 no s'expressa.

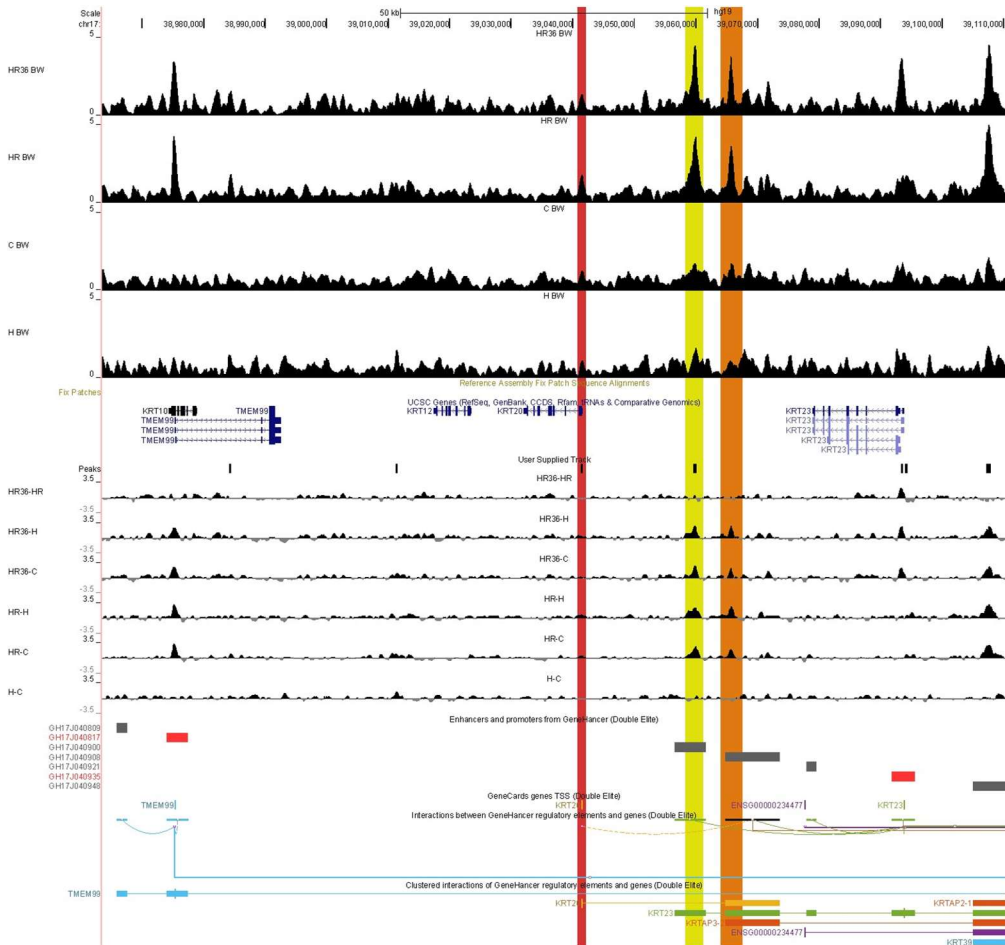


Figura 13. Durant la recuperació de l'estrès replicatiu s'incrementa l'accessibilitat en la regió estimuladora del gen de CK20 en cèl·lules HCT116. Es mostren els histogrames dels alineaments de les 4 condicions al *Genome Browser*. A l'histograma es representa la mitjana dels 3 replicats per condició (3n). A sota hi ha la referència dels gens presents a aquesta regió del genoma. De cada condició hi ha la resta dels histogrames tal com s'indica a l'esquerra. Finalment es mostren els elements reguladors que consten a la base de dades *GeneHancer*. Vermell: Inici de la transcripció del gen de CK20. Groc: regió estimuladora del gen de CK23. Taronja: regió estimuladora del gen CK20.

En resum, en aquest capítol hem pogut comprovar com durant la recuperació d'un l'estrès replicatiu sever les cèl·lules HCT116 activen nous orígens de replicació a nous dominis de replicació. També es produeixen canvis generals a nivell de l'accessibilitat global de la

RESULTATS

cromatina i aquesta presenta més regions obertes. En el cas concret del gen CK20 es produeix un increment en l'accessibilitat de la cromatina en la regió promotora derivant en l'expressió d'aquesta proteïna que en cèl·lules HCT116 no s'expressa.

DISCUSSIÓ

Un ésser humà al llarg de la seva vida sintetitza aproximadament $2 \cdot 10^{16}$ metres de DNA. Aquesta longitud equival a 130000 vegades la distància que hi ha entre la terra i el sol ¹⁹⁵. A més a més, Vogelstein *et. al.* han trobat correlacions entre el risc de desenvolupar un càncer en un teixit i la quantitat de divisions de les seves cèl·lules per mantenir-ne l'homeòstasi. En aquest treball proposen com a causa principal de la formació de tumors els errors que es produeixen durant la replicació ⁵⁷³. En conseqüència, el funcionament adequat dels mecanismes de protecció durant la replicació és fonamental en la protecció contra el càncer. Per una banda l'estrès replicatiu s'ha vinculat a la inducció de mutacions i alteracions en el genoma. Per l'altra alteracions que deriven en l'augment de l'expressió d'oncogens indueixen més estrès replicatiu. De manera que durant la tumorigènesi l'eix estrès replicatiu-mutacions es retroalimenta per afavorir-la.

Les cèl·lules tumorals adquireixen mutacions o alteracions epigenètiques que permeten que escapin dels mecanismes de control o checkpoints del cicle cel·lular. En tumors, la resposta a l'estrès replicatiu sovint es troba modificada per poder fer front a l'estrès replicatiu basal. És important destacar que les cèl·lules no tumorals no tenen aquests nivells elevats d'estrès durant la replicació. Aquest estrès replicatiu i alteració de la resposta incrementa la inestabilitat genòmica, tret característic del càncer. No obstant això, les mutacions de proteïnes de la via de senyalització que s'activa per fer front a l'estrès replicatiu es troben per sota d'ATR i Chk1. No només la incidència de mutacions en aquestes dues proteïnes és molt baixa, sinó que sovint es troben sobreexpressades ^{155,380}. A més a més, ATR i Chk1 no només actuen durant l'estrès replicatiu. Els nivells baixos d'aquestes proteïnes que hi ha durant la replicació regulen el progrés d'aquesta. De fet, fins que no s'inactiva completament ATR en acabar la replicació, la cèl·lula no entra en fase G2 ^{574,575}.

Al nostre grup estam molt interessats a caracteritzar i identificar els elements d'aquesta resposta a l'estrès replicatiu per a conèixer amb més detall com les cèl·lules tumorals es fan resistents. Així en un futur es poden trobar noves estratègies terapèutiques basades en aquesta

DISCUSSIÓ

resistència que desenvolupen les cèl·lules tumorals. L'objectiu final és millorar l'eficiència de tractaments enfocats a generar estrès replicatiu o aprofitar l'estrès replicatiu basal per poder fer tractaments més específics contra les cèl·lules tumorals.

1. OZF MANTÉ LA VELOCITAT DE PROGRESSIÓ DE LA FORQUETA EN CONDICIONS D'ESTRÈS REPLICATIU

La claspina és un component del replisoma implicat en la progressió de la forqueta, la resposta a l'estrès replicatiu i la reparació del dany al DNA. Funciona com a bastida i té la capacitat d'interaccionar amb moltes proteïnes; per tant, el nostre grup estava interessat a trobar més proteïnes que interaccionessin amb la claspina. De totes elles OZF va ser la proteïna més interessant, atès el poc coneixement que es tenia sobre la seva funció.

OZF és una proteïna que s'expressa en gairebé tots els teixits (segons l'*Human Protein Atlas* ⁵⁷⁶), i malgrat això es sap poc sobre la seva funció. El fet que estigui formada per pràcticament només 10 dominis dit de zinc (d'aquí el seu nom *Only Zinc Finger*) fa que per a les funcions que pugui tenir sigui important la interacció amb alguna altre proteïna ^{577,578}. El fet que interaccionés amb la claspina obria un ventall de possibles funcions dintre de la replicació i la resposta a l'estrès replicatiu.

Per començar es va veure com OZF no només interacciona amb claspina, sinó que està present a les forquetes de replicació actives. A més a més també interacciona amb diversos components del replisoma com Mcm2, Mcm6 o Cdc45 ⁴⁴⁷. No obstant això, OZF no sembla que tingui un paper important durant la replicació en condicions normals, ja que la seva eliminació no comporta cap efecte sobre la velocitat de progressió de la forqueta ni sobre la dinàmica de replicació.

En canvi, OZF sí que és rellevant en condicions d'estrès replicatiu. Així doncs, la seva depleció en cèl·lules hTERT-RPE sota estrès replicatiu fa que es redueixi la velocitat de progressió de la forqueta. Aquesta funció d'OZF no depèn del *checkpoint* de replicació, ja que en aquestes mateixes cèl·lules, en condicions d'estrès replicatiu molt lleuger, on no hi ha activació del *checkpoint*, la depleció d'OZF també redueix la velocitat de la forqueta.

La claspina és necessària per l'activació i manteniment del *checkpoint* de replicació, ja que, per una banda, la seva absència fa que els nivells de P-Chk1 siguin baixos i, per l'altra, sigui necessària la seva degradació per a la desactivació del *checkpoint* ⁴⁴². Hi ha proteïnes com And-1, que formen part del replisoma, interaccionen amb la claspina i s'ha descrit que la seva depleció en cèl·lules HCT116 redueix la quantitat de Chk1 fosforilada en resposta a un tractament amb hidroximetilurea ⁵⁷⁹. En canvi, tot i interaccionar amb claspina i estar present a la forqueta, OZF no sembla que intervingui en l'activació del *checkpoint* ja que pel que hem pogut comprovar, la depleció d'OZF en resposta a estrès replicatiu no impedeix o redueix de manera notable la fosforilació de Chk1 en cèl·lules no transformades. Tot i que també podria ser que amb els nivells residuals que quedessin d'OZF fos suficient.

La quinasa que forma part del complex DDK (Cdc7), també interacciona amb la claspina. A part de que en l'activació del *checkpoint* de replicació Cdc7 pot fosforilar la claspina per tal que interaccioni amb Chk1, també s'ha descrit que per a l'inici de la replicació, la claspina recluta a Cdc7 ⁵⁸⁰⁻⁵⁸². En aquest rol de la claspina en l'activació dels orígens, OZF tampoc intervé, ja que en els experiments de DNA *fiber assay* fets tant en hTERT-RPE, HCT116, DLD-1 o SW480, la depleció d'OZF no produeix diferències en l'activació de nous orígens. A més a més, analitzant els nivells de la fosforilació de Mcm2 (Ser 40), que està mediada per les DDK ²²⁷, la depleció d'OZF no va reduir de manera clara la quantitat d'aquesta en cap de les línies cel·lulars utilitzades.

OZF es pot modificar post-traduccionament, ja que interacciona amb UBC9, que és un enzim que afegeix covalentment a SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier 1*) ⁵⁸³. També interacciona amb hRap1, una proteïna present al telòmer, de manera que s'ha relacionat amb el manteniment d'aquests ⁵⁸⁴. Un estudi recent mostra com OZF es pot unir a LINE-1. Malgrat això, la seva depleció no promou la transcripció dels dos transcrits codificats als LINE-1, ni comporta canvis substancials en el transcriptoma. No obstant això, no es descarta que pugui intervenir en la regulació de la cromatina en regions riques en

seqüències de LINE-1 o que pugui estar implicat en l'embriogènesi, ja que es creu que LINE-1 pot intervenir en la regulació de l'accessibilitat de la cromatina durant aquesta etapa ^{585,586}.

És una proteïna que sovint està sobreexpressada en càncer pancreàtic ⁵⁸⁷, gàstric ⁵⁸⁸ i colorectal ⁵⁸⁹. En les 3 línies cel·lulars de càncer colorectal que hem utilitzat l'expressió d'OZF és major que en les cèl·lules no tumorals (hTERT-RPE). Ens interessava utilitzar com a model aquestes 3 línies perquè tenen un estrès replicatiu basal. En les cèl·lules HCT116, DLD-1 i SW480 OZF és important per a la progressió de la forqueta de replicació, tal com succeeix amb les cèl·lules hTERT-RPE en condicions d'estrès replicatiu,

Aquests resultats són interessants si tenim en compte que OZF és una diana del factor de transcripció c-Myc ⁵⁹⁰. Com que la sobreexpressió de c-Myc genera estrès replicatiu ¹⁸⁷, OZF podria tenir un paper important per mantenir la replicació en aquestes condicions i protegir el genoma. No obstant això, en els nostres models l'eliminació d'OZF en cèl·lules que tenen estrès replicatiu no té efectes sobre la viabilitat pel que fa als clonogènics. Tant en HCT116 en condicions control, com en hTERT-RPE amb estrès replicatiu induït amb hidroxiiurea, la depleció d'OZF no altera la capacitat de les cèl·lules per formar colònies. A més a més, la reducció de la velocitat de la forqueta tampoc incrementa el dany al DNA, ja que ni en HCT116 ni en DLD-1 hi ha un augment de marcadors de dany (γ H2AX o 53BP1).

Posteriorment, altres grups també han avaluat els efectes de la depleció d'OZF. Per exemple en cèl·lules HEK 293 no hi ha canvis sobre el creixement ni la morfologia, tot i que cal tenir en compte que aquestes cèl·lules són embrionàries de ronyó ⁵⁸⁵. En canvi en MKN-45 (càncer gàstric) la depleció d'OZF sí que redueix la velocitat de creixement, la capacitat de formar colònies, la capacitat d'invasió i augmenta lleugerament l'apoptosi ⁵⁸⁸.

A més a més aquest últim estudi associa l'expressió d'un RNA no codificant circular (circPIP5K1A) i tumors de pacients de càncer gàstric amb un diàmetre gran, en estadi avançat i amb metàstasis distals.

Aquest RNA no codificant actua com a diana del micro RNA miR-376c-3p, que inhibeix la traducció del missatger OZF. De manera que nivells elevats de l'RNA no codificant circular incrementen els nivells d'OZF i afavoreixen la progressió del tumor ⁵⁸⁸. També s'ha vist un fenomen semblant amb l'RNA no codificant KCNQ10. Aquest es troba altament expressat en càncer colorectal i actua de la mateixa manera que el circular descrit abans, però uneix un altre miRNA (miR-216b-5p), que també interacciona específicament amb el missatger d'OZF. En aquest cas no han estudiat directament els efectes de la depleció d'OZF, però han vist com en cèl·lules de càncer de colon LoVo i SW480 la reducció dels nivells d'OZF per l'eliminació de KCNQ10T o la sobreexpressió del miRNA (miR-216b-5p) redueix el creixement cel·lular i la capacitat de formar colònies ⁵⁹¹. En els nostres models (HCT116 i DLD-1) no hem observat aquesta reducció en la viabilitat, probablement perquè no depenguin tant d'OZF o perquè hem utilitzat una tècnica diferent per reduir la quantitat d'OZF i els nivells basals siguin suficients.

De manera que en tumors hi ha diverses estratègies per incrementar els nivells d'OZF, que pot estar relacionat amb la tumorigènesi i ser una proteïna important per mantenir el creixement de determinats tumors.

2. RAD51 MANTÉ LA PROGRESSIÓ DE LA REPLICACIÓ EN RESPOSTA A L'ESTRÈS REPLICATIU

RAD51 és una proteïna essencial pel manteniment de genomes grans com l'humà. De fet, en ratolins genoanul·lats en RAD51 es produeix la mort en estat embrionari ⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹. En cèl·lules U2OS RAD51 es va relacionar amb el reinici de les forquetes després d'un estrès replicatiu provocat pel tractament de 2h amb 2mM d'hidroxiurea ⁴⁹⁴. En el nostre laboratori ens hem volgut centrar en el paper de RAD51 durant la fase S en cèl·lules tumorals i no tumorals. En treballs previs hem observat com en cèl·lules no tumorals, RAD51 es manté a la forqueta després d'un estrès replicatiu agut ⁴⁹⁶. Tot i ser-hi, gràcies als experiments de DNA fiber assay, hem pogut comprovar com no afecta el reinici de les forquetes ⁴⁹⁹. No obstant això, igual que succeeix amb OZF, RAD51 és important per a la progressió de la forqueta de replicació en condicions d'estrès replicatiu.

Com que aquests resultats s'han obtingut utilitzant l'inhibidor B02 ⁴⁹⁷, es pot dir que és la inhibició de la formació del filament nucleoproteic de RAD51 o la seva activitat d'intercanvi de cadenes, la responsable de la disminució de la velocitat de progressió de la forqueta en condicions d'estrès replicatiu. A més a més, hem vist com en cèl·lules HCT116 RAD51 és important per mantenir la velocitat de progressió de la forqueta en condicions control on només hi ha l'estrès replicatiu basal.

RAD51 s'expressa en teixits amb cèl·lules que es divideixen activament ^{576,592}. En diversos tipus de tumors RAD51 es troba sobreexpressat ⁵⁹³. Aquest fet està associat a un pitjor pronòstic i una major resistència a tractaments que generen dany al DNA ^{592,594-598}. La sobreexpressió de RAD51 promou una hiperactivació de la recombinació homòloga que produeix un increment de la inestabilitat genòmica ⁵⁹⁹. A més a més, amb estrès replicatiu l'increment de BIR pot conduir a reordenaments cromosòmics. ^{374,379}

En mostres de pacients de càncer colorectal sovint hi ha una expressió elevada de RAD51 comparat amb teixit no tumoral ^{592,593}. En les línies cel·lulars de càncer colorectal que hem utilitzat (HCT116 i DLD-1) hi ha

una expressió de RAD51 major que en les cèl·lules hTERT-RPE. Per tant com que aquestes cèl·lules tenen més estrès replicatiu i més expressió de RAD51, estàvem interessats a estudiar l'efecte de la inhibició de RAD51 en la replicació d'aquestes cèl·lules.

Tal com hem comprovat per citometria, el fet que les forquetes de replicació avancin de manera més lenta en les cèl·lules tumorals retarda la progressió de la fase S. En assajos de clonogenicitat hem vist com la capacitat de formar colònies de les HCT116 es redueix amb un tractament amb B02. No obstant això, en cèl·lules hTERT-RPE el tractament amb B02 també redueix la viabilitat. Com que les cèl·lules hTERT-RPE no tenen estrès replicatiu basal, probablement aquesta reducció de la viabilitat no estigui lligada a la disminució de la progressió de la forqueta en condicions d'estrès replicatiu. Com que per fer l'assaig de clonogenicitat hem utilitzat cèl·lules asincròniques, la inhibició de RAD51 s'ha fet en algunes cèl·lules en fase S i en altres que estaven en altres fases del cicle. Per tant, en cèl·lules amb estrès replicatiu aquest retard en la progressió de la fase S pot fer que tinguin un creixement més lent, però no necessàriament afecta la viabilitat cel·lular. La reducció en la viabilitat pot estar més relacionada amb el paper de RAD51 durant la fase G2. En experiments anteriors fets al laboratori amb hTERT-RPE, es va comprovar per citometria com tant amb l'ús d'un siRNA contra RAD51, com amb un tractament amb B02, part de les cèl·lules (20% respecte al control) s'acumulaven en fase G2⁴⁹⁹. Altres grups també han descrit que en cèl·lules embrionàries de ratolí (mESC) o de limfoma de gallina (DT-40) RAD51 és important per a l'entrada en mitosi, ja que durant la G2 pot resoldre estructures de DNA conflictives derivades de la replicació. L'eliminació de RAD51 provoca un augment de cèl·lules que romanen parades en G2^{600,601}. A més a més, en cèl·lules embrionàries de ratolí la pèrdua de RAD51 tampoc afecta la progressió de la forqueta, tal com succeeix amb les cèl·lules hTERT-RPE⁶⁰¹.

El tractament amb B02 tampoc produeix un increment en l'activació del checkpoint de replicació en cèl·lules en fase S. Ho hem comprovat analitzant els nivells de P-Chk1 tant en cèl·lules hTERT-RPE

sincronitzades en fase S i tractades amb diferents dosis d'hidroxiurea (0.1mM, 1mM i 10mM), com en HCT116 amb l'estrès replicatiu basal.

En canvi, en cèl·lules HCT116 en fase S, el tractament amb B02 incrementa la quantitat de γ H2AX. No obstant això, en eliminar el B02 els nivells d'aquesta proteïna es redueixen. Per immunofluorescència s'ha confirmat l'augment de γ H2AX en les cèl·lules HCT116 i DLD-1 que han estat replicant el DNA durant les 4 hores de tractament amb B02.

L'increment en γ H2AX no necessàriament implica dany al DNA. Aquest també pot incrementar amb ssDNA, ja que ATR també fosforila a la histona H2AX ^{498,602}. Per això vàrem comprovar un altre marcador de dany com és 53BP1 ⁶⁰³. En aquest cas el tractament amb B02 no va variar els nivells de 53BP1 ni en HCT116, ni en DLD-1. Per tant, tot indicaria que la inhibició de RAD51 en cèl·lules que estan replicant en condicions d'estrès replicatiu produeix un increment de ssDNA però no de dany al DNA. Malgrat això, no vàrem detectar ssDNA per immunofluorescència utilitzant BrdU. Això implica que els fragments de ssDNA que es podrien formar no són molt llargs i per això no els podem detectar per immunofluorescència amb BrdU.

Un estudi recent del grup de Shammass mostra com en condicions control en cèl·lules HCT116 i OE19 (adenocarcinoma esofàgic) la depleció o inhibició de RAD51 redueix els nivells de γ H2AX ⁵⁹³. Tot i semblar contradictoris amb els nostres resultats, realment les condicions dels dos estudis són diferents. Per una banda nosaltres hem estudiat la inhibició de RAD51 només en les cèl·lules que estan replicant, mentre que Shammass *et. al.* utilitzen cèl·lules asincròniques, de manera que no només estan afectant les cèl·lules en fase S. Per altra banda la inhibició de RAD51 és diferent, amb el B02 nosaltres només inhibim la formació del filament nucleoproteic de RAD51 i l'activitat d'intercanvi de cadenes, mentre que en aquest treball utilitzen un siRNA i un inhibidor (RI-1) que s'uneix covalentment a RAD51 ⁶⁰⁴. Hi ha funcions de RAD51 com la inducció de la regressió de la forqueta que no depenen de la formació d'un nucleofilament de RAD51 estable ³¹⁷, per tant pot ser que amb B02 o amb RI-1 no s'estan inhibint les mateixes funcions de RAD51. Un altre tret interessant del treball de

Shammas *et. al.* és que en afegir l'inhibidor de RAD51 a un tractament amb camptotecina redueix encara més la viabilitat cel·lular, però no incrementa la inestabilitat genòmica, com si que ho fa el tractament només amb camptotecina. Per tant amb tractaments que generen dany al DNA la inhibició de RAD51 pot sensibilitzar les cèl·lules a aquest tractament i evitar el seu paper a l'increment de la inestabilitat genòmica

593

En *Xenopus laevis* el grup de Constanzo ha descrit com en condicions d'estrès replicatiu provocat amb afidicolina RAD51 és necessària per evitar que es formin fragments de ssDNA. A més a més, RAD51 interacciona directament amb la polimerasa α promovent el seu reclutament a les forquetes parades i evitar la formació dels fragments de ssDNA. Per una banda, la unió es dona en un domini de la polimerasa α molt conservat en eucariotes; i, per altra, per aquest reclutament cal la formació del filament nucleoproteic de RAD51³⁰³. En el nostre treball hem pogut comprovar com en cèl·lules HCT116 el tractament amb B02 redueix la unió de la polimerasa α a la cromatina. Els resultats de Constanzo *et. al.* encaixen amb els nostres, ja que les cèl·lules HCT116 repliquen amb un estrès replicatiu basal i per tant poden necessitar a RAD51 per a reclutar la polimerasa α a les forquetes que s'hagin parat. El fet de no poder-la reclutar a aquells llocs podria generar uns fragments de ssDNA petits però suficients per incrementar els nivells de γ H2AX. En el treball del grup de Constanzo³⁰³ varen utilitzar microscòpia electrònica per detectar els fragments amb ssDNA i, en el nostre cas, amb immunofluorescència no tenim tant poder de resolució, però sí que detectem un increment de γ H2AX i no de 53BP1.

A més a més, la reducció de la unió de la polimerasa α a la cromatina amb la inhibició de RAD51 només es dona en condicions d'estrès replicatiu, ja que en les hTERT-RPE no succeeix en condicions control. En canvi si el tractament amb B02 en hTERT-RPE es fa després d'un estrès replicatiu agut, sí que es redueix la quantitat de polimerasa α unida a la cromatina. Aquesta disminució no es produeix per la implicació que pugui tenir RAD51 en el reinici de la replicació, ja que si

s'inhibeix RAD51 un cop reiniciada la replicació, la quantitat de polimerasa α en cromatina disminueix igual.

En vista dels resultats obtinguts, el que nosaltres proposem és que la polimerasa α és necessària per reiniciar la replicació en condicions d'estrès replicatiu. RAD51 afavoreix la interacció entre la cromatina i la polimerasa α , i en cas de no poder-se donar aquesta interacció, queden regions de DNA sense replicar.

3. LA INHIBICIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE NOUS ORÍGENS DE REPLICACIÓ DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER Frena la recuperació en cèl·lules HCT116

Les cèl·lules no transformades quan pateixen un estrès replicatiu massa gran com per poder mantenir la integritat del genoma, entren en senescència ⁶⁰⁵. Aquesta resposta actua com una barrera contra la tumorigènesi. De fet l'activació d'oncogens indueix estrès replicatiu i fa que les cèl·lules es tornin senescentes per un procés anomenat senescència induïda per oncogens ⁶⁰⁶. Prèviament el nostre grup va identificar a APC/C^{Cdh1} com a element d'aquesta barrera contra la tumorigènesi, que s'activa en fase S en resposta a un estrès replicatiu prolongat, i que inhibeix la recuperació de les cèl·lules ⁵⁰⁶. Recordem que per que es pugui iniciar la replicació i s'activin els orígens de replicació, s'ha d'inhibir APC/C^{Cdh1} ⁷⁰. De manera que durant un estrès replicatiu sever en cèl·lules no tumorals, l'activació d'APC/C^{Cdh1} fa que es degradi la ciclina A, i per tant que no es puguin activar nous orígens i la cèl·lula no pugui reiniciar la replicació després de l'estrès ⁵⁰⁶.

Contràriament les cèl·lules tumorals sotmeses a estrès replicatiu sever amb 10mM d'hidroxiurea no activen APC/C^{Cdh1} i són capaces de recuperar-se per activació de nous orígens. En els experiments fets per *DNA fiber assay* es veu com en cèl·lules HCT116, després d'un estrès replicatiu sever hi ha un increment de les forquetes que queden parades i un augment de l'activació de nous orígens. En canvi, en cèl·lules hTERT-RPE, també hi ha aquest augment de forquetes parades, però no es produeix l'activació de nous orígens.

Aquests resultats també s'obtenen amb gemcitabina, que igual que la hidroxiurea inhibeix la síntesi de nucleòtids. Les cèl·lules HCT116 finalitzen la replicació i progressen en el cicle, mentre que més de la meitat de les hTERT-RPE no acaben la replicació i la majoria no progressa en el cicle. En el cas de les hTERT-RPE s'activa APC/C^{Cdh1} durant el tractament amb gemcitabina mentre que en les HCT116 roman inactiu. En aquest cas amb gemcitabina es produeix l'activació

d'APC/C^{Cdh1} abans que amb la hidroxiurea (10mM). Això es pot produir perquè els dos inhibidors actuen de mode diferent: la gemcitabina inhibeix la timidilat sintasa i la ribonucleòtid reductasa, mentre que la hidroxiurea només la ribonucleòtid reductasa ⁶⁰⁷. Per tant sembla que depenent de la magnitud de l'estrès l'activació d'APC/C^{Cdh1} es produirà abans o després. Això quadra amb el fet que reduint la dosi d'hidroxiurea a 2mM fins les 22-24 hores no s'activa APC/C^{Cdh1} i per tant a les 14 hores les cèl·lules hTERT-RPE encara es poden recuperar de l'estrès produït, mentre que a les 24 activen APC/C^{Cdh1} i s'inhibeix la seva recuperació.

Per superar aquesta barrera contra la tumorigènesi, les cèl·lules tumorals han pogut desenvolupar diversos mecanismes per reduir l'activitat d'APC/C^{Cdh1}. De fet s'ha descrit que les proteïnes diana d'aquesta E-3 ubiquitina ligasa sovint estan sobreexpressades en tumors, suggerint una activitat APC/C^{Cdh1} baixa ⁶⁰⁸. A més a més, la reducció de l'activitat d'APC/C^{Cdh1} també avança l'entrada de les cèl·lules en fase S, fet que pot incrementar l'estrès replicatiu ⁶⁰⁹.

Per una banda s'han descrit directament mutacions en subunitats importants del complex en càncer colorectal, de mama o de fetge ⁶¹⁰⁻⁶¹². Per altra banda, hi ha elements reguladors que estan alterats. Per exemple un dels punts importants per a la inactivació d'APC/C^{Cdh1} és l'activació dels gens transcrits per Rb, entre ells trobem inhibidors d'APC/C^{Cdh1} com Emi1. En diversos tumors s'han descrit alteracions en la via de Rb i sobreexpressió d'Emi1 ⁶⁰⁹. De fet el grup de Duijf ha comprovat que la majoria de tumors sòlids tenen nivells elevats d'Emi1 i que a més la seva sobreexpressió té un paper actiu en la tumorigènesi i produeix inestabilitat cromosòmica ⁶¹³. Curiosament no s'han trobat mutacions o amplificacions en el gen que codifica per Emi1, així que es pressuposa que aquest increment en la expressió ve per part d'un augment de l'expressió en gens de la via d'E2F ⁶¹³. També s'ha descrit en tumors una alteració dels nivells de Cdc20 i Cdh1, les dues subunitats que s'encarreguen del reconeixement dels substrats. Mentre que Cdc20 es sol trobar sobreexpressat, hi ha més variació en els nivells de Cdh1 ^{609,612}. Per una banda s'ha trobat que en melanomes ⁶¹⁴,

o en tumors agressius de mama ⁶¹⁵, o colòrectals ⁶¹⁶ estan reduïts. La reducció dels nivells de Cdh1 provoca un escurçament de la fase G1 fent que la cèl·lula entri en fase S amb unes reserves de nucleòtids insuficients ⁶¹⁷. Per altra banda s'ha descrit que sovint els nivells de Cdh1 es troben elevats juntament amb els d'Emi1, això es deu a que com que Cdh1 també es degrada per APC/C, la reducció de l'activitat d'APC/C augmenta els nivells de Cdh1 ^{618,619}. A més a més, en molts tumors l'activitat de la quinasa Akt és elevada. S'ha descrit que Akt fosforila a la ciclina F promovent així la degradació de Cdh1 pel complex SCF^{Ciclina F} ^{620,621}.

A banda d'això en tumors també s'han descrit alteracions en el nivell de deubiquitinases (DUB), com per exemple Cezanne que és una DUB que antagonitza APC/C^{Cdh1}, i sovint es troba el seu gen amplificat i la proteïna sobreexpressada ⁶²².

Així doncs, les cèl·lules tumorals tenen moltes estratègies per reduir l'activitat d'APC/C^{Cdh1}. Com que uns dels efectes de l'activació d'APC/C^{Cdh1} durant un estrès replicatiu sever és la inhibició de nous orígens, varem utilitzar inhibidors de nous orígens de replicació per inhibir la recuperació en cèl·lules tumorals.

Les fosforilacions que fa CDK2 en components del replisoma són un esdeveniment clau per a l'activació d'orígens de replicació. Per això hem utilitzat inhibidors de CDK2 (roscovitina i *CDK2 inhibitor II*) per tal d'inhibir l'activació de nous orígens. Per DNA *fiber assay* s'ha corroborat la inhibició, tot i que cap de les dosi que hem utilitzat tenia una inhibició del 100%.

En cèl·lules HCT116, a l'afegir un inhibidor de nous orígens després d'un estrès replicatiu sever es redueix la viabilitat. Tant amb roscovitina com amb *CDK2 inhibitor II* s'augmenta la reducció de viabilitat que fa la hidroxiurea, també a dosis on els inhibidors no tenien cap efecte per si sols. En el cas de la gemcitabina només l'hem combinada amb roscovitina i també es produeix una reducció de la viabilitat major amb la combinació. Per analitzar la viabilitat hem fet un assaig de clonogenicitat perquè volíem veure com s'afectava les cèl·lules que

havien superat el tractament (la mortalitat la vàrem analitzar posteriorment amb els experiments d'anexina V).

S'ha de tenir en compte que en aquests experiments no hem sincronitzat les cèl·lules (per no induir un dany previ), així que només les cèl·lules que estaven al principi del tractament en fase S hauran patit un estrès replicatiu sever, ja que la resta per patir l'estrès, primer han hagut d'entrar en fase S i això redueix el temps de tractament. No obstant això, s'observen diferències amb la combinació respecte al tractament amb hidroxiurea o gemcitabina sol. A més a més, algunes combinacions tenen efectes sinèrgics. Aquest fet és important, ja que al utilitzar inhibidors de CDK2 no només estam afectant l'activació de nous orígens, per això ens interessava utilitzar una dosi a la que l'inhibidor no tingués molt efecte sobre la viabilitat per si sol.

Si comparem els inhibidors entre ells, la roscovitina afecta més a la viabilitat que el CDK2 inhibitor II. Això és esperable, ja que mentre que el CDK2 Inhibitor II només inhibeix a CDK2, la roscovitina inhibeix a CDK2 i CDK1. És interessant destacar que CDK1 és l'única de les CDK imprescindible per a la cèl·lula. És a dir, tot i que cada CDK té la seva funció, CDK1 és l'única que és capaç de substituir la resta i coordinar ella sola la progressió en el cicle. No obstant això, s'ha descrit que alguns tumors sí són dependents d'altres CDK a més de la CDK1. Aquest fet s'està explotant com a diana terapèutica, i així tenir més especificitat sobre les cèl·lules tumorals, ja que les no transformades generalment poden mantenir-se només amb CDK1 ^{21,22}.

El grup d'Alexandrow utilitzant un siRNA per reduir el nivell de Mcm va aconseguir sensibilitzar cèl·lules de càncer pancreàtic (Panc 1) a tractaments que generen estrès replicatiu per depleció de nucleòtids com gemcitabina o 5-fluorouracil ⁶²³. En el seu cas també varen estudiar la viabilitat per assajos de clonogenicitat. La disminució del nivell de MCM afecta la quantitat d'orígens de suport disponibles, que són els que s'activen per a recuperar la replicació durant un estrès replicatiu ⁶²³.

Analitzant només la recuperació de la replicació (per citometria de flux) es pot veure com el fet d'inhibir l'activació de nous orígens retarda o

impedeix el reinici de la replicació, ja que durant les 12 hores de recuperació, bona part de les cèl·lules no són capaces de finalitzar la replicació. Sobretot després d'un estrès replicatiu generat amb 10mM d'hidroxiurea, que és la dosi on les cèl·lules són més dependents de l'activació de nous orígens. De manera que s'aconsegueix que les cèl·lules tumorals responguin de manera semblant a les no transformades.

No obstant això, la implicació sobre la viabilitat d'aquest impediment o retard en la recuperació de la replicació no és tan gran, almenys si l'avaluem per assajos de clonogenicitat. Això es pot deure al fet que en el cas dels experiments de citometria només hem analitzat les cèl·lules que han estat les 14 hores amb l'estrès replicatiu en comptes de la població general. Això implica que l'estrès replicatiu només haurà estat sever en una part de la població, i la resta en reduir la quantitat de temps que han estat amb hidroxiurea potser no depenen tant de l'activació de nous orígens. A més a més, abans de replantar per fer els assajos de clonogenicitat, hem eliminat l'inhibidor (roscovitina o *CDK2 inhibitor II*) i incubat les cèl·lules amb medi durant 8 hores. De manera que en treure l'inhibidor les cèl·lules poden activar nous orígens i recuperar-se. Amb la prova que hem fet amb el *CDK2 inhibitor II* a temps llargs, hem pogut comprovar com al treure l'inhibidor a les 12 hores de recuperació després de l'estrès replicatiu sever, les cèl·lules acceleren la recuperació i repliquen més ràpidament que en les que es manté l'inhibidor.

També hi ha diferències entre els inhibidors utilitzats, ja que en afegir roscovitina (10µm i 15µm) després d'un tractament amb 1mM i 2mM d'hidroxiurea, ja es produeix una petita disminució en la població que finalitza la replicació; mentre que en el cas de *CDK2 inhibitor II* això no succeeix. Aquests resultats poden semblar estranys, si tenim en compte que amb les dosis d'inhibidors utilitzades, el *CDK2 inhibitor II* produeix una major inhibició de l'activació de nous orígens si el comparem amb la roscovitina (*DNA fibre assay*). Per tant esperaríem veure l'efecte invers. Això es deu possiblement a que en aquestes condicions d'estrès

replicatiu l'activació de nous orígens no juga un paper tan important com amb 5mM i 10mM.

En aquesta línia hem comprovat com en cèl·lules hTERT-RPE després de 14 hores de tractament amb 2mM d'hidroxiurea poden recuperar la replicació perquè no s'activa APC/C^{Cdh1}, però sí a les 24 hores; així que podria tractar-se de la major inhibició de les CDK que fa la roscovitina a diferència del CDK2 *inhibitor* II que és específic de CDK2. De fet, amb els experiments de DNA *fibre assay* podem veure com al canviar el tractament de 10mM a 5mM d'hidroxiurea l'activació de nous orígens disminueix considerablement, indicant que les cèl·lules a 5mM no depenen tant de l'activació de nous orígens com amb 10mM d'hidroxiurea. De manera que és possible que després de 14 hores amb els tractaments de 1mM i 2mM d'hidroxiurea, les cèl·lules HCT116 no depenguin de l'activació de nous orígens per reiniciar la replicació. A més a més, si s'allarga el temps de l'estrès replicatiu de 14 a 24 hores es veu com el tractament amb 10mM d'hidroxiurea ja redueix considerablement el nombre de cèl·lules que finalitzen la replicació durant la recuperació (12h). Si comparem amb els resultats amb 14 hores d'estrès replicatiu, en afegir roscovitina durant la recuperació després de l'estrès replicatiu de 24 hores induït amb 2mM i 5mM d'hidroxiurea, hi ha més cèl·lules incapaces de finalitzar la replicació. Probablement perquè en allargar el temps els efectes de l'estrès replicatiu són més severos i s'incrementa la dependència de l'activació de nous orígens.

En conseqüència, com que la roscovitina inhibeix de manera més general les CDK segurament els efectes observats amb 1mM i 2mM d'hidroxiurea no tenen a veure amb l'activació de nous orígens.

Per analitzar la implicació de la inhibició de nous orígens en la capacitat de recuperació de les cèl·lules després de l'estrès replicatiu sever no hem considerat la mort cel·lular produïda durant els tractaments. En els resultats obtinguts per citometria, assajos de clonogenicitat o WB només hem considerat les cèl·lules que romanien a la placa després del tractament i descartat les mortes.

Hem quantificat aquesta mortalitat per tenir present aproximadament el nombre de cèl·lules que es moren amb la combinació d'estrès replicatiu i després inhibidor de nous orígens. De fet hem pogut comprovar com fins i tot després d'eliminar l'inhibidor i deixar a les cèl·lules en medi fresc la mortalitat continua augmentant. Per tant la combinació a més de produir una disminució en la capacitat de formar colònies, també incrementa la mortalitat. Un fet interessant és que la mortalitat no està relacionada amb la dosi d'hidroxiurea, ja que la mort és la mateixa amb totes les dosis utilitzades. A més a més cal tenir en compte que igual que amb els assajos de clonogenicitat, estam analitzant la mortalitat en la població general i no només en les cèl·lules que han estat les 14 hores amb l'estrès replicatiu.

En les cèl·lules hTERT-RPE, després de l'activació d'APC/C^{Cdh1} es produeix un increment en marcadors de senescència com p21 i activitat β -galactosidasa⁵⁰⁶. En aquest cas hem volgut analitzar en cèl·lules HCT116 alguns marcadors de la resposta al dany i senescència com γ H2AX, p53 i p21. En el cas de γ H2AX els nivells pugen amb l'estrès replicatiu i després durant la recuperació es redueixen. En canvi amb els de p53 es produeix un augment, però els nivells no canvien gaire en afegir l'inhibidor. Només en el cas de γ H2AX l'addició durant la recuperació d'un inhibidor de l'activació de nous orígens incrementa els nivells d'aquesta proteïna, i després d'eliminar l'inhibidor es redueixen fins a ser semblants al control. S'ha de tenir en compte que l'inhibidor per si sol ja produeix un augment de γ H2AX, però el fet de combinar-lo després d'un estrès replicatiu sever amb dosis elevades d'hidroxiurea (10mM) fa que els nivells incrementin encara més.

Aquesta recuperació un cop eliminat l'inhibidor és consistent amb els resultats de la prova que vàrem fer amb CDK2 inhibitor II a temps llargs (fins a 24 hores), ja que en eliminar l'inhibidor s'incrementa la velocitat de progressió de la fase S. Per tant potser la cèl·lula es recupera en eliminar l'inhibidor i repara el dany que s'hagi pogut produir. Tot i que també s'ha de tenir en compte que les cèl·lules que es moren no les analitzem, així que pot ser els nivells d'aquestes proteïnes baixin amb

el temps perquè les cèl·lules que tenen els nivells més grans de dany moren.

El cas de p21 és diferent. Tot i incrementar lleugerament p53 no s'aprecia cap canvi en els nivells de p21 durant el tractament amb hidroxiurea. No obstant això, durant la recuperació els nivells de p21 augmenten i es mantenen estables durant tot el temps de recuperació (36 hores). A més a més, els nivells d'aquesta proteïna no depenen de la inhibició de nous orígens.

Gràcies als experiments d'immunofluorescència, hem pogut comprovar que l'augment de p21 durant la recuperació correspon a una població de cèl·lules p21 positives en les que aquesta proteïna es troba al nucli. Aquestes cèl·lules p21 positives són incapaces de sintetitzar DNA després d'un període de 24h de recuperació, per tant no progressen en el cicle. La nostra hipòtesi és que aquestes cèl·lules expressen p21 quan arriben a G2, ja que per WB hem vist com els nivells de p21 incrementen progressivament entre les 4 i les 8 hores de recuperació, que és quan hem vist per citometria que les cèl·lules finalitzen la replicació.

Per tant, els nostres resultats mostren com segons la severitat de l'estrès replicatiu (que depèn del temps i de la dosi d'hidroxiurea utilitzada) les cèl·lules HCT116 són més dependents de l'activació de nous orígens per a recuperar-se. El fet de reduir l'activació de nous orígens amb un inhibidor de la CDK2 disminueix tant la viabilitat cel·lular com el nombre de cèl·lules que es recuperen. No obstant aquesta inhibició és reversible, ja que quan s'elimina l'inhibidor les cèl·lules es recuperen més ràpidament.

4. LA INHIBICIÓ CONJUNTA DE CDK2 I RAD51 DESPRÉS D'UN ESTRÈS REPLICATIU INCREMENTA LA MORTALITAT EN CÈL·LULES HCT116

Diversos estudis han mostrat que com RAD51 intervé en la reparació de DSB per recombinació homòloga. La inhibició de RAD51 sensibilitza les cèl·lules tumorals a tractaments que produeixen DSB com el cisplatí o l'olaparib ^{596,624-627}. RAD51 pot estar involucrada en el BIR (*break induced replication*) ^{362,363,628} i a més a més -com hem comprovat al segon capítol de resultats- és important per al reinici després d'un estrès replicatiu agut. De manera que hem volgut combinar la inhibició de RAD51 amb la de nous orígens de replicació per veure si érem capaços de reduir encara més la recuperació de les cèl·lules tumorals després d'un estrès replicatiu sever. El nostre objectiu era per una banda inhibir l'activació de nous orígens i per l'altra reduir la capacitat de reinici i progressió de la forqueta de replicació.

Tot i ser resultats preliminars, ja que calen més experiments per poder-ho afirmar amb seguretat, el tractament amb B02 no redueix la població que arriba a fase G2-M durant la recuperació de l'estrès replicatiu. És possible que les cèl·lules repliquin més lentament que en la condició control, però al final de les 12 hores de recuperació arriben a G2-M el mateix percentatge de cèl·lules. Quan el B02 es combina amb el CDK2 *inhibitor* II, aquest no incrementa l'efecte de l'inhibidor de CDK2, ja que la població que 12 hores després de l'estrès roman en fase S no augmenta. No ho fa ni a 5mM i 10mM d'hidroxiurea, que per l'increment en l'activació de nous orígens en aquestes condicions s'hi podria interpretar que el nombre de forquetes col·lapsades seria major i les cèl·lules serien més dependents de BIR per recuperar la replicació ^{375,629}. Això podria ocórrer perquè pel reinici de les forquetes després d'un estrès replicatiu sever, les cèl·lules HCT116 no són tan dependents de RAD51. Per una banda amb el B02 no s'inhibeix el paper de RAD51 en la regressió de les forquetes, ja que per aquesta funció no cal la formació del nucleofilament de RAD51 ^{317,318,479,480}. Per altra banda s'ha descrit tant en llevats ^{630,631} com en cèl·lules humanes ⁶³² l'existència de BIR independent de RAD51.

A més a més els paràlegs de RAD51 poden estar actuant ja que aquests s'han involucrat en la resposta a l'estrès replicatiu i tot i que puguin actuar estabilitzant a RAD51 o carregant-lo a la cromatina, no totes les seves funcions són dependents de RAD51 ⁶³³. S'han relacionat directament els complexos BCX2 ⁴⁹² amb la regressió i protecció de la forqueta, i CX3 ⁴⁹² i Shu ⁴⁹⁵ amb el reinici de la forqueta després d'un estrès replicatiu. A més a més s'ha vist com un subcomplex format per XRCC2 i RAD51D intervé modulant i reduint la velocitat de la forqueta de replicació quan disminueix el nivell de nucleòtids. L'activació d'aquest subcomplex depèn d'ATR i contribueix a la protecció de les forquetes evitant que es produeixi dany ⁶³³. Vista aquesta importància dels paràlegs de RAD51 en la resposta a l'estrès replicatiu seria interessant a part d'inhibir a RAD51 inhibir algun paràleg com XRCC2, que està fortament implicat.

També és important considerar que els nivells de RAD51 en cèl·lules tumorals utilitzades són elevats en comparació amb les cèl·lules no transformades (hTERT-RPE), i a més a més el B02 no produeix una inhibició total de RAD51 ⁵⁹⁶. En U2OS s'ha determinat que la IC₅₀ d'inhibició de la recombinació homòloga és de 17.7µM ⁵⁹⁶ i la dosi que hem utilitzat és 25µM. De manera que probablement no estam inhibint per complet l'activitat de RAD51. Recentment el grup d'Alexander Mazin han desenvolupat modificacions del B02 que el fan molt més eficient en la inhibició de la unió de RAD51 al DNA i inhibeixen pràcticament tota l'activitat d'intercanvi de cadenes (IC₅₀ 0.72 µM), fet no observat amb B02 ⁵⁹⁶. Així que seria interessant testar el B02 modificat en comptes del B02 que hem utilitzat en el nostre treball.

No obstant això, la combinació d'inhibidors després d'un estrès replicatiu sever sí que incrementa la mortalitat, tal com hem pogut comprovar amb el marcatge d'Anexina V-PI. Mentre que la dosi de B02 utilitzada no indueix mortalitat, quan aquesta es combina amb CDK2 *inhibitor II* incrementa els efectes induïts per aquest últim. Igual que ocorre amb CDK2 *inhibitor II* sol, aquest efecte és independent de la dosi d'hidroxiurea utilitzada.

De manera que si millorem la eficiència d'aquesta inhibició de RAD51 i/o la combinem amb la d'altres proteïnes claus com XRCC2, possiblement inhibirem encara més la progressió de les cèl·lules tumorals que no poden activar nous orígens després de l'estrès replicatiu sever, i també podríem incrementar encara més la mortalitat.

5. LA RECUPERACIÓ D'UN ESTRÈS REPLICATIU SEVER ALTERA LA DINÀMICA DELS DOMINIS DE REPLICACIÓ I L'ACCESSIBILITAT DE LA CROMATINA EN CÈL·LULES HCT116

La formació i progressió del tumor no depèn només de canvis gènics, si no també pot dependre de canvis a nivell epigenètic. Des de fa temps es planteja la relació entre l'estrès replicatiu i les alteracions epigenètiques ⁶³⁴. Diversos estudis han mostrat com durant l'estrès replicatiu es pot alterar la reposició d'histones ^{635,636}. En llevats s'ha vist com la mateixa resposta a l'estrès replicatiu inhibeix l'expressió gènica de les zones afectades ⁶³⁷. Un dels factors més importants a tenir en compte és si aquestes alteracions després es mantenen en les següents divisions cel·lulars.

L'epigenètica també juga un paper important en la resposta contra l'estrès replicatiu ⁶³⁸. Aquest estrès pot induir canvis directes en histones com per exemple l'addició de la histona modificada macroH2A1.2 a les regions del genoma on sovint es produeix estrès replicatiu. És el mecanisme que té la cèl·lula per marcar aquelles regions que són fràgils i crear un ambient favorable per respondre de manera eficient en cas d'estrès replicatiu i dany. Aquesta histona interacciona amb la proteïna BRCA1, implicada en mecanismes de reparació, i permet que estigui ja present a les zones del genoma on la replicació és més complicada ⁶³⁹.

Hi ha marques epigenètiques que s'han relacionat amb el *timing* de replicació, fet que encaixa amb que aquest depèn de l'estructura i condensació de la cromatina ⁵⁶³⁻⁵⁶⁵. Tot i que l'epigenètica i l'estructura de la cromatina pugui regular el *timing* de replicació durant la G1, s'ha vist com aquesta relació de dependència també pot succeir a la inversa, ja que canvis en el temps de replicació en regions concretes pot produir diferències en els nivells d'acetilació ⁵⁶⁵. A més a més, hi ha proteïnes que intervenen en la formació dels TADs com Rif-1, que està implicada en el control del *timing* de replicació i l'estructura de la cromatina, ja que interacciona amb TADs que repliquen de manera tardana i ajuda a

mantenir els contactes dintre d'aquests ^{640,641}. Recentment s'ha vist com la seva depleció en diversos tipus cel·lulars tumorals i no tumorals -entre ells HCT116- produeix una alteració global en el *timing* de replicació i en les marques epigenètiques pròpies de la cèl·lula ⁶⁴².

Hem comprovat com després d'un estrès replicatiu sever les cèl·lules HCT116 activen nous orígens, i part d'aquests estan dominis de replicació que no estaven actius a l'inici de l'estrès. Per tant si aquests dominis no s'haurien d'activar en aquell moment, potser s'està alterant el *timing* de replicació. En conseqüència si s'alterés el *timing* de replicació d'alguns dominis potser també es podrien estar alterant marques epigenètiques, que derivarien en canvis en la conformació de la cromatina fent que pugui canviar l'expressió gènica.

Com que pressuposàvem que aquest canvi era a l'atzar entre els dominis de replicació, no teníem gens específics per a comprovar si hi havia modificacions en l'expressió gènica. Així que vàrem buscar gens que no s'expressessin en les cèl·lules HCT116 i veure si després de l'estrès augmentava la seva expressió. Primer vàrem comprovar els nivells d'ORF1p (transcrit de LINE-1), que sabíem que prové d'un gen que té nombroses còpies al genoma i està fortament reprimat. Després d'un o varis cicles d'estrès replicatiu sever i recuperació vàrem comprovar que no es produeixen canvis en l'expressió d'ORF1p ni a nivell de mRNA ni a nivell de proteïna. Això es pot deure al fet que els elements transposables es troben fortament reprimats en aquestes cèl·lules, tant a nivell de cromatina com de transcrit gràcies a RNAs curts no codificants (sncRNAs) ⁵⁶².

Posteriorment vàrem quantificar el mRNA d'un panell de gens regulats pel desenvolupament. Els TAD de gens associats al desenvolupament o especialització de llinatge cel·lular durant la diferenciació canvien la seva localització en el nucli, el *timing* de replicació i l'expressió dels gens que contenen ⁶⁴³. Així que possiblement aquests gens sí que poden alterar la seva expressió si es desregula el *timing* de replicació.

De tots els gens analitzats només l'expressió del gen de la citoqueratina 20 (CK20) es va incrementar després d'un o varis cicles d'estrès

replicatiu i recuperació. A més del missatge, també hi ha un increment dels nivells de la proteïna, que en condicions control és indetectable. El experiments de microscòpia mostren com l'expressió de CK20 es produeix en un nombre baix de les cèl·lules (menys del 5%), però ni en condicions control ni només amb un tractament amb hidroxidurea es detecta. Aquest resultat encaixa amb la idea que els canvis en el *timing* de replicació i en l'accessibilitat de la cromatina succeeixin de manera estocàstica, tot i que pot haver-hi regions que siguin més susceptibles de patir aquestes alteracions, igual que els llocs fràgils comuns (CFS) del genoma, que són més susceptibles de patir estrès replicatiu i dany.

Gràcies a l'experiment d'ATAC-seq hem pogut comprovar que es produeixen canvis en l'accessibilitat del genoma durant la recuperació després de l'estrès replicatiu. Comparant les dues mostres de la recuperació amb el control o la hidroxidurea, es pot veure com hi ha un increment clar en l'accessibilitat. Al treballar amb un conjunt de cèl·lules i no amb cèl·lules individuals, el fet de tenir valors més alts en l'accessibilitat implica que un major nombre de cèl·lules d'aquella condició té la regió accessible. De manera que després de l'estrès replicatiu una major quantitat de cèl·lules tenen accessibles aquestes regions.

En canvi, les disminucions són força menors en comparació amb els increments, ja que hi ha molt poques disminucions en que es produeixi una diferència substancial o rellevant i que aquesta sigui estadísticament significativa (194 disminucions contra 1937 increments). Això encaixa amb la nostra hipòtesi de partida, on l'activació de nous orígens pot alterar l'epigenètica de les regions on s'activin, ja que els orígens que s'activarien en altres dominis pertanyen a zones que no s'han replicat fins ara. Per tant és més fàcil que regions més condensades es comencin a replicar a un temps que no pertoca i en conseqüència es tornin més accessibles. A més a més aquest augment de l'accessibilitat només succeeix durant la recuperació, ja que comparant el control amb la hidroxidurea hi ha un nombre semblant d'increments i reduccions que siguin rellevants i estadísticament

significatius. De manera que les diferències notables que hem observat es produeixen en eliminar la hidroxiiurea.

Durant la recuperació també s'han detectat regions noves que s'han tornat accessibles i d'altres en que s'ha perdut l'accessibilitat. En aquest cas hi ha un nombre semblant de guanys i pèrdues.

En quant a la localització de les regions que durant la recuperació es perd o disminueixen la seva accessibilitat, aquestes no es produeixen en una regió concreta, el nombre és semblant en regions promotores, intragèniques o intergèniques. Tot i això, no es pot descartar que no hi hagi una preferència per les regions promotores. Aquestes són més curtes que les altres, així que seria possible que fos menys freqüent trobar els canvis en aquestes regions que a les altres dues. Al tenir els nivells semblants a la resta de regions podria haver-hi enriquiment en promotors.

En canvi, en el cas dels increments en l'accessibilitat, aquests es donen pràcticament tots en regions promotores. Pel que fa als guanys d'accessibilitat, els nivells són semblants entre les regions. Igual que passa amb les pèrdues, tampoc podem descartar un enriquiment.

Com que els orígens de replicació no tenen una seqüència definida és difícil saber si aquestes regions detectades per ATAC-seq corresponen a orígens de replicació. No obstant s'han estudiat i localitzat els orígens de replicació en el genoma gràcies a l'ús de tècniques com SNS-seq, que utilitza tècniques de seqüenciació de nova generació i així es pot seqüenciar els fragments curts derivats de l'inici de la replicació per a localitzar-los al genoma. En diversos treballs han analitzat els orígens de replicació de diverses línies cel·lulars humanes o d'altres mamífers com ratolins, i els han definit i distribuït en diverses categories en funció de la seva eficiència o activitat ^{100,174,543,644–648}. Aquesta major eficiència o activitat d'un origen respecte a un altre fa referència a que dintre de les poblacions cel·lulars analitzades, tot i que la selecció d'origens és estocàstica ⁶⁴⁸, hi ha orígens que s'utilitzen en un major nombre de cèl·lules. Aquests orígens que s'utilitzen amb més freqüència i que gran part són comuns entre diferents línies cel·lulars s'han anomenat orígens

centrals (*core origins*)^{646,649}, per diferenciar-los de la resta, anomenats estocàstics⁶⁴⁶. El grup de Marcel Méchali va analitzar tots els orígens detectats en diverses línies cel·lulars, immortalitzades o no. Per cada línia cel·lular van determinar que els orígens centrals eren un 20% del total, i la majoria eren comuns entre les diferents línies cel·lulars. En termes quantitius els orígens centrals representaven la majoria de les seqüències analitzades per SNS-seq (70-85%)⁶⁴⁶.

A més a més els orígens de replicació es troben sovint a promotors de gens^{100,646,649,650}. Els resultats que hem obtingut amb ATAC-seq mostren que la majoria de regions que incrementen la seva accessibilitat després d'un estrès replicatiu es troben a promotors de gens, per tant podria ser que s'activen orígens que es troben a regions promotores. Tot i que des de fa molts anys s'havia vinculat un augment de la transcripció amb una major activitat dels orígens de replicació que contenen⁶⁵⁰⁻⁶⁵², estudis recents mostren com no és necessari que els gens es transcrivin de forma activa per a què s'utilitzin els orígens de replicació localitzats a les regions promotores⁶⁴⁶. Hi ha altres factors que intervenen, com determinades marques epigenètiques -com H3K4me1, H3K4me3 o H3K27ac-, o que els orígens siguin propers a regions riques en guanina com les illes CpG, freqüents també a regions promotores^{174,646,653,654}. De manera que el fet que orígens de replicació actius es trobin en regions promotores no implica que els gens es transcrivin activament. De fet inclús en els dominis que es repliquen de manera primerenca, i que per tant tenen la cromatina més oberta i major activitat transcripcional, l'inici de la replicació es produeix en zones on no hi ha transcripció. Així s'eviten col·lisions entre les dues maquinaries. A més a més el grup de Jiazhi Hu ha descrit que les marques epigenètiques associades a la elongació dels transcrits com són H3K79me2 i H3K36me3 no coincideixen amb els orígens de replicació, i que la RNA polimerasa II col·labora en aquesta exclusió dels orígens de les zones amb elevada activitat transcripcional⁶⁵⁴. Concretament han demostrat com es produeix un desacoblament entre ORC i MCM, i la principal hipòtesi és que la RNA polimerasa II desplaça les MCM però no les ORC i les exclou de les zones on hi ha transcripció⁶⁵⁴.

Bona part dels orígens de replicació centrals es troben en promotors dels gens ⁶⁴⁶. També s'ha descrit que els orígens de replicació que presenten una major activitat són els que tenen una elevada connectivitat a nivell de cromatina i tendeixen a ser regions que es repliquen de manera primerenca ⁵⁴³. Un estrès replicatiu lleuger pot alterar l'activitat dels orígens de replicació i amb un estrès més sever es poden activar altres que no siguin molt utilitzats -aquells que Méchali i col·laboradors anomenaven estocàstics- ^{646,647,649}. A més a més, les cèl·lules immortalitzades presenten major nombre d'orígens estocàstics ⁶⁴⁶. Per tant, és possible que en les regions detectades a totes les condicions on augmentava l'accessibilitat durant la recuperació, sigui més probable trobar orígens de replicació que puguin tenir una major activitat, i per això aquest enriquiment en les regions promotores. Tot i això, encara que puguin ser orígens de replicació amb activitat elevada, no exclou el fet que es puguin activar a temps diferent al que tocaria per *timing*. En canvi les regions noves detectades és més probable que corresponguin a orígens que tenen una menor activitat i per tant no estan tan enriquits en regions promotores. No obstant això, en un futur caldrà comprovar si en aquestes regions detectades hi ha altres elements associats a orígens de replicació, com són les regions riques en guanina.

A nivell de TAD hi ha una major concentració d'orígens de replicació a les fronteres que a l'interior ⁶⁴⁶. Tot i que la majoria de interaccions de la cromatina es donen dintre d'un mateix TAD hi ha algunes regions que poden establir interaccions inter-TAD, i si hi ha orígens de replicació en aquestes regions, aquests es replicaran amb un *timing* idèntic tot i formar part de dos TADs diferents ⁶⁴⁹. De manera que si s'altera la condensació de la cromatina i es produeixen altres interaccions entre TADs, també es pot canviar el *timing* de replicació.

Al haver-hi un enriquiment tan gran en promotors en les regions detectades a totes les condicions, és possible que l'increment de l'accessibilitat que trobem en les regions promotores sigui una conseqüència de l'activació de gens en resposta a l'estrès replicatiu. Tot i que en algunes regions podria passar, és improbable que sigui una

resposta global, ja que aquestes modificacions en l'accessibilitat persisteixen 36 hores després de l'estrès. A més a més, que la cromatina de les regions promotores estigui oberta no implica necessàriament la transcripció del gen. En el cas de la CK20 hem pogut comprovar com l'increment de l'expressió es produeix només en un nombre reduït de cèl·lules, fet incompatible amb una resposta global a l'estrès replicatiu.

En l'experiment d'ATAC-seq hem pogut comprovar com durant la recuperació de l'estrès replicatiu la cromatina d'una regió estimuladora (*enhancer*) de CK20 és més accessible. De manera que amb l'ATAC-seq no només hem validat l'observació prèvia, sinó que amb les condicions en que hem realitzat aquesta tècnica tenim prou sensibilitat com per detectar aquests canvis. No obstant això, l'algoritme que hem utilitzat per a detectar els pics (*peak calling*), no ha detectat el de l'estimulador de CK20, així que probablement estam infraestimant la quantitat de regions on es modifica la condensació de la cromatina després d'un estrès replicatiu. En aquest cas al haver un pic major molt proper (estimulador de CK23), l'algoritme no ha detectat el de CK20. Per aquest treball hem utilitzat un algoritme d'RNA-seq, i en un futur caldria utilitzar altres algoritmes per a detectar més pics en l'histograma, i així poder identificar noves regions que poden canviar en resposta a un estrès replicatiu sever. Un experiment que seria interessant realitzar per complementar l'estudi és una seqüenciació d'RNA abans i després de l'estrès, per veure si coincideixen regions obertes amb un increment dels transcrits.

Durant la diferenciació cel·lular hi ha alguns gens de TADs regulats pel desenvolupament que s'expressen tot i replicar-se de manera tardana (fet que xocava amb el model establert fins al moment). Però després, el TAD canvia el *timing* i esdevé un TAD de replicació primerenca, canviant posteriorment la posició al nucli, i promovent l'expressió de més gens del TAD ⁶⁵⁵. Això mostra com no necessàriament primer es canvia el domini de posició, o l'expressió gènica, sinó que pot ser a la inversa: es poden produir canvis en l'accessibilitat de la cromatina que

facin que s'expressin gens en un TAD que es replica de forma tardana, i més endavant es canvia el patró de replicació.

La nostra hipòtesi és que les regions s'obren per l'activació de nous orígens, i no amb la finalitat de transcriure-les. Això podria ocasionar canvis a diferents nivells com epigenètic, de *timing* de replicació, localització en el genoma o d'expressió. Aquests factors estan molt relacionats i s'influeixen mútuament. De manera que no totes les regions han d'experimentar els mateixos canvis, ni ocorren a la vegada, sinó que pot ser un efecte en la condensació de la cromatina, que com que es manté en el temps -fet que hem pogut comprovar fins a 36 hores després- pot derivar en altres canvis en qualsevol dels altres factors esmentats en la regió alterada i la d'aquelles que interaccionen amb ella.

6. MODEL FINAL

Amb els resultats obtinguts a aquesta tesi proposem el següent model (figura 1).

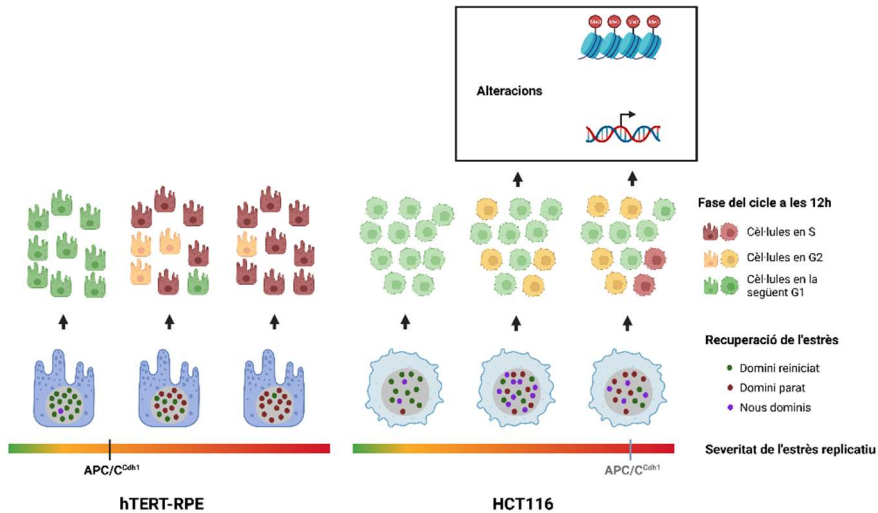


Figura 1. Comparació de la recuperació a l'estrès replicatiu en cèl·lules tumorals i no tumorals. Els nostres resultats suggereixen que les cèl·lules tumorals HCT116 tenen més resistència a l'estrès replicatiu que les cèl·lules no transformades hTERT-RPE. Si l'estrès és agut o poc sever -depenent de la dosi d'hidroxiurea utilitzada i el temps de tractament- tant les cèl·lules hTERT-RPE com les HCT116 es recuperen gràcies al reinici de les forqueres de replicació. Les proteïnes OZF i RAD51 són importants per a la replicació després de l'estrès. En canvi en el cas d'un estrès replicatiu sever hi ha moltes forqueres de replicació que no poden reiniciar i les cèl·lules necessiten activar nous orígens per a continuar amb la replicació. En el cas de les cèl·lules hTERT-RPE aquestes no es recuperen, ja que quan l'estrès posa en risc la integritat cel·lular. Durant l'estrès replicatiu s'activa APC/C^{Cdh1} que degrada la ciclina A evitant l'activació de nous orígens durant la recuperació. De manera que depenen del reinici de les forqueres de replicació. Bona part de les cèl·lules es queden en fase S i no finalitzen la replicació. Les que la finalitzen es queden parades en G2 i part es tornen senescents. En canvi les cèl·lules tumorals HCT116 activen nous orígens de replicació i completen la fase S. Algunes de les que arriben a G2 activen p21 i possiblement es tornen senescents, mentre que la resta progressen i finalitzen el cicle cel·lular. Aquesta activació de nous orígens durant la recuperació de l'estrès, no només es dona als dominis de replicació que estaven actius abans, sinó que també s'activen nous dominis. Aquest fet provoca un increment de l'accessibilitat de la cromatina, que altera l'epigenètica i l'expressió gènica. Si s'incrementa encara més la severitat de l'estrès replicatiu (10mM hidroxiurea 24 hores) hi ha un punt on les cèl·lules tumorals activen APC/C^{Cdh1}, tot i que aquesta activació no inhibeix completament l'activació de nous orígens, ja que tot i que una població cel·lular roman en fase S després de les 12 hores de recuperació, hi ha una altra població, que és major i que si es capaç de finalitzar la replicació i progressar en el cicle.

CONCLUSIONS

Les conclusions generals de cada capítol són:

1. OZF és una proteïna altament expressada en cèl·lules de càncer colorectal com HCT116, DLD-1 i SW480. És necessari per a mantenir la velocitat de progressió de la forqueta en condicions d'estrès replicatiu, però la seva eliminació no comporta un increment en el dany o reducció de la viabilitat en cèl·lules HCT116 i DLD-1.
2. La inhibició de la capacitat d'unió al DNA i d'intercanvi de cadena de RAD51 en cèl·lules amb estrès replicatiu basal comporta un retard en la progressió en la fase S. Tot i que no incrementa el dany en el DNA, redueix la capacitat d'unió de la polimerasa α a la cromatina.
3. En condicions d'estrès replicatiu induït per hidroxiiurea, a major dosi d'hidroxiiurea i temps de l'estrès, les cèl·lules HCT116 són més dependents de l'activació de nous orígens per recuperar la replicació i progressar en el cicle. La inhibició de nous orígens minva la capacitat de recuperar la replicació i incrementa la mort cel·lular, sensibilitzant les cèl·lules a l'estrès.
4. Durant la recuperació d'un estrès replicatiu sever les cèl·lules HCT116 activen orígens de replicació en nous dominis de replicació que no estaven actius abans de l'estrès. A més a més es produeixen canvis en l'accessibilitat de la cromatina que poden alterar l'expressió gènica, tal com hem vist en una petita proporció de cèl·lules en que després de la recuperació d'un estrès replicatiu expressen CK20.

Seguint els objectius que ens havíem marcat prèviament a aquesta tesi, les conclusions específiques dels objectius d'aquesta tesi són:

1. Conclusions derivades de l'anàlisi de proteïnes involucrades en la remodelació de la forqueta de replicació durant l'estrès replicatiu agut i el seu paper a l'estabilitat genòmica.

- 1.1. OZF no és una proteïna necessària per a l'activació del *checkpoint* de replicació.
- 1.2. OZF té una expressió elevada en cèl·lules de càncer colorectal HCT116, DLD-1 i SW480 comparant amb les cèl·lules no transformades hTERT-RPE.
- 1.3. OZF és necessari per a la velocitat de progressió de la forqueta en DLD-1 i SW480.
- 1.4. OZF no intervé en l'activació dels orígens de replicació.
- 1.5. La reducció dels nivells d'OZF en cèl·lules HCT116 i DLD-1 no incrementa el dany al DNA ni té efectes sobre la viabilitat.
- 1.6. Les cèl·lules HCT116 i DLD-1 tenen major nivell de RAD51 que les no transformades hTERT-RPE.
- 1.7. La inhibició de RAD51 amb B02 retarda la progressió de la fase S en cèl·lules DLD-1 i HCT116.
- 1.8. La inhibició de RAD51 amb B02 no incrementa el dany ni té efectes sobre la viabilitat en cèl·lules DLD-1 i HCT116.
- 1.9. La inhibició de RAD51 amb B02 incrementa els nivells de γ H2AX tot i que no genera fragments llargs de ssDNA en cèl·lules HCT116.
- 1.10. La inhibició de RAD51 amb B02 redueix la unió de la DNA polimerasa α a la cromatina en cèl·lules HCT116 en condicions control i en cèl·lules hTERT-RPE després d'un estrès replicatiu agut induït amb hidroxiiurea.

2. Conclusions derivades de l'anàlisi de la inhibició de nous orígens de replicació després d'un estrès replicatiu sever en cèl·lules tumorals.

- 2.1. Les cèl·lules HCT116 tenen major resistència que les hTERT-RPE a l'estrès replicatiu sever induït amb gemcitabina gràcies a que no activen APC/C^{Cdh1}.
- 2.2. Les cèl·lules HCT116 tenen major resistència que les hTERT-RPE a l'estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea ja que necessiten un estrès replicatiu més sever, en funció del temps i la dosi d'hidroxiurea, per activar APC/C^{Cdh1}.
- 2.3. Durant la recuperació després d'un estrès replicatiu sever, hi ha una proporció de cèl·lules HCT116 que quan arriben a la fase G2 expressen p21 i no progressen en el cicle.
- 2.4. La roscovitina inhibeix l'activació de nous orígens de replicació.
- 2.5. El tractament amb roscovitina durant la recuperació sensibilitza les cèl·lules HCT116 a l'estrès replicatiu sever induït amb gemcitabina.
- 2.6. El tractament amb roscovitina durant la recuperació sensibilitza les cèl·lules HCT116 a l'estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea i indueix mort cel·lular.
- 2.7. El tractament amb roscovitina durant la recuperació a un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea incrementa els nivells de γ H2AX, però no els de p21 o p53.
- 2.8. El tractament amb CDK2 *inhibitor* II inhibeix l'activació de nous orígens de replicació.
- 2.9. El tractament amb CDK2 *inhibitor* II durant la recuperació sensibilitza les cèl·lules HCT116 a l'estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea, en condicions on aquestes necessiten de l'activació de nous orígens per recuperar-se i indueix mort cel·lular.
- 2.10. El tractament amb CDK2 *inhibitor* II durant la recuperació d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea

incrementa els nivells de γ H2AX, però no els de p21 o p53 en cèl·lules HCT116.

- 2.11. La combinació de B02 i CDK2 *inhibitor* II durant la recuperació d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea no incrementa el nombre de cèl·lules que queden parades en fase S però sí incrementa la mortalitat cel·lular en cèl·lules HCT116.

3. Conclusions derivades de l'anàlisi de l'activació dels nous orígens i la dinàmica dels dominis de replicació en resposta a un estrès replicatiu sever i les seves implicacions en l'epigenètica i l'expressió gènica.

- 3.1. Durant la recuperació d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea les cèl·lules HCT116 activen nous orígens de replicació que es troben en dominis de replicació inactius abans de l'estrès.
- 3.2. La recuperació d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea no afecta l'expressió del transcrit ORF1p codificat pel gen LINE-1 en cèl·lules HCT116.
- 3.3. Després de la recuperació d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea en cèl·lules HCT116, es produeix un increment en l'accessibilitat de la cromatina amb preferència per les regions promotores.
- 3.4. Després de la recuperació d'un estrès replicatiu sever induït amb hidroxiurea, un percentatge reduït (inferior al 5%) de cèl·lules HCT116 expressen CK20, correlacionant amb un increment en l'accessibilitat d'una regió estimuladora del gen que codifica per CK20.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. LÍNIES CEL·LULARS I MEDI DE CULTIUS

Taula 1. Línies cel·lulars utilitzades. DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. FBS: *Fetal Bovine Serum*. ATCC: *American Type Culture Collection*. ICO: Institut Català d'Oncologia.

Línia cel·lular	Tipus de cèl·lula	Medi*	Procedència
hTERT-RPE	Cèl·lules d'epiteli pigmentari de retina immortalitzades amb hTERT	DMEM:F12 (1:1) +7% FBS	ATCC
HCT116	Cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12 (1:1) +7% FBS	ICO (Dr. Capellà)
DLD-1	Cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12 (1:1) +7% FBS	<i>Horizon Discovery</i>
SW480	Cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma colorectal	DMEM +10% FBS	ATCC
MCF-7	Cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma de mama	DMEM +10% FBS	Hammersmith Hospital (Dra. Guaita)

* Tots els medis de cultius estan suplementats amb:

- Aminoàcids no essencials (1%)
- L-glutamina (2 mM)
- Àcid pirúvic (1 mM)
- Antibiòtics: penicil·lina (50 unitats/mL) i estreptomina (50 µg/mL)

El PBS que hem utilitzat a cultius l'hem preparat nosaltres amb les següents concentracions de sals:

PBS	131mM NaCl
	1.54mM KH ₂ PO ₄
	5.06mM Na ₂ HPO ₄

1.2. SINCRONITZACIÓ EN FASE S DEL CICLE CEL·LULAR

Per a tenir les cèl·lules sincronitzades en fase S, primer vàrem fer un tractament de 22-24 hores amb timidina amb el que les cèl·lules queden aturades en la transició G1/S. A continuació vàrem canviar el medi de cultiu per eliminar la timidina. A les 2 hores les cèl·lules estaven creixent sincrònicament en fase S.

Per comoditat, en els esquemes quan ens referim a sincronització amb timidina estem englobant el tractament amb timidina i les dues hores d'incubació en medi.

- Dosi timidina cèl·lules no tumorals: 1.5µM
- Dosi timidina cèl·lules tumorals: 2.5µM

1.3. TRANSFECCIÓ AMB siRNA

REACTIUS

Lipofectamine® RNAiMAX LMRNA015 (Invitrogen)

Opti-MEM 31985070 (Gibco)

siRNA ON-TARGETplus SMARTpools (Dharmacon): **Estoc 20µM.**

Taula 2. siRNA utilitzats

Proteïna Diana	Referència	Seqüències
Non-target (NT)	D-001810-10-20	5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3'
		5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3'
		5'-UGGUUUACAUGUUUUCUGA-3'
		5'-UGGUUUACAUGUUUCCUA-3'
OZF	J-019625-05-002	5'-GCGAGAAGCUUUUCGAAUG-3'
	J-019625-06-002	5'-GCAAAUCCAACCUUACUGA-3'
	J-019625-07-002	5'-GCGAACAUACUUUAUUGUA-3'

Dilucions siRNA i Lipofectamina per condició. Si es canvia la placa s'ha d'ajustar segons l'àrea del pou.

Taula 3. Volums de reactius de la transfecció segons la placa.

PLACA	siRNA 20µM	Opti-MEM	Lipofectamina	Opti-MEM
Placa de 6 pous o p35 (9.2cm ²)	5µL	195µL	6µL	194µL
Placa de 12 pous (3.5 cm ²)	2.5µL	97.5µL	3µL	97µL

PROTOCOL TRANSFECCIÓ siRNA

És molt important que tot el material utilitzat s'esterilitzi prèviament per evitar contaminar-lo amb RNAses.

Abans de la transfecció, les cèl·lules han d'estar a un 40-50% de confluència a la placa.

- 1) Preparar la dilució de **lipofectamina en Opti-MEM** en un tub cònic de 15mL, barrejar bé amb un agitador tipus vòrtex i centrifugar al màxim uns segons

- 2) Preparar la dilució de **siRNA en Opti-MEM** en un altre tub cònic de 15mL, barrejar bé amb un agitador tipus vòrtex i centrifugar al màxim uns segons.
- 3) **Afegir** la **dilució de siRNA al tub** que conté la dilució de **lipofectamina**. És molt important fer-ho en aquest ordre.
- 4) **Barrejar bé** amb un agitador tipus vòrtex, centrifugar al màxim uns segons i incubar a temperatura ambient (TA) durant 5 minuts dins de la cabina de cultius.
- 5) **Afegir medi de cultiu als tubs, barrejar be**. El volum de medi es calcula per arribar al volum desitjat per a cada pou que es té. El volum per cada pou de placa de 6 pous és de 2mL i per cada pou de placa de 12 pous és de 1mL.
- 6) **Aspirar el medi de cultiu** del pou on estan creixen **les cèl·lules** i **afegir** la barreja de **siRNA-lipofectamina-medi**.

1.4. COMPOSTS UTILITZATS

Taula 4. Compostos utilitzats. BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina. CldU: 5-cloro-2'-desoxiuridina. IdU: 5-iodo-2'-desoxiuridina. EdU: 5-etinil-2'-desoxiuridina.

Compost	Referència producte	Concentració de treball	Funció
Hidroxiurea (HU)	H8627 (Sigma)	0.1 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM i 10 mM	Inhibidor de la ribonucleòtid reductasa
Gemcitabina (Gem)	G6423 (Sigma)	20 nM	Anàleg de nucleòsid (antimetabòlit)
Adriamicina (Adr)	D1515 (Sigma)	0.15 µg/mL	Agent intercalant del DNA
Roscovitina (Rosc)	R7772 (Sigma)	5 µM, 10 µM i 15 µM	Inhibidor de CDK

CDK2 Inhibitor II (CDK2i)	219445 (Millipore)	5 µM, 10 µM i 15 µM	Inhibidor de CDK2
Timidina	T1895 (Sigma)	1.5 mM hTERT-RPE 2.5 mM cèl·lules tumorals	Desoxiribonucleòsid
MG-132	S2619 (Sigma)	20 µM	Inhibidor del proteasoma
Nocodazole	M1404 (Sigma)	250 ng/mL Cèl·lules tumorals 500 nM/mL hTERT-RPE	Interfereix amb la polimerització dels microtúbuls
BrdU	B50002 (Sigma)	10 µM	Anàleg de la timidina
CldU	C6891 (Sigma)	25 µM	Anàleg de la timidina
IdU	I7125 (Sigma)	250 µM	Anàleg de la timidina
EdU	A10044 (Invitrogen)	50 µM	Anàleg de la timidina

2. ASSAJOS DE VIABILITAT I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

2.1. ASSAIG DE CLONOGENICITAT

Cada mostra es sembra a un pou d'una placa de 6 pous. Quan les cèl·lules estan al 70% de confluència es tracten segons la condició (detallat a cada figura) i després es realitza el següent protocol.

PROTOCOL ASSAIG DE CLONOGENICITAT

- 1) **Semrar 200 cèl·lules per pou** (placa de 6 pous, per triplicat). És molt important barrejar bé. Fer dues dilucions abans d'arribar a la dilució final (133,33 cèl·lules/mL). A l'afegir el volum final al pou, agitar la placa dibuixant una creu per distribuir homogèniament les cèl·lules, mai fent cercles.
- 2) **Incubar les cèl·lules durant 3 dies i canviar el medi**. Acuradament perquè no es desenganxin els clons.
- 3) **Incubar les cèl·lules 4 dies més**. Si els clons són encara massa petits, incubar-los 1 dia més.
- 4) **Aspirar el medi** de cultiu.
- 5) **Rentar amb 1mL de PBS**. Fer-ho acuradament, deixant caure el líquid pel costat del pou.
- 6) **Fixació i tinció** amb una solució de **crystal violeta** 1% en etanol 70%. Afegir amb una pipeta Pasteur, ha de cobrir tot el pou.
- 7) **Incubar com a mínim 5 minuts a TA**.
- 8) **Recollir la solució de crystal violeta**. Es reutilitza.
- 9) **Rentar amb H₂O** per eliminar l'excés de crystal violeta. Descartar l'H₂O en bidons perquè aquest colorant és tòxic.
- 10) **Contar el número de colònies**.

2.2. ASSAIG DE MORTALITAT (ANEXINA V / PI)

REACTIUS ANEXINA

APC-anexina V 550474 (BD Pharmingen)

Iodur de Propidi (PI) 1mg/mL P4864 (Sigma)

Tampó anexina 10X	2.5mM CaCl ₂
	1.4M NaCl
	1.4M Hepes

Solució anexina-PI (per mostra)	50µL Tampó anexina 10X
	450µL H ₂ O _{MQ}
	2µL APC-anexina V
	0.025µL PI

És important titular tant l'APC-anexina V com el PI. En aquest protocol els volums indicats són els que hem utilitzat per les cèl·lules HCT116.

PROTOCOL ANEXINA

- 1) Sembrar les cèl·lules de l'experiment en plaques de 6 pous o p35. Quan estiguin al 60-70% de confluència fer el tractament corresponent.
- 2) **Aspirar el medi** de cultiu i fer un **rentat** amb **1mL** de **PBS**.
- 3) Tripsinitzar les cèl·lules amb **400µL** de **tripsina** i una vegada desenganxades, **neutralitzar** l'enzim **afegint medi** de cultiu suplementat amb FBS 10%.
- 4) **Recollir les cèl·lules** en un tub cònic de 15 mL.
- 5) Centrifugar a **660 rcf** (força centrífuga relativa) a **4°C** durant **5 minuts**.
- 6) **Aspirar el sobrenedant**.
- 7) **Resuspendre** les cèl·lules en **500µL** de solució **anexina-PI**.
- 8) Incubar 10 minuts 4°C en obscuritat. Es pot fer de camí al citòmetre. Les mostres s'han de passar pel citòmetre durant l'hora següent.

3. WESTERN BLOT (WB)

3.1. RECOLLIDA DE MOSTRES

En aquesta tesi, les mostres proteiques per a WB s'han obtingut seguint el protocol de la secció 3.1.1 a excepció dels experiments en els quals s'ha purificat la fracció de cromatina tal com s'explica a l'apartat 3.1.2.

3.1.1 OBTENCIÓ DE LISATS CEL·LULARS

Les cèl·lules es lisen directament a la placa de cultiu.

REACTIUS RECOLLIDA DE MOSTRES

Tampó de lisi	67mM Tris-HCl pH 6.8
	2% SDS

PROTOCOL DE LISI

- 1) **Aspirar** el **medi** de cultiu de la placa.
- 2) Fer **3 rentats** amb **PBS** a TA.
- 3) Afegir **60-100 µL** de **tampó de lisi** (plaques p35) i **rascar** enèrgicament **amb la rasqueta**.
- 4) **Recollir el lisat** amb la pipeta en un tub Eppendorf i preservar a -80°C.

3.1.2 OBTENCIÓ DE LA SUB-FRACCIÓ CEL·LULAR CORRESPONENT A LA CROMATINA

Cal recollir les cèl·lules de la placa sense lisar-les abans de procedir amb l'extracció de la cromatina

PROTOCOL DE RECOLLIDA DE LES CÈL·LULES

- 1) Aspirar el medi de cultiu de la placa.
- 2) Fer 3 rentats amb PBS a 4°C.
- 3) Recollir amb la rasqueta les cèl·lules (sense trencar-les) en 3mL de PBS a 4°C: fer-ho amb la placa inclinada en el gel, fent moviments de dalt a baix (no tornar després de baix a dalt). Al cobrir tota la superfície girar 90° i repetir. Fer fins a 4 girs.
- 4) Centrifugar a 660 rcf a 4 °C durant 5 minuts.
- 5) Aspirar el sobrenedant (SN).
- 6) Preservar les cèl·lules (*pellet*) a -80 °C. També es pot fer la extracció seguidament.

REACTIUS EXTRACCIÓ

Taula 5. Composició Tampó A.

TAMPÓ A	Es contamina sovint, ja que porta sacarosa. Es prepara el tampó estoc 2X , s'autoclava i després s'hi afegeixen la resta de components. Els inhibidors s'afegeixen just abans d'utilitzar el tampó. .			
	Estoc 2X:	50mL	125mL	estocs
	20mM Hepes pH 7.4 0.5M (4°C)	2mL	2.5mL	Hepes
	20mM KCl 1M (TA)	2mL	2.5mL	KCl
	3mM MgCl ₂ 1M (TA)	150µL	375 µL	MgCl ₂
	0.68M Sacarosa (TA)	11.64g	29.1g	
	Estoc 1X : afegir a l'estoc 2X el glicerol i l' H ₂ O _{MQ} : 10% glicerol* H ₂ O _{MQ} * Inhibidors* ±0.1% Tritó X-100*			
	En el moment d'utilitzar el tampó, com que es necessita tampó A 1X amb i sense tritó, es prepara el buffer 1X en un tub (15 mL o 50 mL segons volum) i després es distribueix en dos. A un se li afegeix el tritó i els inhibidors, i a l'altre només els inhibidors.			

Taula 6. Composició Tampó B. EDTA: àcid etilendiamintetraacètic. EGTA: *ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*.

TAMPÓ B	Es prepara l'estoc1X amb H ₂ O _{MQ} i es conserva a 4°C. Els inhibidors s'afegeixen just abans d'utilitzar el tampó.			
		50mL	500mL	estocs
	3mM EDTA (4°C)	300µL	3 mL	EDTA 0.5M
	0.2mM EGTA (4°C)	100µL	1mL	EGTA 0.1M
	Inhibidors*			

*A 4°C (gel)

Taula 7. Inhibidors utilitzats en l'obtenció de la fracció de la cromatina. PMSF: Fluorur de fenilmetilsulfonyl.

INHIBIDORS	Dilució	Estoc	Inhibició
Leupeptina	1:100	1mg/mL (-20 °C)	Proteases
PMSF*	1:100	100mM (-20°C)	Proteases
Ortovanadat de sodi	1:1000	100mM (-20 °C)	Tyr fosfatases
Aprotinina	1:1000	1mg/mL (-20 °C)	Ser proteases
NaF	1:1000	1M (RT)	Ser/Thr fosfatases
Ditiotreitol (DTT)	1:1000	1M (-20 °C)	Evita l'oxidació

* El PMSF només és estable durant 30 minuts. A -20°C forma cristalls que cal dissoldre bé abans d'utilitzar-lo.

PROTOCOL DE LISI

Cal que el material estigui autoclavat.

- 1) **Resuspendre** el *pellet* de cèl·lules en **8 vegades** el seu **volum** de **tampó A** amb 0.1% Tritó X-100 i inhibidors. Incubar **10 minuts** a **4°C** (cèl·lules HCT116) o 20 minuts a 4°C (cèl·lules RPE). **Separar-ne una part (INPUT)** i **afegir 3 vegades** el seu **volum** d'agafat de **tampó de lisi** (detallat al punt 3.1.1). És difícil resuspendre els *pellets* per la qual cosa cal tenir-los tots resuspendos abans de començar a comptar el temps de 10 minuts. Si les mostres es tenen en tubs de 15mL, cal transferir-

les a tubs Eppendorf freds (4°C) quan queden uns 8 minuts d'incubació amb el tampó A. Algunes línies cel·lulars necessiten més temps de permeabilització amb tampó A amb 0,1% Tritó X-100, o bé es pot incrementar la concentració del detergent fins al 0.2%.

Durant la incubació amb el tampó A es pot anar monitoritzant la pèrdua del citoplasma amb el microscopi (3µL de mostra).

- 2) Centrifugar a **600 rcf** a **4°C** durant **4 minuts**.

Mentre, afegir els inhibidors al buffer A sense tritó.

- 3) Recollir i mantenir a 4°C el sobrenedant (**SN**) (**CITOPLASMA**+membranes) i resuspendre el *pellet* (nuclis) molt suaument amb **8 vegades** el seu volum de **buffer A sense tritó**.

Per anar amb més cura, recollir el citoplasma amb 3 puntes una dintre de l'altre (1 mL-200 µL-10 µL).

- 4) Centrifugar a **600 rcf** a **4°C** durant **4 minuts**.
- 5) Aspirar (descartar) el SN i afegir **8 vegades** el volum del *pellet* de **buffer B amb inhibidors**. Incubar **10 minuts a 4°C**.
- 6) Centrifugar a **1700 rcf** a **4°C** durant **5 minuts**.
- 7) Recollir i **Guardar** a 4°C el **SN**). El *pellet* correspon a la cromatina i el SN a la fracció soluble nuclear (FSN). **Rentar** el *pellet* de cromatina amb **8 vegades** el seu volum de **buffer B**.
- 8) Centrifugar a **600 rcf** a **4°C** durant **5 minuts**
- 9) **Aspirar** (descartar) el **SN** i repetir el rentat si el *pellet* encara és blanquinós (ha d'acabar sent transparent).
- 10) **Aspirar (descartar) el SN** i quedar-se amb el *pellet* (**CROMATINA**). Resuspendre'l amb **3 vegades** el seu volum de **tampó de lisi** (detallat al punt 3.1.1).

A les mostres d'**INPUT** i **CROMATINA** se'ls afegeix 3 vegades el seu volum de tampó de lisi. Les mostres de **CITOPLASMA** i **FSN** es guarden amb els buffers corresponents (representa que les proteïnes ja estan extretes, de manera que no és necessari SDS). Cal tenir en compte que les mostres que no porten SDS tenen proteases que poden degradar les proteïnes, de manera que quan es treballa amb aquestes cal mantenir-les en gel en tot moment.

3.2. QUANTIFICACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA I PREPARACIÓ DE MOSTRES

La quantificació es fa en una placa de 96 pous.

REACTIUS QUANTIFICACIÓ

Solució de Lowry:

Taula 8. Composició de la solució de Lowry.

225µL/pou	216µL/mostra	Solució I	2% Na ₂ CO ₃ , 0.1N NaOH 10g Na ₂ CO ₃ 500mL H ₂ O _{MQ} 2g NaOH
	4.5µL/mostra	Solució II	0.5% CuSO ₄ 2.5g CuSO ₄ ·5H ₂ O 500mL
	4.5µL/mostra	Solució III	1% Potassium sodium tartrate tetrahydrate 5g C ₄ H ₄ KNaO ₆ ·4H ₂ O 500mL H ₂ O _{MQ}

Preparació de la placa:Recta patró**Taula 9. Recta patró per la quantificació de proteïna.**

BSA: Albúmina sèrica de boví.

BSA (μL) Estoc 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ (μL)	TAMPÓ DE LISI (μL)
0	43	2
1	42	2
2	41	2
4	39	2
8	35	2
16	27	2
32	11	2
40	3	2

Preparació de les mostres2 μL mostra + 43 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ **PROTOCOL QUANTIFICACIÓ**

- 1) Preparar la recta patró i les mostres. Afegir en aquest ordre l' $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ (recta i mostres), el BSA, el tampó de lisi i en darrer lloc les mostres barrejar bé amb l'agitador tipus vòrtex). Si les cèl·lules s'han lisat amb SDS, bullir-les durant 15 minuts abans de quantificar la concentració de proteïnes.
- 2) Afegir 225 μL de solució Lowry a cada pou i barrejar bé. Es fa amb la pipeta multicanal.
- 3) Incubar 10 minuts a TA.
- 4) Afegir 22.5 μL de solució Folin (109001 [Merck]) (1:1 en $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$) i barrejar bé.
- 5) Incubar 30 minuts a TA (com a màxim 2 hores).
- 6) Llegir l'absorbància a λ 750nm.

3.3. ELECTROFORESI EN GEL D' SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Un cop quantificada la concentració proteica, es preparen les mostres per a carregar en el gel 40µg de proteïna per condició. Els volums s'igualen afegint tampó de lisi. Després s'afegeix el tampó de Laemmli, també anomenat de càrrega. Just abans de carregar les mostres al gel es bullen a 97°C durant 5 minuts.

En aquesta tesi s'ha utilitzat el sistema de BioRad Mini-PROTEAN®.

PROTOCOL

- 1) **Netejar els vidres** amb etanol i paper de cel·lulosa.
- 2) **Col·locar els vidres al suport** i comprovar que estiguin ben muntats. Afegir H_2O_{MQ} entre els dos vidres i assegurar que no es perdi volum.
- 3) **Preparar els gels** en dos tubs diferents (gels resolutiu i empaquetador). Afegir els agents polimeritzadors (PSA i TEMED) just abans d'abocar la solució entre els vidres.

Composició dels gels segons el percentatge d'acrilamida

S'indiquen els volums necessaris per gels d' 1.5mm de gruix. En el cas dels gels per detectar la polimerasa α , al ser una proteïna molt gran ho hem fet en gels de 1mm de gruix amb 6% d'acrilamida (en aquest cas s'ha utilitzat la meitat del volum que hi ha a la taula 10.)

Taula 10. Composició dels gels utilitzats. PSA: Persulfat amònic. TEMED: Tetrametiletildiamina.

% Acrilamida	6%	7%	8%	10%	12%	15%	EMPAQUETADOR
Solució 1 (mL)	5	5	5	5	5	5	-
Solució 2 (mL)	2	2.4	2.8	3.4	4	5	0.36
Solució 3 (mL)	-	-	-	-	-	-	1.5
H ₂ O (mL)	3	2.6	2.2	1.6	1	-	1.2
TEMED (µL)	14	14	14	14	14	14	7.5
PSA (13%) (µL)	50	50	50	50	50	50	30
TOTAL (mL)	10	10	10	10	10	10	3

Solució 1 <i>Resolutiu</i>		0.75M Tris-HCl pH 8.8	Solució 2 <i>Acrilamida</i>		30% Acrilamida
		0.2% SDS			0.8% Bis-acrilamida

Solució 3 <i>Empaquetador</i>		0.25M Tris-HCl pH 8.8
		0.2% SDS

- 4) **Barrejar** la solució del **gel resolutiu i abocar** amb cura **entre els vidres**.
- 5) **Afegir** una mica d'**aigua** uniformement per sobre de la superfície del gel amb una pipeta. L'aigua possibilita la polimerització de l'acrilamida (té lloc en absència d'oxigen), i que la superfície del gel sigui regular.
- 6) Deixar **polimeritzar el gel**. Per saber si el gel ha polimeritzat es va controlant la resta de solució que ha quedat al tub (tapat), quan aquesta polimeritzi, es pot assumir que el gel ha polimeritzat.
- 7) **Decantar** l'aigua.
- 8) Afegir el **PSA** i **TEMED** al tub que conté la solució de gel **empaquetador**.
- 9) **Barrejar i abocar** amb cura **entre els vidres**.

- 10) **Col·locar la pinta** (per definir els pous al gel empaquetador). Es posa la pinta de costat per a treure l'escuma que pot quedar a la part superior, si desborda part del gel no passa res.
- 11) Deixar **polimeritzar el gel** empaquetador.
- 12) **Muntar els gels** en la cubeta d'electroforesi. L'orientació ha de quedar amb els vidres petits cap endins.
- 13) **Omplir la cubeta amb tampó electròlit**.
- 14) **Bullir les mostres 5 minuts**. Es fa un petit forat a la part superior dels tubs Eppendorf per a que no s'obrin per la temperatura.
- 15) **Centrifugar al màxim** uns segons les mostres i el marcador de pes molecular.
- 16) **Treure la pinta i omplir els pous dalt amb tampó electròlit**.
- 17) **Carregar 3µL del marcador** de pes molecular.
- 18) **Carregar les mostres** (tot el volum). Es carreguen amb la xeringa Hamilton evitant bombolles. L'agulla s'ha de netejar amb tampó electròlit entre les diferents mostres.
- 19) Connectar la cubeta a la font d'alimentació a **60V durant 10-15 min** (opcional). Així, tot el volum de les mostres s'empaqueta en una sola línia de sortida a sobre del gel resolutiu.
- 20) Incrementar a **120V** en el cas de córrer el gel a voltatge constant, o a **35mA per gel** en el cas de córrer a amperatge constant. Es fa córrer el gel fins que el front arriba al final del gel resolutiu.
- 21) Desmuntar el sistema, descartar el gel empaquetador amb cura i deixar el gel resolutiu en tampó de transferència.

3.4. ELECTRO-TRANSFERÈNCIA PROTEÏNES A UNA MEMBRANA DE BLOTTING

En aquesta tesi s'han utilitzat les membranes de *blotting* de nitrocel·lulosa. Abans de fer-les servir incubar-les uns segons amb tampó de transferència per hidratar-les.

- 1) **Abocar tampó de transferència** en una safata i **col·locar la quadrícula base** del *sandwich* de transferència.

- 2) **Col·locar el suport del *sandwich*** (component del sistema amb els elèctrodes) dins la cubeta i **omplir-la amb tampó de transferència fins a la meitat** de la seva capacitat.
- 3) **Muntar el *sandwich*** seguint l'esquema de la figura 1. És important que tot el material estigui ben banyat en tampó i eliminar les bombolles.

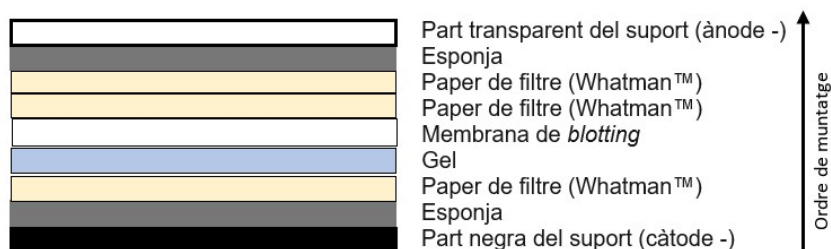


Figura 1. Muntatge del *Sandwich* de transferència.

- 4) **Acoblar el *sandwich*** en el suport de dins de la **cubeta** i acabar d'**omplir-la amb tampó de transferència**.
- 5) Connectar el sistema a la font d'alimentació durant **2 hores a 70V**, o alternativament tota la nit a 20V a 4°C.
- 6) **Desmuntar el sistema**. Descartar el gel i els papers de filtre en el contenidor de residus d'acrilamida. La membrana de blotting en aquest punt es pot assecar entre dos fulls nous de paper de filtre, però s'ha de tenir en compte que en el moment de continuar amb caldrà rehidratar-la amb H₂O en el cas de la membrana de nitrocel·lulosa).

3.5. TINCIÓ DE PROTEÏNES AMB COLORANT PONCEAU S I BLOQUEIG DE LA MEMBRANA DE BLOTTING

Colorant Ponceau	0.1% Solució de Ponceau	
	5% Àcid acètic	
TBS	20mM Tris	0.05% Tween 20
	150mM NaCl	20mM Tris
		150mM

NaCl

- 1) Si després de la transferència de proteïnes del gel a la membrana de *blotting*, aquesta s'ha assecat, rehidratar-la amb H₂O.
- 2) **Incubar la membrana amb** colorant **Ponceau** uns minuts fins que es vegin les bandes de proteïna. Aquest colorant tenyeix totes les proteïnes (sensibilitat de 200 ng) de la membrana
- 3) **Rentar** amb cura la membrana **amb H₂O** corrent per eliminar l'excés de colorant.
- 4) **Fer una fotografia**. La tinció de les proteïnes permet controlar si la transferència ha tingut lloc correctament, i també com a control de càrrega dels diferents pous del gel.
- 5) Eliminar el colorant totalment de la membrana fent els **rentats amb H₂O** corrent que calguin.
- 6) **Bloquejar** els possibles llocs inespecífics d'unió a anticossos de la membrana amb **3%** d'albumina bovina (**BSA**) al **en TBS-T** durant **1 hora** en **agitació**.
- 7) **Rentar** amb **TBS-T** per eliminar la solució de bloqueig.

3.6. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS PRIMARI

- 1) **Preparar una cambra humida** per incubar la membrana amb els anticossos:
 - a. Posar paper Parafilm dins d'una placa de Petri de mida gran. És important que quedi ben pla.
 - b. Col·locar dos rotlles de paper de filtre mullats en els laterals on no cobreix el Parafilm.. Aquests mantindran la humitat dins la placa tapada.
 - c. Assecar bé la zona del Parafilm on hi haurà la membrana.
- 2) **Preparar l'anticòs primari** a la concentració adequada en una solució del 5% de BSA en TBS-T.
- 3) Col·locar la **membrana** i cobrir-la amb **1mL d'anticòs primari**.
- 4) **Incubar** durant tota la **nit** a **4°C**.

- 5) Un cop passat el temps, treure amb cura els rotlles de paper mullat.
- 6) **Transferir** la **membrana** amb l'ajuda d'unes pinces a un recipient que contingui **TBS-T**.
- 7) **Recollir l'anticòs primari** amb una micropipeta i preservar-lo a 4°C.
- 8) Fer **3 rentats de 7 minuts** a **TA** amb **TBS-T** en **agitació**.

Taula 11. Anticossos primaris utilitzats en WB.

Anticossos	Referència	Espècie d'origen	Dilució
Cdh1	Fet i cedit per R. Freire	Ratolí	1:1000
CDK4	Santa Cruz; sc-709	Conill	1:500
Chk1	Santa Cruz; sc-8408	Ratolí	1:500
CK20	Cell Signaling; #13063S	Conill	1:1000
Ciclina A2	Santa Cruz; sc-751	Conill	1:500
Ciclina B1	Santa Cruz; sc-245	Ratolí	1:200
GAP120	Santa Cruz; sc-63	Ratolí	1:200
Làmina B	Santa Cruz; sc-6217	Cabra	1:500
ORF1p	Merck; MABC1152	Ratolí	1:1000
OZF	Sigma; HPA003358	Conill	1:1000
p21	Millipore; OP-64	Ratolí	1:1000
p53	Epredia MS-186-RQ	Ratolí	1:1000
pChk1 (S296)	Cell Signaling; #2349	Conill	1:1000
pMCM2 (S40)	abcam; ab133243	Conill	1:7500
γH2AX (S139)	Millipore; 05-636	Ratolí	1:500
Polimerasa α	Santa Cruz; sc-5921	Cabra	1:200
RAD51	Santa Cruz; sc-8349	Conill	1:200

3.7. INCUBACIÓ AMB L'ANTICÒS SECUNDARI

- 1) **Preparar l'anticòs secundari** a la concentració adequada en una solució del 5% de llet en pols en TBS-T.
- 2) Transferir la membrana del TBS-T a la cambra humida.
- 3) **Cobrir** la membrana amb l'**anticòs secundari**.
- 4) **Incubar 1 hora a TA**.
- 5) Fer **2 rentats** de 7 minuts a TA amb **TBS-T** de 7 minuts en agitació.
- 6) Fer **1 rentat** de 7 minuts a TA amb **TBS** en agitació.

Taula 12. Anticossos secundaris utilitzats.

Anticossos	Referència	Dilució
α-Conill IgG (H+L) HRP (peroxidasa de rave rusticà)	BioRad; 1706515	1:3000
α-Ratolí IgG (H+L) HRP	BioRad; 1706516	1:3000
α-Cabra IgG (molècula sencera) -Peroxidasa	BioRad; A5420	1:10000

3.8. REVELAT

- 1) Transferir la **membrana** amb les pinces a dins d'una **funda de plàstic** oberta.
- 2) **Preparar la solució de revelat**: afegir el volum necessari dels reactius A (fotosensible) i B d'EZ-ECL (20-500-120 [*Biological Industries*]) dins d'un tub cònic i barrejar bé per inversió.
- 3) **Cobrir** la **membrana** amb la **solució de revelat**.
- 4) Tancar la funda de plàstic. En aquest moment, amb l'ajuda d'un paper, es fa una mica de pressió sobre les membranes per expulsar les bombolles i l'excés de reactiu deixant les dos bandes del plàstic ben unides.
- 5) **Obtenir** les **imatges** amb el chemidoc™ de BioRad.

4. CITOMETRIA DE FLUX

4.1. RECOLLIDA DE MOSTRES PROTOCOL DE RECOLLIDA DE MOSTRES

Els volums que s'especifiquen en aquest protocol són per treballar amb cèl·lules sembrades en plaques de 6 pous o p35.

- 1) **Recollir el medi** de cultiu de les cèl·lules en un tub cònic de centrífuga de 15mL.
- 2) Fer 1 **rentat amb 1mL de PBS (TA)**.
- 3) **Aspirar el PBS**. Si les cèl·lules no estan gaire enganxades (tractament amb nocodazole*) també es pot recollir el PBS amb cura i afegir-lo al tub que conté el medi de cultiu per evitar la possible pèrdua d'aquestes cèl·lules (pas 1). *El nocodazole atura a les cèl·lules en mitosi. En aquesta fase les cèl·lules estan poc adherides a la superfície de la placa i adopten un fenotip arrodonit.
- 4) Afegir **400µL de tripsina (TA)** a la placa, **incubar com a màxim 6-7'**, i una vegada desenganxades, **neutralitzar l'enzim afegint medi** de cultiu suplementat amb FBS 10%.
- 5) **Recollir les cèl·lules** en el tub cònic.
- 6) Centrifugar a **660rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 7) **Aspirar el sobrenedant** i afegir **3mL de PBS fred (4°C)**. No apurar al aspirar.
- 8) Centrifugar a **660rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 9) **Aspirar el sobrenedant** i afegir **480µL de PBS fred (4°C)**. A l'aspirar, deixar uns 20µL del sobrenedant.
- 10) **Resuspendre** bé el *pellet* de cèl·lules. És molt important perquè no s'agreguin durant la fixació. Fer els passos 10 i 11 seguits per cada mostra.
- 11) Fixar les cèl·lules: afegir **4.5 mL d'etanol al 70% fred (-20 °C)** gota a gota en agitació (amb l'agitador tipus vòrtex a velocitat molt baixa) .
- 12) **Incubar a -20 °C**. Mínim 2 hores.

4.2. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

REACTIUS IMMUNOFLUORESCÈNCIA

PBS	145 mM NaCl
	6 mM Na ₂ HPO ₄
	2.5 mM NaH ₂ PO ₄

PBS-T: 0.05% Tween 20 en PBS

Solució desnaturalitzadora (en PBS)	2M HCl
	0.1% Tritó X-100

Solució de bloqueig: 3% BSA en PBS-T.

Tampó Borat pH 8.5:

- Solució 1: 100mM Na₂BO₄O₇
- Solució 2: 100 mM H₃BO₃

Utilitzar la segona solució per ajustar el pH de la primera (s'utilitza gairebé 1 litre).

Solució iodídica (En PBS)	1% Iodur de propidi
	0.1 µg/µL de RNAsa A

PROTOCOL D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Campana
d'extracció

- 1) Centrifugar les cèl·lules que estan ja fixades amb etanol a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 2) **Decantar i descartar el sobrenedant.**
- 3) Afegir **3mL de PBS-T**. Per eliminar les restes d'etanol i permeabilitzar les cèl·lules amb el detergent.
- 4) Centrifugar a **660rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 5) **Aspirar el sobrenedant.**
- 6) Incubar les cèl·lules amb **2mL de solució desnaturalitzadora durant 75 minuts**. Afegir primer 1mL a totes les mostres i començar a comptar el temps. Quan s'han resuspès tots els *pellets* de cèl·lules afegir l'altre mL de solució.
- 7) Neutralitzar amb **4mL de tampó Borat pH 8.5**.
- 8) Centrifugar a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 9) **Aspirar el sobrenedant . NO APURAR**. Deixar uns 0.5mL.
- 10) Afegir **4mL de tampó Borat pH 8.5** .
- 11) Centrifugar a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 12) **Aspirar el sobrenedant. NO APURAR**. Deixar uns 0.5mL.
- 13) Afegir **3mL de PBS-T**.
- 14) Centrifugar a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 15) **Aspirar el sobrenedant**.
- 16) Afegir **1mL de solució de bloqueig, resuspendre** suaument amb la pipeta i **transferir** les mostres a **tubs Eppendorf** i incubar de 30 minuts a **1h** amb agitació suau.
- 17) Centrifugar a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 18) **Aspirar el sobrenedant**.
- 19) **Incubar amb l'anticòs primari 1h a TA** (entre **50µL** i **100µL**).

α-BrdU [abcam 6326 Rata. Dilució: 1:500]

α-MPM2 [Millipore 05-368 Ratolí. Dilució: 1:1000] *

En solució de

bloqueig

- 20) Centrifugar a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts**.
- 21) **Aspirar el sobrenedant**.
- 22) Rentar amb **1mL de PBS-T**.

- 23) Centrifugar a **660rcf a 4°C** durant **5 minuts**.
- 24) **Aspirar el sobrenedant** .
- 25) **Incubar** amb l'anticòs **secundari 1h a TA** (entre **50µL** i **100µL**) en **OBSCURITAT**.

α-Rata 488 (BrdU) [Dilució: 1:500]
α-Ratolí 647 (MPM2) [Dilució: 1:1000] * | En **PBS-T**

- 26) Centrifugar a **660 rcf a 4°C** durant **5 minuts**.
- 27) **Aspirar el sobrenedant**.
- 28) Rentar amb **1mL** de **PBS-T**.
- 29) Centrifugar a **660 rcf a 4°C** durant **5 minuts**.
- 30) **Aspirar el sobrenedant**.
- 31) Resuspendre els *pellets* de cèl·lules en **400-750µL** (en funció de la quantitat de cèl·lules) de **solució iodídica**.
- 32) **Tapar** la gradeta amb paper d'alumini i **incubar** durant **30 minuts'** a **37 °C**.
- 33) **Conservar a 4°C** (màxim 2 dies a la nevera).

* En el cas que només es vulgui analitzar la fase S, no cal fer el marcatge amb MPM2

5. DNA FIBER ASSAY

5.1. RECOLLIDA DE MOSTRES

REACTIUS RECOLLIDA DE MOSTRES

Tampó spreading	0.5% SDS
	200 mM Tris-HCl pH 7.5
	50 mM EDTA

PROTOCOL DE RECOLLIDADE MOSTRES

És important que tot el material, tampons (4°C) i ambient de treball estigui tot fred: a) en aquest protocol la tripsina s'inactiva amb el fred i no amb medi de cultiu amb 10% FBS; b). és important deixar el PBS a la nevera després de cada us; c) abans de començar, posar els tubs Eppendorf en gel perquè ja estiguin freds en el moment de l'experiment; d) engegar l'aire condicionat perquè la sala estigui freda abans de procedir amb l' *spreading*. Com a mínim el dia abans convé preparar 5L de PBS 1X estèril.

Els volums que s'especifiquen en aquest protocol són per treballar amb cèl·lules sembrades en plaques de 12 pous. Per cada condició que es té es sembra un altre pou amb cèl·lules que no es marcaran ni tractaran. Aquestes cèl·lules no marcades es barregen amb les marcades per a diluir les fibres de cada condició al portaobjectes i que a la imatges no quedin les marcades unes sobre les altres dificultant l'anàlisi. A la condició marcada i la no marcada hi ha d'haver aproximadament el mateix nombre de cèl·lules al moment de recollir.

Gel

- 1) **Fer 3 rentats amb PBS fred i estèril.**
- 2) **Tripsinitzar les cèl·lules amb 200µL de tripsina.** Important que totes les cèl·lules estiguin desenganxades abans del pas següent.
- 3) Recollir les cèl·lules amb **800µL de PBS fred i estèril i transferir-les a un tub Eppendorf.** Es distribueixen els 800µL entre la condició i el pou de no marcades corresponent. Ajuntem marcades i no marcades al mateix eppendorf i es posa immediatament en gel per inactivar la tripsina.
- 4) Centrifugar a **660 rcf a 4°C durant 5 minuts.** Posar el tub



Eppendorf sobre un tub cònic de 15 mL sense tap a la centrífuga (així el *pellet* de cèl·lules queda més compactat). Per evitar que el *pellet* es resuspengui, amb molta cura traslladar el tub

Eppendorf al gel, concretament a l'espai que prèviament hem marcat amb un Eppendorf buit.

- 5) **Aspirar el sobrenedant amb molta cura** (no apurar: deixar 20µL aproximadament).
- 6) **Resuspendre el *pellet* amb 200µL de PBS fred estèril.**

5.2. SPREADING I FIXACIÓ

PROTOCOL D'SPREADING I FIXACIÓ

L'*spreading*+*fixació* es fa just després de recollir les mostres perquè les cèl·lules amb el temps es poden fer malbé. Es fa en tandes de 5 portaobjectes cada una. Necessitem 5 portaobjectes bons per cada condició i que siguin de dues tandes diferents (No fer els 5 només d'una). El laboratori ha d'estar fred, però l'aire condicionat no pot impactar directament a la mostra perquè es podria assecar.

- 1) Col·locar **5 portaobjectes** sobre un paper de filtre nou..
- 2) **Assegurar-nos que la la mostra** està ben resuspensa amb la pipeta.
- 3) Depositar **4µL** de mostra en cadascun dels portes. Es posen amb la mateixa punta i ràpidament es torna la mostra al gel.
- 4) Afegir **8µL** de **tampó d'*spreading*** sobre la gota de mostra i **barrejar bé** fent cercles **amb la punta** de la pipeta. Fins que la mostra quedi viscosa. i en acabar la primera mostra es posa un cronòmetre cap amunt i ens anem fixant en el temps quan acabem cada porta.
- 5) Incubar **2 minuts a TA**. Cal controlar amb el cronòmetre exactament el temps per cada portaobjectes. És important que els portaobjectes estiguin ben plans sobre la superfície de treball.
- 6) **Col·locar els portaobjectes** amb la mostra en una **inclinació de 15°** sobre la superfície de treball.

- campana d'extracció
- 7) Deixar que la **gota de mostra es vagi desplaçant cap avall** d'entre **2 a 5 minuts**. Es descarten els portaobjectes en que la gota no ha baixat en el temps que toca o ha deixat petites acumulacions en el recorregut. Al final s'han d'obtenir 5 portaobjectes perfectes per cada condició.
 - 8) **Deixar assecar la gota escampada pel portaobjectes durant 10 minuts**. Anem guardant les mostres entre les dues fustes (respectant la inclinació de 15° perquè la gota no retrocedeixi).
 - 9) **Fixar les mostres dels portaobjectes amb metanol:àcid acètic (3:1) durant 10 minuts**.
 - 10) **Deixar assecar** les restes de la solució fixadora 5-10'.

Un cop s'ha acabat aquest procés, les mostres es poden conservar a 4°C fins a 1 mes.

5.3. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

PROTOCOL D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Utilitzar PBS estèril. Cal tenir molta cura al manipular les mostres perquè les fibres de DNA es trenquen molt fàcilment. Netejar les cubetes amb sabó després de la desnaturalització, o bé amb aigua destil·lada i eixugar-les ràpidament amb paper de filtre. Després de cadascun dels rentats s'agafen els portaobjectes i se'ls hi dona dos cops damunt del paper de filtre per eliminar l'excés de solució. Cal procedir ràpid perquè no s'assequin els primers portaobjectes que s'han tractat (uns 30 segons aproximadament).

- campana d'extracció
- 1) **Fer 3 rentats amb PBS** de com a mínim **1 minut**.
 - 2) **Fer 1 rentat amb tampó de desnaturalització** (2.5M HCl en H₂O_{MQ}).
 - 3) **Incubar amb tampó de desnaturalització durant 80 minuts'** a **TA**.
 - 4) **Neutralitzar fent 4 rentats amb PBS**. L'últim de **5 minuts'**.
 - 5) **Rentar amb sol·lució de bloqueig** (0.1% tritó-X100, 1% BSA en PBS).
 - 6) **Bloquejar (200µL/mostra)** un mínim de 45 minuts a TA.

- 7) **Incubar** amb l'anticòs **primari** (CIdU [α -BrdU abcam 6326 Rat. Dilució: 1:100]) durant **75 minuts a TA (100 μ L/mostra)**.
- 8) **Rentar** amb **0.1% Tween 20 en PBS**.
- 9) **Fer 2 rentats** amb **PBS**.
- 10) **Crosslinking** amb 4% paraformaldehid en PBS (**100 μ L/mostra**) durant **10 minuts en obscuritat**.

A partir d'ara tot en obscuritat

- 11) **Fer 3 rentats** amb **PBS**.
- 12) **Incubar** amb l'anticòs **secundari** (CIdU) [α -Rat 555 dilució: 1:500] durant 1 h a TA (**100 μ L/mostra**).
- 13) **Fer 3 rentats** amb **PBS**.
- 14) **Incubar** amb l'anticòs **primari** (**200 μ L/mostra**) durant tota la nit a **4°C** (IdU [α -BrdU BD biosciences Cat n° 34758 Mouse. Dilució: 1:200]).
- 15) **Rentar** amb **0.1% Tween en PBS**.
- 16) **Fer 2 rentats** amb **PBS**.
- 17) **Incubar** amb l'anticòs **secundari** (IdU) [α -mouse 488. Dilució: 1:500] durant **1h a TA (100 μ L/mostra)**.
- 18) **Fer 5 rentats** amb **PBS**.
- 19) **Posar 5 portas** (eixugar be i Després fer ràpid) sobre un **paper de filtre net**. Els passos 19 a 21 es fan en tandes de 5 portaobjectes cada una.
- 20) **Muntar les preparacions amb cobreobjectes de 24x60 mm 50 μ L de Mowiol**
- 21) **Eixugar l'excés de Mowiol** amb un paper de filtre (**2 vegades**).
- 22) A les 2h **segellar** el cobreobjectes al amb **pintaungles**.
- 23) Observar les preparacions amb el microscopi Zeiss LSM880 (Unitat de microscòpia òptica avançada-Campus clínic CCiTUB de la Universitat de Barcelona) i prendre imatges. Com a **màxim les immunofluorescències aguanten 48 hores** en condicions òptimes.

6. IMMUNOFLUORESCÈNCIA (IF)

El protocol d'IF varia en funció del tipus d'experiment que s'està duent a terme.

Les imatges d'aquesta tesi s'han obtingut amb el microscopi Zeiss LSM880 (Unitat de microscòpia òptica avançada-Campus clínic CCiTUB de la Universitat de Barcelona), i han estat tractades amb el programa ImageJ.

6.1. IF PER HIGH CONTENT SCREENING.

S'han utilitzat les plaques especials *μ-Slide 8 Well high 80806* (ibidi) amb les que la manipulació ha de ser molt curosa perquè les cèl·lules se'n desenganxen fàcilment. D'aquesta manera el líquid dels pous s'ha de decantar per inversió i el que resta s'ha d'eliminar posant la placa a l'inrevés sobre paper de filtre. No obstant quan a continuació s'ha de treballar amb un volum precís (tractaments o anticossos) cal aspirar el líquid que queda inclinant la placa i recollint suaument el volum per la paret del pou amb una micropipeta de 1000μL amb tres puntes: 1000-100-10 μL.

FIXACIÓ

- 1) Fixar amb **4% paraformaldehyd** en PBS durant 10 minuts **a la campana d'extracció de gasos**. Assegurar-se que el volum de medi de cultiu final en el pou en el moment de la fixació és de 300μL i afegir-hi 100μL del paraformaldehyd al 16% per tenir una concentració final de 4%.
- 2) Fer 2 rentats amb **PBS-Tween 20 (0.01%) estèril**.
- 3) Preservar a 4°C a la foscor.

IMMUNOFLUORESCÈNCIA

El protocol varia segons si s'utilitzen anàlegs de timidina o no. Si es fa servir CldU cal fer un pas de desnaturalització amb HCl (conjuntament amb la permeabilització), i si s'empra EdU cal fer la reacció anomenada *click reaction*. En el cas de no utilitzar-ne cap dels dos aquests passos no calen. Les permeabilitzacions i rentats es fan amb un volum de 200 μL. Les incubacions amb anticossos o la *click reaction* es fan amb 100μL, que es poden reduir fins a un volum de 70μL en agitació.

REACTIUS D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Solució desnaturalitzadora (en PBS)	2M HCl 0.2% Tritó X-100
<i>Click Reaction*</i>	100mM Tris-HCl, pH 8 2mM CuSO ₄ 1µM Alexa488-Azida (Invitrogen; A10266) 100mM Àcid ascòrbic

PBS-T: 0,01 % Tween 20 en PBS

* És molt important afegir els reactius en aquest ordre (de dalt a baix) a aigua ultrapura.

PROTOCOL IMMUNOFLUORESCÈNCIA

- 1) **Permeabilitzar** les cèl·lules amb 200 µL de **0.1% tritó X-100 en PBS estèril en agitació durant 30 minuts**.
 - 1.1) **Permeabilitzar i desnaturalitzar** amb la solució permeabilitzadora durant **30 minuts a TA a la campana d'extracció de gasos**. Aquest pas substitueix l'anterior si es vol detectar CldU, IdU o BrdU.
 - 1.2) Fer **5 rentats** amb **PBS-T**. En cas de no utilitzar EdU i no fer la *click reaction* passar al pas 3.
 - 1.3) Incubar amb el reactiu de la ***click reaction*** durant **30 minuts en agitació en obscuritat**.
- 2) Fer **3 rentats** amb **PBS-T** ..
- 3) Incubar amb l'**anticòs primari preparat en medi de cultiu suplementat amb 5% BSA filtrat** durant **1h a TA**. En caixa folrada amb paper d'alumini.
- 4) Fer **3 rentats** amb **PBS-T** .

- 5) Incubar amb l'**anticòs secundari preparat en medi de cultiu suplementat amb 5% BSA** filtrat durant **1h a TA**. En caixa folrada amb paper d'alumini.
- 6) Fer **3 rentats amb PBS-T**
- 7) Incubació amb **HCS CellMask™** (Invitrogen; H32721) **1:2000 preparat en medi de cultiu amb 5%BSA** filtrat durant **15 minuts a TA**.
- 8) Fer **3 rentats amb PBS-T**.
- 9) Muntatge amb medi de muntatge ibidi amb DAPI. (2 gotes per pou), Es tracta d'un medi de muntatge que ja porta incorporat el DAPI (50011 [ibidi]).

En el cas de fer una **immunofluorescència** per detectar **ssDNA** permeabilitzar amb 0.1% tritó X-100 en PBS estèril en agitació durant 30 minuts.

6.2. IMMUNOFLUORESCÈNCIA PER CidU/IdU

Aquesta immunofluorescència s'ha realitzat en cobreobjectes i en plaques *μ-Slide 8 Well high* 80806 (ibidi). El protocol és el mateix, canviant els volums i el muntatge final. Mirar punt 6.1 per veure com procedir amb els rentats, el volum i el muntatge final amb medi de muntatge+DAPI 50011 (ibidi).

En el cas de fer la immunofluorescència en cobreobjectes, aquests es recullen i s'introdueixen en plaques de 24 pous (un per pou) amb PBS-T.

FIXACIÓ

- 1) Rentar amb **PBS-T estèril**.
- 2) Fixar amb **70%etanol durant 10 minuts**. 40μL/cubreobjecte.
- 3) Fer 2 rentats amb **PBS-T**.
- 4) Preservar a 4°C a la foscor. En el cas dels cobreobjectes es fer-ho en les plaques de 24 pous cobertes amb paper d'alumini. Es recomana fer la immunofluorescència el més aviat possible per evitar contaminacions.

REACTIUS IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Solució desnaturalitzadora (En PBS)	2M HCl
	0.2% Tritó X-100

Buffer Borat pH 8.5:

- Solució 1: 100mM Na₂BO₄O₇
- Solució 2: 100mM H₃BO₃

Utilitzar la segona solució per ajustar el pH de la primera (s'utilitza gairebé un litre).

PROTOCOL

- 1) **Permeabilitzar i desnaturalitzar** amb la solució permeabilitzadora durant **30 minuts** a **TA** a la campana d'extracció de gasos. Es fa a la placa de 24 pous en un volum de 500µL.
- 2) **Eliminar la solució desnaturalitzadora** i fer **3 rentats** amb **buffer borat**.
- 3) Fer **3 rentats** amb tampó **borat**.
- 4) Fer **3 rentats** amb **PBS-T**.
- 5) **Bloquejar** amb **1% BSA en PBS** durant **30 minuts** en estàtic a TA.
- 6) Incubar amb l'**anticòs primari preparat en 1% BSA en PBS** durant **1h a 37°C** en unacambra humida S'utilitzen 40µL de la solució de l'anticòs per cada cobreobjectes.
- 7) **Rentar** amb **1% BSA en PBS** durant **5 minuts** en **agitació**.
- 8) Incubar amb l'**anticòs secundari preparat en 1% BSA en PBS** durant **45 minuts a 37°C**. L'anticòs s'incuba igual que el primari.
- 9) **Rentar** amb **1% BSA en PBS** durant **5 minuts** en **agitació**.
- 10) **Rentar** amb **PBS** durant **5`en agitació**.
- 11) Incubar amb **DAPI** (Sigma-Aldrich; D9564) preparat a 0.2µg/mL en H₂O_{MQ} durant 3 minuts*.

12) Muntar els cubreobjectes sobre portaobjectes amb **4µL de Mowiol** (Sigma-Aldrich; 81381)*. Primer es posen les gotes de Mowiol sobre el portaobjectes, es renten els cobreobjectes en l'aigua agafant-los amb les pinces, després s'assequen per capil·laritat col·locant el cantó del cobreobjectes en paper de filtre i es munten sobre les gotes de Mowiol.

* Si la immunofluorescència és de *High Content Screening* els passos 10 i 11 es substitueixen pel muntatge directe amb medi de muntatge ibidi amb DAPI (ibidi; 50011).

6.3. IMMUNOFLUORESCÈNCIA PER p21 I p21/53BP1/EdU

FIXACIÓ

- 1) Rentar amb **PBS-T (0.01%)**.
- 2) Fixar amb **4% paraformaldehyd** en PBS **durant 10 minuts a la campana d'extracció de gasos**. Volum de 40µL/cobreobjecte.
- 3) Fer 2 rentats amb **PBS-T**.
- 4) Preservar a 4°C a la foscor. Fer-ho en plaques de 24 cobertes amb paper d'alumini. Es recomana fer la immunofluorescència el més aviat possible per evitar contaminacions.

REACTIUS IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Click Reaction*	100mM Tris-HCl, pH 8
	2mM CuSO ₄
	1µM Alexa488-Azida, A10266 (Invitrogen)
	100mM Àcid ascòrbic

* És molt important afegir els reactius en aquest ordre (de dalt a baix) a aigua ultrapura.

PROTOCOL IMMUNOFLUORESCÈNCIA

- 1) **Permeabilitzar amb 0.1% tritó X100 en PBS estèril en agitació durant 30 minuts.** Es fa a la placa de 24 pous en un volum de 500µL.
- 2) Fer **3 rentats amb PBS-T.** Si no s'utilitza EdU, passar al pas 4.
- 3) Incubar amb el reactiu de la **click reaction** durant **30 minuts en agitació** a la foscor. Es fa a la placa de 24 pous en un volum de 500µL.
- 4) Fer **3 rentats amb PBS-T.**
- 5) Incubar amb **anticòs primari preparat en medi de cultiu suplementat amb 5% BSA** filtrat durant **1h a TA** en una cambra humida. S'utilitzen 40 µL de la solució de l'anticòs per cada cobreobjecte.
- 6) Fer **3 rentats amb PBS-T.**
- 7) Incubar amb l'**anticòs secundari preparat en medi de cultiu suplementat amb 5% BSA** filtrat durant **1h a TA.**

- 8) Fer **3 rentats amb PBS-T.**
- 9) **Rentar amb PBS.**
- 10) Incubació amb **DAPI** (Sigma-Aldrich; D9564) preparat a 0.2 µg/mL durant **3 minuts.**
- 11) Muntar els cobreobjectes sobre portaobjectes amb **4 µL de Mowiol** (Sigma-Aldrich; 81381).

Anticossos

Taula 13. Anticossos primaris utilitzats en immunofluorescència.

Anticossos	Referència	Espècie d'origen	Dilució
53BP1	abcam; ab36823	Conill	1:500
BrdU	abcam; ab6326	Rata	1:500
CK20	Cell Signaling; #13063S	Conill	1:1000
CldU (BrdU)	abcam; ab6326	Rata	1:500
IdU (BrdU)	BD biosciences; 34758	Ratolí	1:200
ORF1p	Merck; MABC1152	Ratolí	1:1000
p21	Millipore; OP-64	Ratolí	1:1000
γH2AX (S139)	Millipore; #05-636	Ratolí	1:3000
RPA32	Cell Signaling; #2208	Rata	1:1000

Els anticossos secundaris depenen de l'espècie on s'ha generat l'anticòs primari (taula 13). Són de *Invitrogen* i estan conjugats amb els fluoròfors: Alexa488, Alexa 555 o Alexa 647. La dilució a la qual s'han utilitzat per norma general és de 1:500 (si no és així està indicat al protocol corresponent).

7. RT-qPCR

7.1. EXTRACCIÓ DE RNA

En aquesta tesi, l'extracció de RNA s'ha realitzat amb el Kit RNeasy Mini kit 74104 (QIAGEN) a la campana d'extracció de gasos (amb bidó de residus de mercaptoetanol).

Preparació del material: 1) autoclavar dues vegades les puntes de pipeta i els tubs Eppendorf (de 1,5 i 2 mL); 2) **netejar** bé amb **RNAse away** la superfície de treball, pipetes, gradetes, caps de puntes, xeringues (1 mL), agulles i guants.

Preparació de solucions:

1) Etanol 70%: es prepara a partir d'etanol pur i H₂O-DEPC 0.01% (desproteïntant) en agitació tota la nit.

2) Tampó RLT amb mercaptoetanol (BME) (10µL/mL): afegir el mercaptoetanol al volum que necessitem de tampó RLT i agitar bé.

Partim de plaques p100 al 70% de confluència.

PROTOCOL EXTRACCIÓ DE RNA

Gel

- 1) Fer **3 rentats** amb **5 mL** de **PBS** fred (**4°C**).
- 2) Afegir **600µL** de tampó **RLT** amb BME i rascar enèrgicament amb la rasqueta (una per mostra). per lisar les cèl·lules.
- 3) **Recollir** els lisats (amb compte perquè són molt espesos) en tubs **Eppendorf** de 2mL i ràpidament deixar en gel.
- 4) Fer passar les mostres per **xeringa 10 vegades**. Calcular bé el **volum** final de lisat perquè després s'hi ha d'afegir el mateix volum d'etanol 70%.
- 5) Afegir el **mateix volum d'etanol 70%**. Un cop s'afegeix l'etanol es pot treballar a TA.
- 6) **Resuspendre** bé les mostres i transferir exactament **700 µL** a les **columnes** (no hi cab més volum) . Si encara queda mostra, es podrà transferir a la columna una vegada hagin passat els primers 700 µL .
- 7) Centrifugar les columnes tapades a **8000g durant 15minuts a TA**.
- 8) Descartar el *flow-through* i afegir **700µL** de tampó **RW1** (rentat).

- 9) Centrifugar a **8000g durant 15 segons a TA.**
- 10) Descartar el *flow-through* i afegir **500µL** de tampó **RPE**.
- 11) Centrifugar a **8000g durant 15 segons a TA.** .
- 12) Descartar el *flow-through* i afegir **500µL** de buffer **RPE**.
- 13) Centrifugar a **8000g durant 2 minuts a TA.**
- 14) **Canviar el tub** de sota les columnes.
- 15) Centrifugar a **màxima velocitat** (14000g) **durant 1 minut a TA** per assecar la membrana de la columna (opcional)
- 16) Canviar els tubs per tubs Eppendorf estèrils i afegir entre **30-50µL d'H₂O RNAsa free** per eluir el RNA. Per defecte afegir **40µL**.
- 17) Centrifugar a **8000g durant 1 minut a TA.**
- 18) Preservar a **-20°C**. Mesurar la concentració de RNA amb un *nanodrop*.

7.2. RETROTRANSCRIPCIÓ (RT)

En aquesta tesi, la retrotranscripció se realitza amb el kit *High capacity cDNA reverse transcription* (4368814 Thermo Fisher).

Preparació: 1) autoclavar dues vegades les puntes de pipeta i els tubs Eppendorf PCR (de 0,2 mL); 2) netejar bé la superfície de treball; 3) fer els càlculs: per la retrotranscripció s'utilitza 1µg de RNA i s'afegeix H₂O RNase free fins a 10µL. 4) posar en gel les solucions del *kit*.

Preparar la barreja de reacció (MIX). Es prepara per una mostra més a partir de 15, per dues mostres més).

Taula 14. Composició de la MIX per fer la retrotranscripció

Tampó 10X	2µL/mostra
dNTPs 25X	0.8µL/mostra
Primers 10X	2µL/mostra
H₂O RNase free*	4.2µL/mostra
Transcriptasa**	1µL/mostra

*Del *Kit* d'extracció d'RNA

**NO fer servir agitador tipus vòrtex.

PROTOCOL RETROTRANSCRIPCIÓ

Gel

- 1) Afegir els volums calculats anteriorment d'H₂O RNase free en el tubs Eppendorf PCR (0,2 mL).
- 2) Afegir **10µL** de la **MIX**.
- 3) Afegir el volum calculat de cada **mostra** corresponent a 1 µg de RNA. Donar petits cops per mesclar i fer un pols amb la centrífuga. No utilitzar l'agitador tipus vòrtex. El programa del termociclador consta dels següents passos:

RETROTRANSCRIPCIÓ

- 1- 10' 25°C
- 2- 2h 37°C
- 3- 5' 85 °C
- 4- FOREVER 4°C

7.3. qPCR

Preparació: 1) autoclavar les puntes de pipeta i els tubs Eppendorf PCR (de 0,2 mL) 2) fer els càlculs tenint en compte que cal fer triplicats per cada gen; 3) treballar en gel (opcional); 4) descongelar els primers i els reactius protegint-los de la llum amb paper d'alumini.

PROTOCOL qPCR

- 1) **Preparar** la dilució del **cDNA**, barrejar bé amb l'agitador tipus vòrtex i fer un pols amb la centrífuga.
Fer una dilució 1/20 en H₂O DNAsa *free* del cDNA obtingut a la retrotranscripció. El volum total corresponent de dilució per cada condició (gen) és de 6 µL al fer-se per triplicat (2µL per pou), però s'aconsella preparar-ne 5-10µL de més.
- 2) **Preparar** la barreja de reacció (**MIX**), mesclar bé amb l'agitador tipus vòrtex i fer un pols amb la centrífuga. Es prepara una MIX per gen.

Taula 14. Composició d'ela MIX per fer la qPCR.

MIX 2X	6.25µL/mostra
Primer FW 10µM	0.625µL/mostra
Primer RV 10µM	0.625/mostra
H₂O <i>nuclease free</i>	3µL/mostra

Abans d'afegir el cDNA i la MIX als tubs Eppendorf, encendre el termociclador.

- 3) Posar **2µL** de la dilució 1/20 de **cDNA** a cada pou. Per la paret lateral.
- 4) Posar **10.5µL** de la **MIX**.
- 5) Tapar els tubs i fer un pols amb la centrífuga. .

q-PCR	
1-	Preincubació: 10' 95°C
2-	40 cicles: 30" 95°C 15" 60°C 30" 72°C
3-	Melting: 10" 95°C 60" 65°C 1" 97°C Continu

8. ATAC-seq

El protocol que s'ha utilitzat en aquesta tesi està desenvolupat en l'article de Buenrostro, Wu, Chang i Greenleaf ⁶⁵⁶. Aquesta tècnica consta de diversos passos: es recullen les cèl·lules, es lisen a fi de recuperar únicament els nuclis, es fa la reacció de transposició, s'extreu el DNA, s'amplifica per PCR, i es seqüencia per *Next Generation Sequencing*. En aquesta tesis, l'amplificació, l'addició dels adaptadors i la seqüenciació s'ha fet a la Unitat de Genòmica del Centre de Regulació Genòmica (CRG) de Barcelona. S'ha seqüenciat amb l'aparell NovaSeq 6000Dx d'Illumina i s'han obtingut 2x50 milions de lectures (*reads*) per mostra. L'anàlisi dels resultats s'ha fet en col·laboració amb el Dr. Pere Llinàs Arias (*Cancer Epigenetics Laboratory at the Cancer Cell Biology group*, Institut d'Investigació Sanitària Illes Balears [IdISBa]).

8.1. RECOLLIR CÈL·LULES I REACCIÓ DE TRANSPOSIÓ REACTIUS RECOLLIDA DE CÈL·LULES I REACCIÓ TRANSPOSIÓ

Tampó de Lisi	10mM Tris-HCl, pH 7.4
	10mM NaCl
	3mM MgCl ₂
	0.1% IGEPAL® (Merck, CA-630)

PROTOCOL RECOLLIDA DE CÈL·LULES I REACCIÓ TRANSPOSIÓ

Gel

- 1) **Centrifugar 50000 cèl·lules a 500 rcf durant 5 minuts a 4°C.**
El nombre de cèl·lules és molt important.
- 2) **Aspirar el sobrenedant.** Tots els aspirats es fan amb una pipeta amb tres puntes (com s'explica a l'apartat 6.1) per ser més precisos. Com que els *pellets* són molt petits i no es veuen, és útil centrifugar el doble de cèl·lules per determinar la posició on queden els *pellets* en els tubs i la seva consistència. Així s'evitarà la pèrdua de cèl·lules de les mostres de l'experiment en el procés d'aspirar el sobrenedant.
- 3) Rentar el *pellet* de cèl·lules amb **50µL de PBS fred.**
- 4) **Centrifugar a 500 rcf durant 5 minuts a 4°C.**
- 5) **Aspirar el sobrenedant.**
- 6) **Resuspendre el *pellet* de cèl·lules amb 50µL de tampó de lisi a 4°C.** El tampó de lisis s'ha de preparar el mateix dia.
- 7) **Centrifugar a 500 rcf durant 5 minuts a 4°C.**
- 8) **Aspirar el sobrenedant.**
- 9) Amb el *pellet* de cèl·lules en gel, **resuspendre'l amb el tampó de transposició.**

Taula 14. Composició del tampó de transposició.

TD (2X)	25µL/mostra
TDE1	2.5µL/mostra
H₂O RNase free	4.2µL/mostra

Gel

- 10) Incubar a **37 °C durant 30 minuts en agitació.**
- 11) **Purificar el DNA** amb el *Qiagen MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen, ID:28004).
- 12) **Eluir el DNA en 10µL d'*Elution buffer*.**
- 13) **Preservar el DNA a -20°C.**
- 14)

8.2. GENERACIÓ DE LES LLIBRERIES PER PCR

Un cop processades, les mostres foren enviades al Centre de Regulació genòmica (CRG). Allà, foren amplificades amb Novaseq6000(Illumina), 51nt(R1)-10nt(I1)-10nt(I2)-51nt(R2).

8.3. ANÀLISI DELS RESULTATS DE LA SEQÜENCIACIÓ

Les dades es van processar seguint les directrius del *Galaxy project ATAC-seq*⁶⁵⁷. Primer es van eliminar els adaptadors afegits per la seqüenciació de les seqüències obtingudes. Després amb bowtie2 es van alinear les seqüències contra el genoma de referència h38. Els arxius resultants foren curats, retirant les lectures del cromosoma mitocondrial, lectures duplicades i lectures amb una pobre qualitat d'emapeig (<30). La distribució de mida dels fragments va ser similar entre replicats, mostrant un pic a l'histograma al voltant dels 200 parells de bases, corresponents a regions flanquejades per nucleosomes. Els pics corresponents a regions accessibles es van detectar utilitzant MACS2 en un procés conegut com a *peak calling*. El *peak calling* es va fer seguint les recomanacions d'ENCODE fent la crida sobre els replicats corresponents de forma conjunta. Es van obtenir els pics en format *bedgraphs* amb els que es van generar arxius *bigwig* amb els que es poden visualitzar els histogrames i pics detectats al UCSC *genome browser*⁶⁵⁸. La intensitat dels BigWigs es va normalitzar contra la mitjana de cada mostra, a fi de compensar la seqüenciació diferencial entre replicats. A la figura de sota es detalla més concretament el tractament de les dades obtingudes amb la seqüenciació.

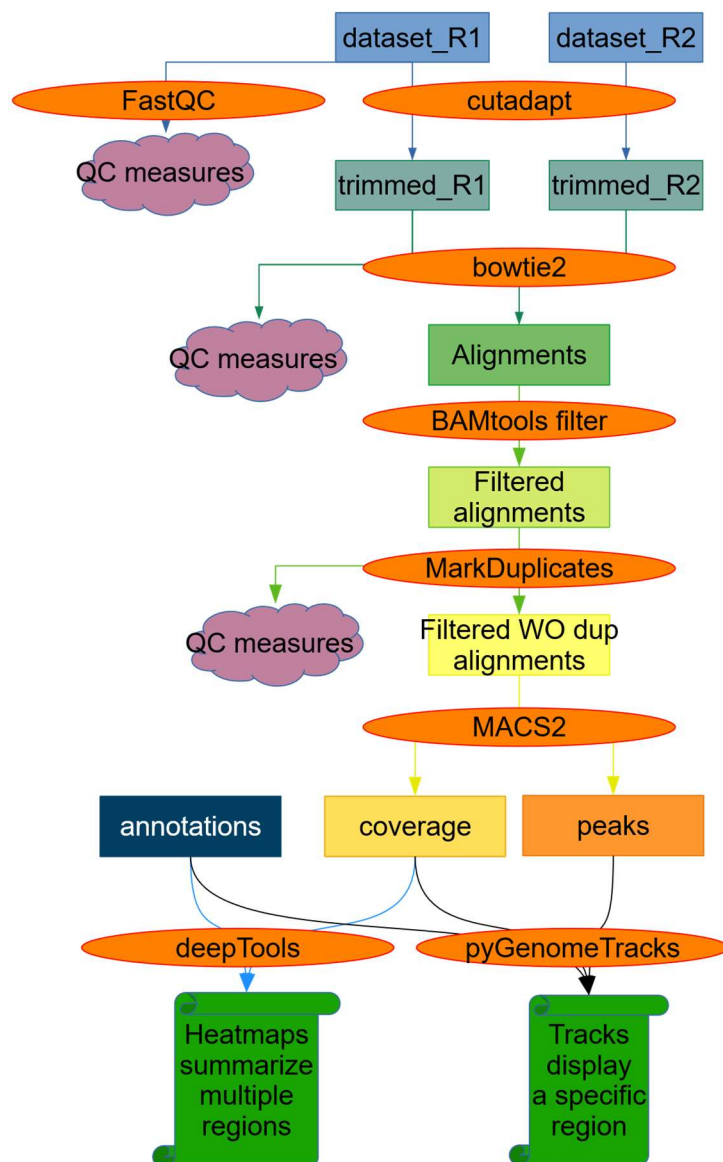


Figura 2. Esquema del tractament de les dades de seqüenciació. Extreta de ⁶⁵⁹.

Posteriorment es determinà si les regions detectades per ATAC-seq eren diferencialment accessibles comparant un o varis grups experimentals, per fer-ho, es va tornar a dur a terme el *peak calling* de forma individual amb els replicats. Així, s'establiren pics comuns i pics

exclusius de cadascuna de les combinacions de grups experimentals. Es considerava que dos grups experimentals presentaven un pic en comú si aquest es trobava en ambdós grups, i presentava una intersecció d'almenys un parell de bases. Entre els pics comuns, es calculà quins es trobaven diferencialment accessibles en base a dos criteris, un p-valor < 0.05 i un valor absolut de *log₂Fold Change* superior a 0.5 (que expressa un increment del 150% o un decrement del 33% de l'accessibilitat). La localització genòmica de tots els pics variables – els exclusius i els comuns diferencialment accessibles – es va determinar emprant el paquet *ChIPseeker* dins l'entorn de *Galaxy*. El processament de les dades es va dur a terme emprant els paquets de R de l'entorn de *tidyverse* i *Upset*.

9. ANÀLISI DELS RESULTATS

L'anàlisi dels resultats de citometria s'ha fet amb el programa FlowJo™ v10. Per analitzar les imatges de WB s'ha utilitzat el programa Image Lab v5. Per l'anàlisi de dades de RT-qPCR s'ha utilitzat el programa LightCycler® 96 de Roche. L'anàlisi de les imatges de microscòpia i del *High Content Screening* automatitzat s'ha fet amb el programa ImageJ.

L'anàlisi estadístic de les dades obtingudes s'ha dut a terme amb el programa GraphPad Prism T *software* v9. Específicament en el cas dels experiments de *High Content Screening* s'ha utilitzat el programa RStudio. Tant els anàlisis estadístics utilitzats en cada cas com la significació estadística estan detallats als peus de figura.

BIBLIOGRAFIA

1. Howard, A. & Pelc, S. R. Synthesis of Nucleoprotein in Bean Root Cells. *Nature* 1951 167:4250 **167**, 599–600 (1951).
2. Dubrovsky, J. & Ivanov, V. Celebrating 50 years of the cell cycle. *Nature* (2003) doi:10.1038/426759a.
3. Paweletz, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) doi:10.1038/35048077.
4. Morgan, D. O. *The Cell Cycle*. (New Science Press Ltd, 2007).
5. van den Heuvel, S. Cell-cycle regulation. *WormBook : the online review of C. elegans biology* 1–16 Preprint at <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.28.1> (2005).
6. Matthews, H. K., Bertoli, C. & de Bruin, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 23 74–88 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3> (2022).
7. Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A. & Mosieniak, G. A common signature of cellular senescence; does it exist? *Ageing Research Reviews* vol. 71 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101458> (2021).
8. Terzi, M. Y., Izmirlı, M. & Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular Biology Reports* vol. 43 1213–1220 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4065-0> (2016).
9. Yao, G. Modelling mammalian cellular quiescence. *Interface Focus* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0074> (2014).
10. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* **15**, (2014).
11. Cao, L. *et al.* Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. (2014) doi:10.6070/H4RF5S05.
12. Liu, W. *et al.* Cdk5 links with DNA damage response and cancer. *Molecular Cancer* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0611-1> (2017).
13. Degregori, J., Kowalik, T. & Nevins, J. R. *Cellular Targets for Activation by the E2F1 Transcription Factor Include DNA Synthesis-and G 1 /S-Regulatory Genes.* *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* vol. 15 <https://journals.asm.org/journal/mcb> (1995).
14. Dick, F. A. & Rubin, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 14 297–306 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm3567> (2013).
15. Lundberg, A. S. & Weinberg, R. A. *Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes.* *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* vol. 18 (1998).
16. Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. & Dean, D. C. Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1. *Cell* **98**, 859–869 (1999).
17. Rubin, S. M., Sage, J. & Skotheim, J. M. Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Molecular Cell* vol. 80 183–192 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.020> (2020).
18. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N. J. C. Cyclin a is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169–1179 (1991).

BIBLIOGRAFIA

19. Walker, D. H. & Maller, J. L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* **354**, 314–317 (1991).
20. Vermeulen, K., van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Prolif* vol. 36 (2003).
21. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:3 **9**, 153–166 (2009).
22. Santamaría, D. *et al.* Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007 **448**:7155 **448**, 811–815 (2007).
23. Jang, S. M., Redon, C. E., Thakur, B. L., Bahta, M. K. & Aladjem, M. I. Regulation of cell cycle drivers by Cullin-RING ubiquitin ligases. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 52 1637–1651 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00508-4> (2020).
24. Jeffrey, P. D. *et al.* Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313–320 (1995).
25. Watanabe, Y. *et al.* Modulation of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II.
26. Aressy, B. & Ducommun, B. *Cell Cycle Control by the CDC25 Phosphatases*. vol. 8 (2008).
27. Bury, M., le Calvé, B., Ferbeyre, G., Blank, V. & Lessard, F. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends in Cell Biology* vol. 31 331–344 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.010> (2021).
28. Jeffrey, P. D., Tong, L. & Pavletich, N. P. Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* **14**, 3115–3125 (2000).
29. Hannon, G. J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257–261 (1994).
30. Guan, K.-L. *et al.* Growth suppression by p18, a p16/w⁴/a's-and p 141w1 4n/ TSe-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. (1994).
31. Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J.-Y., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. Novel INK4 Proteins, p19 and p18, Are Specific Inhibitors of the Cyclin D-Dependent Kinases CDK4 and CDK6. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* vol. 15 <https://journals.asm.org/journal/mcb> (1995).
32. Polyak, K. *et al.* p27 Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-13 and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* . **8**, 9–22 (1994).
33. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-Interacting Protein Cipl Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell* vol. 75 (1993).
34. Yang, V. W. The Cell Cycle. *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Sixth Edition* **1**, 197–219 (2018).
35. Ferby, I., Blazquez, M., Palmer, A., Eritja, R. & Nebreda, A. R. A novel p34 cdc2-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G 2 /M progression in *Xenopus* oocytes. www.genesdev.org (1999).
36. Chauhan, S. *et al.* Evolution of the Cdk-activator Speedy/RINGO in vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3835–3850 (2012).
37. Porter, L. A. *et al.* Human speedy: A novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2. *Journal of Cell Biology* **157**, 357–366 (2002).

38. Karaiskou, A. *et al.* Differential Regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and Cyclins. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36028–36034 (2001).
39. Mikolcevic, P. *et al.* Essential role of the Cdk2 activator RingoA in meiotic telomere tethering to the nuclear envelope. *Nat Commun* **7**, (2016).
40. Dinarina, A., Santamaria, P. G. & Nebreda, A. R. Cell cycle regulation of the mammalian CDK activator RINGO/Speedy A. *FEBS Lett* **583**, 2772–2778 (2009).
41. Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J., Russell, P. & Reed, S. I. *Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe.* (1990).
42. Martinsson-Ahlzén, H.-S. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase-Associated Proteins Cks1 and Cks2 Are Essential during Early Embryogenesis and for Cell Cycle Progression in Somatic Cells. *Mol Cell Biol* **28**, 5698–5709 (2008).
43. McGrath, D. A. *et al.* Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1407–1414 (2013).
44. Liberal, V. *et al.* Cyclin-dependent kinase subunit (Cks) 1 or Cks2 overexpression overrides the DNA damage response barrier triggered by activated oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2754–2759 (2012).
45. Kelman, Z. *et al.* Chromatin-Bound Cullin-Ring Ligases: Regulatory Roles in DNA Replication and Potential Targeting for Cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences* | www.frontiersin.org **5**, 19 (2018).
46. Skaar, J. R., Pagan, J. K. & Pagano, M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2013** *14*:6 **14**, 369–381 (2013).
47. Lee, C. J. *et al.* Stat2 stability regulation: an intersection between immunity and carcinogenesis. *Experimental & Molecular Medicine* **2020** *52*:9 **52**, 1526–1536 (2020).
48. Yamano, H. APC/C: current understanding and future perspectives. *F1000Research* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.12688/f1000research.18582.1> (2019).
49. Tang, Z. *et al.* APC2 Cullin Protein and APC11 RING Protein Comprise the Minimal Ubiquitin Ligase Module of the Anaphase-promoting Complex. *Molecular Biology of the Cell* vol. 12 (2001).
50. Yamaguchi, M. *et al.* Cryo-EM of Mitotic Checkpoint Complex-Bound APC/C Reveals Reciprocal and Conformational Regulation of Ubiquitin Ligation. *Mol Cell* **63**, 593–607 (2016).
51. Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H. & Barford, D. Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. *Nature* **522**, 450–454 (2015).
52. Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M. W. Direct Binding of CDC20 Protein Family Members Activates the Anaphase-Promoting Complex in Mitosis and G1. *Mol Cell* **2**, 163–171 (1998).
53. Labit, H. *et al.* Dephosphorylation of Cdc20 is required for its C-box-dependent activation of the APC/C. *EMBO J* **31**, 3351–3362 (2012).
54. Zhang, S. *et al.* Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature* **533**, 260–264 (2016).
55. Pflieger, C. M., Salic, A., Lee, E. & Kirschner, M. W. Inhibition of Cdh1–APC by the MAD2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1. *Genes Dev* **15**, 1759 (2001).

BIBLIOGRAFIA

56. Reimann, J. D. R. *et al.* Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645–655 (2001).
57. Reimann, J. D. R., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F. & Jackson, P. K. Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. (2001) doi:10.1101/gad.945701.
58. Degregori, J., Kowalik, T. & Nevins, J. R. Cellular Targets for Activation by the E2F1 Transcription Factor Include DNA Synthesis-and G 1 /S-Regulatory Genes. *Mol Cell Biol* **15**, 4215–4224 (1995).
59. Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**, 3499–3511 (1998).
60. Russell, A. *et al.* Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 1999 18:11 **18**, 1983–1991 (1999).
61. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
62. Narasimha, A. M. *et al.* Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *Elife* **3**, (2014).
63. Keenan, S. M., Lents, N. H. & Baldassare, J. J. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. *J Biol Chem* **279**, 5387–5396 (2004).
64. Hsu, J. Y., Reimann, J. D. R., Sørensen, C. S., Lukas, J. & Jackson, P. K. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APCCdh1. *Nat. Cell Biol.* **4**, 358–366 (2002).
65. Sivaprasad, U., Machida, Y. J. & Dutta, A. APC/C--the master controller of origin licensing? *Cell Div* **2**, 8 (2007).
66. Mailand, N. & Diffley, J. F. X. CDKs Promote DNA Replication Origin Licensing in Human Cells by Protecting Cdc6 from APC/C-Dependent Proteolysis. *Cell* **122**, 915–926 (2005).
67. Vigo, E. *et al.* CDC25A Phosphatase Is a Target of E2F and Is Required for Efficient E2F-Induced S Phase. *Mol Cell Biol* **19**, 6379–6395 (1999).
68. Donzelli, M. *et al.* Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J* **21**, 4875 (2002).
69. Guiley, K. Z. *et al.* p27 allosterically activates cyclin-dependent kinase 4 and antagonizes palbociclib inhibition. *Science* **366**, (2019).
70. Cappell, S. D. *et al.* EMI1 switches from being a substrate to an inhibitor of APC/CCDH1 to start the cell cycle. *Nature* 2018 558:7709 **558**, 313–317 (2018).
71. Cappell, S. D., Chung, M., Jaimovich, A., Spencer, S. L. & Meyer, T. Irreversible APCCdh1 Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry. *Cell* **166**, 167–180 (2016).
72. Singer, J. D., Gurian-West, M., Clurman, B. & Roberts, J. M. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. (1999).
73. Zhang, W. & Koepp, D. M. Fbw7 Isoform Interaction Contributes to Cyclin E Proteolysis. *Molecular Cancer Research* **4**, 935–943 (2006).

74. Welcker, M. *et al.* Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* **12**, 381–392 (2003).
75. Yeh, K.-H. *et al.* The F-Box Protein SKP2 Binds to the Phosphorylated Threonine 380 in Cyclin E and Regulates Ubiquitin-Dependent Degradation of Cyclin E. (2001) doi:10.1006/bbrc.2001.4442.
76. Piergiovanni, G., Costanzo, V. & Maurer-Stroh, S. GEMC1 is a novel TopBP1-interacting protein involved in chromosomal DNA replication. *Cell Cycle* **9**, 3686–3690 (2010).
77. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P. & Méchali, M. DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 16 360–374 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm4002> (2015).
78. Lemmens, B. *et al.* DNA Replication Determines Timing of Mitosis by Restricting CDK1 and PLK1 Activation. *Mol Cell* **71**, 117-128.e3 (2018).
79. Lemmens, B. & Lindqvist, A. DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *Journal of Cell Biology* vol. 218 3892–3902 Preprint at <https://doi.org/10.1083/JCB.201909032> (2019).
80. Cascales, H. S. *et al.* Cyclin A2 localises in the cytoplasm at the S/G2 transition to activate PLK1. *Life Sci Alliance* **4**, (2021).
81. Fu, Z. *et al.* Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nature Cell Biology* **2008 10:9 10**, 1076–1082 (2008).
82. Vigneron, S. *et al.* Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Dev Cell* **45**, 637-650.e7 (2018).
83. Hégarat, N. *et al.* Cyclin A triggers Mitosis either via the Greatwall kinase pathway or Cyclin B. *EMBO J* **39**, e104419 (2020).
84. Gong, D. & Ferrell, J. E. The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Mol Biol Cell* **21**, 3149–3161 (2010).
85. Dephoure, N. *et al.* A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10762–10767 (2008).
86. Kettenbach, A. N. *et al.* Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Sci Signal* **4**, (2011).
87. Watanabe, N. *et al.* Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11663–11668 (2005).
88. Crncec, A. & Hochegger, H. Triggering mitosis. *FEBS Lett* **593**, 2868–2888 (2019).
89. Cundell, M. J. *et al.* A PP2A-B55 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during mitotic exit. *Journal of Cell Biology* **214**, 539–554 (2016).
90. Hagting, A. *et al.* Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* **157**, 1125–1137 (2002).
91. Labit, H. *et al.* Dephosphorylation of Cdc20 is required for its C-box-dependent activation of the APC/C. *EMBO J* **31**, 3351–3362 (2012).

BIBLIOGRAFIA

92. Zhou, Y., Ching, Y. P., Chun, A. C. S. & Jin, D. Y. Nuclear localization of the cell cycle regulator CDH1 and its regulation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12530–12536 (2003).
93. Schmitz, M. H. A. *et al.* Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A–B55 α and importin- β 1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nature Cell Biology* **12**:9, 886–893 (2010).
94. Visintin, R. *et al.* The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* **2**, 709–718 (1998).
95. Celniker, S. E., Sweder, K., Srienc, F., Bailey, J. E. & Campbell, J. L. Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**, 2455–2466 (1984).
96. Gilbert, D. M. In search of the holy replicator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004** 5:10 **5**, 848–855 (2004).
97. Ekundayo, B. & Bleichert, F. Origins of DNA replication. *PLoS Genetics* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008320> (2019).
98. Li, S. *et al.* Nucleosome-directed replication origin licensing independent of a consensus DNA sequence. *Nat Commun* **13**, (2022).
99. Cayrou, C. *et al.* New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* **11**, 658–667 (2012).
100. Cayrou, C. *et al.* The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res* **25**, 1873–1885 (2015).
101. Masai, H. & Foiani, M. *DNA Replication: From Old Principles to New Discoveries*. (Springer, 2017).
102. Bell, S. P. & Stillman, B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **1992** 357:6374 **357**, 128–134 (1992).
103. Dhar, S. K. & Dutta, A. Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 34983–34988 (2000).
104. Miller, T. C. R., Locke, J., Greiwe, J. F., Diffley, J. F. X. & Costa, A. Mechanism of head-to-head MCM double-hexamers formation revealed by cryo-EM. *Nature* **575**, 704–710 (2019).
105. Ticau, S., Friedman, L. J., Ivica, N. A., Gelles, J. & Bell, S. P. Single-molecule studies of origin licensing reveal mechanisms ensuring bidirectional helicase loading. *Cell* **161**, 513–525 (2015).
106. Feng, X. *et al.* The structure of ORC–Cdc6 on an origin DNA reveals the mechanism of ORC activation by the replication initiator Cdc6. *Nature Communications* **2021** 12:1 **12**, 1–12 (2021).
107. Zhu, W., Chen, Y. & Dutta, A. Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint. *Mol Cell Biol* **24**, 7140–7150 (2004).
108. McGarry, T. J. & Kirschner, M. W. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043–1053 (1998).
109. Petersen, B. O., Lukas, J., Sørensen, C. S., Bartek, J. & Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* **18**, 396–410 (1999).

110. Takeda, D. Y., Parvin, J. D. & Dutta, A. Degradation of Cdt1 during S phase is Skp2-independent and is required for efficient progression of mammalian cells through S phase. *J Biol Chem* **280**, 23416–23423 (2005).
111. Walter, D. *et al.* ARTICLE SCF Cyclin F-dependent degradation of CDC6 suppresses DNA re-replication. (2016) doi:10.1038/ncomms10530.
112. Caillat, C. & Perrakis, A. Cdt1 and geminin in DNA replication initiation. *Subcell Biochem* **62**, 71–87 (2012).
113. Clijsters, L., Ogink, J. & Wolthuis, R. The spindle checkpoint, APC/C(Cdc20), and APC/C(Cdh1) play distinct roles in connecting mitosis to S phase. *J Cell Biol* **201**, 1013–1026 (2013).
114. Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J. & Hunter, T. Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *EMBO J* **18**, 5703–5713 (1999).
115. Kumagai, H. *et al.* A Novel Growth-and Cell Cycle-Regulated Protein, ASK, Activates Human Cdc7-Related Kinase and Is Essential for G 1/S Transition in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol* **19**, 5083–5095 (1999).
116. Masai, H. *et al.* Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* **281**, 39249–39261 (2006).
117. Fu, Y. *et al.* Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. *Cell* **146**, 931–941 (2011).
118. Kang, S., Kang, M. S., Ryu, E. & Myung, K. Eukaryotic DNA replication: Orchestrated action of multi-subunit protein complexes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **809**, 58–69 (2018).
119. Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Dunphy, W. G. Treslin Collaborates with TopBP1 in Triggering the Initiation of DNA Replication. *Cell* **140**, 349–359 (2010).
120. Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Dunphy, W. G. Direct regulation of Treslin by cyclin-dependent kinase is essential for the onset of DNA replication. *J Cell Biol* **193**, 995–1007 (2011).
121. Wang, Z., Kim, E., Leffak, M. & Xu, Y. jie. Treslin, DUE-B, and GEMC1 cannot complement Sld3 mutants in fission yeast. *FEMS Yeast Res* **12**, 486–490 (2012).
122. Piergiovanni, G., Costanzo, V. & Maurer-Stroh, S. GEMC1 is a novel TopBP1-interacting protein involved in chromosomal DNA replication. *Cell Cycle* **9**, 3686–3690 (2010).
123. Chowdhury, A. *et al.* The DNA unwinding element binding protein DUE-B interacts with Cdc45 in preinitiation complex formation. *Mol Cell Biol* **30**, 1495–1507 (2010).
124. Poudel, S., Yao, J., Kemp, M. G. & Leffak, M. Interaction between DUE-B and Treslin is required to load Cdc45 on chromatin in human cells. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 14497–14506 (2018).
125. Balestrini, A., Cosentino, C., Errico, A., Garner, E. & Costanzo, V. GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Nature Cell Biology* **2010** *12:5* **12**, 484–491 (2010).
126. Xu, X., Rochette, P. J., Feyissa, E. A., Su, T. v. & Liu, Y. MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. *EMBO J* **28**, 3005–3014 (2009).
127. Sanuki, Y. *et al.* RecQ4 promotes the conversion of the pre-initiation complex at a site-specific origin for DNA unwinding in *Xenopus* egg extracts. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1007003> **14**, 1010–1023 (2015).

BIBLIOGRAFIA

128. Matsuno, K., Kumano, M., Kubota, Y., Hashimoto, Y. & Takisawa, H. The N-Terminal Noncatalytic Region of *Xenopus* RecQ4 Is Required for Chromatin Binding of DNA Polymerase α in the Initiation of DNA Replication. *Mol Cell Biol* **26**, 4843–4852 (2006).
129. Sangrithi, M. N. *et al.* Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell* **121**, 887–898 (2005).
130. Quan, Y. *et al.* Cell-Cycle-Regulated Interaction between Mcm10 and Double Hexameric Mcm2-7 Is Required for Helicase Splitting and Activation during S Phase. *Cell Rep* **13**, 2576–2586 (2015).
131. Caballero, M. *et al.* Comprehensive analysis of DNA replication timing across 184 cell lines suggests a role for MCM10 in replication timing regulation. *Hum Mol Genet* **31**, 2899–2917 (2022).
132. Perez-Arnaiz, P., Bruck, I. & Kaplan, D. L. Mcm10 coordinates the timely assembly and activation of the replication fork helicase. *Nucleic Acids Res* **44**, 315–329 (2016).
133. Lööke, M., Maloney, M. F. & Bell, S. P. Mcm10 regulates DNA replication elongation by stimulating the CMG replicative helicase. *Genes Dev* **31**, 291–305 (2017).
134. Xu, X., Rochette, P. J., Feyissa, E. A., Su, T. v. & Liu, Y. MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. *EMBO J* **28**, 3005–3014 (2009).
135. Pellegrini, L. *et al.* New Insights into the Mechanism of DNA Duplication by the Eukaryotic Replisome. *Trends Biochem Sci* **41**, 859–871 (2016).
136. Zhu, W. *et al.* Mcm10 and And-1/CTF4 recruit DNA polymerase α to chromatin for initiation of DNA replication. *Genes Dev* **21**, 2288 (2007).
137. Samora, C. P. *et al.* Ctf4 Links DNA Replication with Sister Chromatid Cohesion Establishment by Recruiting the Chl1 Helicase to the Replisome. *Mol Cell* **63**, 371–384 (2016).
138. Rzechorzek, N. J., Hardwick, S. W., Jatikusumo, V. A., Chirgadze, D. Y. & Pellegrini, L. CryoEM structures of human CMG–ATP γ S–DNA and CMG–AND-1 complexes. *Nucleic Acids Res* **48**, 6980–6995 (2020).
139. Kilkeny, M. L. *et al.* The human CTF4-orthologue AND-1 interacts with DNA polymerase α /primase via its unique C-terminal HMG box. *Open Biol* **7**, (2017).
140. Simon, A. C. *et al.* A Ctf4 trimer couples the CMG helicase to DNA polymerase α in the eukaryotic replisome. *Nature* 2014 510:7504 **510**, 293–297 (2014).
141. Ricke, R. M. & Bielinsky, A. K. A conserved Hsp10-like domain in Mcm10 is required to stabilize the catalytic subunit of DNA polymerase- α in budding yeast. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 18414–18425 (2006).
142. Ricke, R. M. & Bielinsky, A. K. Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol Cell* **16**, 173–185 (2004).
143. González-Magaña, A. & Blanco, F. J. Human PCNA Structure, Function and Interactions. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 570 **10**, 570 (2020).
144. Arbel, M., Choudhary, K., Tfilin, O. & Kupiec, M. PCNA Loaders and Unloaders—One Ring That Rules Them All. *Genes* 2021, Vol. 12, Page 1812 **12**, 1812 (2021).
145. Yao, N. Y. & O'donnell, M. The RFC Clamp Loader: Structure and Function. *Subcell Biochem.* (2012) doi:10.1007/978-94-007-4572-8_14.

146. Sun, J. *et al.* The architecture of a eukaryotic replisome. *Nature Structural & Molecular Biology* 2015 22:12 **22**, 976–982 (2015).
147. Langston, L. D. *et al.* CMG helicase and DNA polymerase ϵ form a functional 15-subunit holoenzyme for eukaryotic leading-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15390–15395 (2014).
148. Lewis, J. S. *et al.* Tunability of DNA Polymerase Stability during Eukaryotic DNA Replication. *Mol Cell* **77**, 17-25.e5 (2020).
149. Schauer, G. D. & O'Donnell, M. E. Quality control mechanisms exclude incorrect polymerases from the eukaryotic replication fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 675–680 (2017).
150. Langston, L. D. *et al.* CMG helicase and DNA polymerase ϵ form a functional 15-subunit holoenzyme for eukaryotic leading-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15390–15395 (2014).
151. Liu, S. *et al.* Okazaki fragment maturation involves α -segment error editing by the mammalian FEN1/MutSa functional complex. *EMBO J* **34**, 1829–1843 (2015).
152. Balakrishnan, L. & Bambara, R. A. Okazaki Fragment Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a010173 (2013).
153. Bhat, K. P. & Cortez, D. RPA and RAD51: Fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nature Structural and Molecular Biology* vol. 25 446–453 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0075-z> (2018).
154. Bellelli, R. & Boulton, S. J. Spotlight on the Replisome: Aetiology of DNA Replication-Associated Genetic Diseases. *Trends in Genetics* **37**, 317–336 (2021).
155. Muñoz, S. & Méndez, J. DNA replication stress: from molecular mechanisms to human disease. *Chromosoma* vol. 126 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0573-x> (2017).
156. Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology* 2014 16:1 **16**, 2–9 (2013).
157. Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. & Lambert, S. A. E. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* **30**, 154–164 (2014).
158. Saxena, S. & Zou, L. Hallmarks of DNA replication stress. *Mol Cell* **82**, 2298–2314 (2022).
159. Ashour, M. E. & Mosammaparast, N. SURVEY AND SUMMARY Mechanisms of damage tolerance and repair during DNA replication. *Nucleic Acids Res* **49**, 3033–3047 (2021).
160. Ciccia, A. & Elledge, S. J. Molecular Cell Review The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell* **40**, 179–204 (2010).
161. Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology* 2014 16:1 **16**, 2–9 (2013).
162. Vare, D. *et al.* DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* **11**, 976–985 (2012).
163. Ide, H., Shoulkamy, M. I., Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M. & Salem, A. M. H. Repair and biochemical effects of DNA–protein crosslinks. *Mutation*

BIBLIOGRAFIA

- Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **711**, 113–122 (2011).
164. Voulgaridou, G. P., Anestopoulos, I., Franco, R., Panayiotidis, M. I. & Pappa, A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **711**, 13–27 (2011).
165. Shastri, N. *et al.* Genome-wide Identification of Structure-Forming Repeats as Principal Sites of Fork Collapse upon ATR Inhibition. *Mol Cell* **72**, 222-238.e11 (2018).
166. Voineagu, I., Narayanan, V., Lobachev, K. S. & Mirkin, S. M. Replication stalling at unstable inverted repeats: Interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins. *PNAS* **105**, 9936–9941 (2008).
167. Kumar, C., Batra, S., Griffith, J. D. & Remus, D. The interplay of rna:Dna hybrid structure and g-quadruplexes determines the outcome of r-loop-replisome collisions. *Elife* **10**, (2021).
168. Kurashima, K. *et al.* SMARCA4 deficiency-associated heterochromatin induces intrinsic DNA replication stress and susceptibility to ATR inhibition in lung adenocarcinoma. *NAR Cancer* **2**, (2020).
169. Aguilera, A. & Gaillard, H. Transcription and recombination: when RNA meets DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, (2014).
170. Bermejo, R. *et al.* Genome-Organizing Factors Top2 and Hmo1 Prevent Chromosome Fragility at Sites of S phase Transcription Specialized topoisomerases solve the topological constraints arising when replication forks encounter transcription. We have investigated the contribution of Top2 in S phase transcription. Specifically in S phase. *Cell* **138**, 870–884.
171. Takeuchi, Y., Horiuchi, T. & Kobayashi, T. Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA. (2003) doi:10.1101/gad.1085403.
172. Huertas, P. & Aguilera, A. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell* **12**, 711–721 (2003).
173. Wei, X. *et al.* Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* (1979) **281**, 1502–1505 (1998).
174. Almeida, R. *et al.* Chromatin conformation regulates the coordination between DNA replication and transcription. *Nature Communications* **2018** *9*:1 **9**, 1–14 (2018).
175. Weinberg, G., Ullman, B. & Martin, D. W. Mutator phenotypes in mammalian cell mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 2447–2451 (1981).
176. Bester, A. C. *et al.* Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**, 435–446 (2011).
177. Hass, C. S., Gakhar, L. & Wold, M. S. Functional characterization of a cancer causing mutation in human replication protein A. *Molecular Cancer Research* **8**, 1017–1026 (2010).
178. Bellelli, R. *et al.* Polε Instability Drives Replication Stress, Abnormal Development, and Tumorigenesis. *Mol Cell* **70**, 707-721.e7 (2018).
179. Bellelli, R. & Boulton, S. J. Spotlight on the Replisome: Aetiology of DNA Replication-Associated Genetic Diseases. *Trends in Genetics* **37**, 317–336 (2021).

180. Shima, N. *et al.* A viable allele of Mcm4 causes chromosome instability and mammary adenocarcinomas in mice. *Nature Genetics* 2006 39:1 **39**, 93–98 (2006).
181. Kawabata, T. *et al.* Stalled Fork Rescue via Dormant Replication Origins in Unchallenged S Phase Promotes Proper Chromosome Segregation and Tumor Suppression. *Mol Cell* **41**, 543–553 (2011).
182. Zhong, Y. *et al.* The level of origin firing inversely affects the rate of replication fork progression. *J Cell Biol* **201**, 373 (2013).
183. Beck, H. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase Suppression by WEE1 Kinase Protects the Genome through Control of Replication Initiation and Nucleotide Consumption. *Mol Cell Biol* **32**, 4226–4236 (2012).
184. Kotsantis, P., Petermann, E. & Boulton, S. J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *CANCER DISCOVERY* | **537**, (2018).
185. Macheret, M. & Halazonetis, T. D. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature* 2018 555:7694 **555**, 112–116 (2018).
186. Jones, R. M. *et al.* Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 2013 32:32 **32**, 3744–3753 (2012).
187. Dominguez-Sola, D. *et al.* Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 2007 448:7152 **448**, 445–451 (2007).
188. Bester, A. C. *et al.* Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**, 435–446 (2011).
189. Curti, L., Campaner, S., Bellosta, P. & Ciribilli, Y. MYC-Induced Replicative Stress: A Double-Edged Sword for Cancer Development and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 6168 **22**, 6168 (2021).
190. Lucca, C. *et al.* Checkpoint-mediated control of replisome–fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* 2003 23:6 **23**, 1206–1213 (2003).
191. Blackford, A. N. & Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* **66**, 801–817 (2017).
192. MacDougall, C. A., Byun, T. S., Van, C., Yee, M. C. & Cimprich, K. A. The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev* **21**, 898–903 (2007).
193. Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M. C., Walter, J. C. & Cimprich, K. A. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* **19**, 1040–1052 (2005).
194. Mariani, K. J. Lesion Bypass and the Reactivation of Stalled Replication Forks. <https://doi-org.sire.ub.edu/10.1146/annurev-biochem-062917-011921> **87**, 217–238 (2018).
195. Pasero, P. & Vindigni, A. Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. (2017) doi:10.1146/annurev-genet-120116.
196. Luke-Glaser, S., Luke, B., Grossi, S. & Constantinou, A. FANCM regulates DNA chain elongation and is stabilized by S-phase checkpoint signalling. *EMBO J* **29**, 795–805 (2010).
197. Patro, B. S., Fröhlich, R., Bohr, V. A. & Stevnsner, T. WRN helicase regulates the ATR-CHK1-induced S-phase checkpoint pathway in response to topoisomerase-I-DNA covalent complexes. *J Cell Sci* **124**, 3967–3979 (2011).

BIBLIOGRAFIA

198. de Klein, A. *et al.* Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **10**, 479–482 (2000).
199. Ball, H. L., Myers, J. S. & Cortez, D. ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* **16**, 2372–2381 (2005).
200. Ball, H. L. *et al.* Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Mol Cell Biol* **27**, 3367–3377 (2007).
201. Liu, S. *et al.* ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation. *Mol Cell* **43**, 192–202 (2011).
202. Thada, V. & Cortez, D. Common motifs in ETAA1 and TOPBP1 required for ATR kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 8395–8402 (2019).
203. Haahr, P. *et al.* Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nature Cell Biology* 2016 18:11 **18**, 1196–1207 (2016).
204. Bass, T. E. *et al.* ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nature Cell Biology* 2016 18:11 **18**, 1185–1195 (2016).
205. Bermudez, V. P. *et al.* 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 (2003).
206. Majka, J., Binz, S. K., Wold, M. S. & Burgers, P. M. J. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem* **281**, 27855–27861 (2006).
207. Liu, Q. *et al.* Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G 2 /M DNA damage checkpoint. (2000).
208. Zhao, H. & Piwnicka-Worms, H. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**, 4129–4139 (2001).
209. Tibbetts, R. S. *et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**, 152–157 (1999).
210. Tibbetts, R. S. *et al.* Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* **14**, 2989–3002 (2000).
211. Liu, S. *et al.* Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation. *Mol Cell Biol* **26**, 6056–6064 (2006).
212. Lee, J., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* **11**, 329–340 (2003).
213. Meng, Z., Capalbo, L., Glover, D. M. & Dunphy, W. G. Role for casein kinase 1 in the phosphorylation of Claspin on critical residues necessary for the activation of Chk1. *Mol Biol Cell* (2011) doi:10.1091/mbc.E11-01-0048.
214. Kim, J. M. *et al.* Cdc7 kinase mediates Claspin phosphorylation in DNA replication checkpoint. *Oncogene* 2008 27:24 **27**, 3475–3482 (2007).
215. Jeong, S. Y., Kumagai, A., Lee, J. & Dunphy, W. G. Phosphorylated Claspin Interacts with a Phosphate-binding Site in the Kinase Domain of Chk1 during ATR-mediated Activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46782–46788 (2003).
216. Kumagai, A., Kim, S. M. & Dunphy, W. G. Claspin and the activated form of ATR-ATRIP collaborate in the activation of Chk1. *J Biol Chem* **279**, 49599–49608 (2004).

217. Lindsey-Boltz, L. A., Serçin, Ö., Choi, J. H. & Sancar, A. Reconstitution of Human Claspin-mediated Phosphorylation of Chk1 by the ATR (Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related) Checkpoint Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 33107–33114 (2009).
218. Zhao, H. & Piwnicka-Worms, H. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**, 4129–4139 (2001).
219. Kasahara, K. *et al.* 14-3-3 γ mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J* **29**, 2802–2812 (2010).
220. Yoshida, K. & Fujita, M. DNA damage responses that enhance resilience to replication stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2021** 78:21 **78**, 6763–6773 (2021).
221. Sørensen, C. S. *et al.* Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**, 247–258 (2003).
222. Busino, L. *et al.* Degradation of Cdc25A by β -TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **2003** 426:6962 **426**, 87–91 (2003).
223. Peng, C. Y. *et al.* Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25c on serine-216. *Science* (1979) **277**, 1501–1505 (1997).
224. Sanchez, Y. *et al.* Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* (1979) **277**, 1497–1501 (1997).
225. Guo, C. *et al.* Interaction of Chk1 with Treslin negatively regulates the initiation of chromosomal DNA replication. *Mol Cell* **57**, 492–505 (2015).
226. Liu, H. *et al.* Phosphorylation of MLL by ATR is required for execution of mammalian S-phase checkpoint. *Nature* **2010** 467:7313 **467**, 343–346 (2010).
227. Alver, R. C., Chadha, G. S., Gillespie, P. J. & Blow, J. J. Reversal of DDK-Mediated MCM Phosphorylation by Rif1-PP1 Regulates Replication Initiation and Replisome Stability Independently of ATR/Chk1. *Cell Rep* **18**, 2508–2520 (2017).
228. Seller, C. A. & O'Farrell, P. H. Rif1 prolongs the embryonic S phase at the Drosophila mid-blastula transition. *PLoS Biol* **16**, e2005687 (2018).
229. Moiseeva, T. N. *et al.* An ATR and CHK1 kinase signaling mechanism that limits origin firing during unperturbed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 13374–13383 (2019).
230. Davé, A., Cooley, C., Garg, M. & Bianchi, A. Protein Phosphatase 1 Recruitment by Rif1 Regulates DNA Replication Origin Firing by Counteracting DDK Activity. *Cell Rep* **7**, 53–61 (2014).
231. Buisson, R., Boisvert, J. L., Benes, C. H. & Zou, L. Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Mol Cell* **59**, 1011–1024 (2015).
232. Toledo, L. I. *et al.* XATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* **155**, 1088 (2013).
233. Ge, X. Q. & Blow, J. J. Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *Journal of Cell Biology* **191**, 1285–1297 (2010).
234. Chen, Y. H. *et al.* ATR-Mediated Phosphorylation of FANCI Regulates Dormant Origin Firing in Response to Replication Stress. *Mol Cell* **58**, 323–338 (2015).

BIBLIOGRAFIA

235. Buisson, R., Boisvert, J. L., Benes, C. H. & Zou, L. Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Mol Cell* **59**, 1011–1024 (2015).
236. Le, T. M. *et al.* ATR inhibition facilitates targeting of leukemia dependence on convergent nucleotide biosynthetic pathways. *Nature Communications* **2017 8:1 8**, 1–14 (2017).
237. Beyaert, M., Starczewska, E., van den Neste, E. & Bontemps, F. A crucial role for ATR in the regulation of deoxycytidine kinase activity. *Biochem Pharmacol* **100**, 40–50 (2016).
238. Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N. & Helleday, T. Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Mol Cell* **37**, 492–502 (2010).
239. Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C. & Gasser, S. M. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* **22**, 4325–4336 (2003).
240. Cobb, J. A. *et al.* Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* **19**, 3055–3069 (2005).
241. Ragland, R. L. *et al.* RNF4 and PLK1 are required for replication fork collapse in ATR-deficient cells. *Genes Dev* **27**, 2259 (2013).
242. de Piccoli, G. *et al.* Replisome Stability at Defective DNA Replication Forks Is Independent of S Phase Checkpoint Kinases. *Mol Cell* **45**, 696–704 (2012).
243. Dungrawala, H. *et al.* The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Mol Cell* **59**, 998–1010 (2015).
244. Ercilla, A. *et al.* Acute hydroxyurea-induced replication blockade results in replisome components disengagement from nascent DNA without causing fork collapse. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**, 735–749 (2020).
245. Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–19 (2011).
246. Lam, F. C. The DNA damage response - from cell biology to human disease. *J Transl Genet Genom* **6**, 204–222 (2022).
247. Marteiijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014 15:7 15**, 465–481 (2014).
248. Ji, J. *et al.* Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. *PLoS One* **12**, e0171582 (2017).
249. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5858–5868 (1998).
250. Knipscheer, P. *et al.* The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **326**, 1698–1701 (2009).
251. Shibata, A. & Jeggo, P. A. ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Genes* **2021, Vol. 12, Page 1370 12**, 1370 (2021).

252. Buis, J. *et al.* Mre11 Nuclease Activity Has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation. *Cell* **135**, 85–96 (2008).
253. Qiu, S. & Huang, J. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* **22**, 31–37 (2021).
254. Zhu, M., Zhao, H., Limbo, O. & Russell, P. Mre11 complex links sister chromatids to promote repair of a collapsed replication fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 8793–8798 (2018).
255. Bian, L., Meng, Y., Zhang, M. & Li, D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. *Molecular Cancer* **2019** *18*:1 **18**, 1–14 (2019).
256. Deshpande, R. A. *et al.* ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO Journal* **33**, 482–500 (2014).
257. Zhang, B., Tang, Z., Li, L. & Lu, L. Y. NBS1 is required for SPO11-linked DNA double-strand break repair in male meiosis. *Cell Death Differ* **27**, 2176–2190 (2020).
258. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **2003** *421*:6922 **421**, 499–506 (2003).
259. Berkovich, E., Monnat, R. J. & Kastan, M. B. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nature Cell Biology* **2007** *9*:6 **9**, 683–690 (2007).
260. Sun, Y., Xu, Y., Roy, K. & Price, B. D. DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of ATM Activates ATM Kinase Activity. *Mol Cell Biol* **27**, 8502–8509 (2007).
261. Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. & Price, B. D. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13182–13187 (2005).
262. Williams, R. M. & Zhang, X. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress. (2021) doi:10.1016/j.pbiomolbio.2020.11.005.
263. Stucki, M. *et al.* MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**, 1213–1226 (2005).
264. Lou, Z. *et al.* MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* **21**, 187–200 (2006).
265. Wang, Q. *et al.* Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J* **33**, 862–877 (2014).
266. Aricthota, S., Rana, P. P. & Haldar, D. Histone acetylation dynamics in repair of DNA double-strand breaks. *Frontiers in Genetics* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.926577> (2022).
267. Kolas, N. K. *et al.* Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* (1979) **318**, 1637–1640 (2007).
268. Wang, B. *et al.* Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* **316**, 1194–1198 (2007).
269. Doil, C. *et al.* RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435–446 (2009).
270. Liu, T. & Huang, J. DNA End Resection: Facts and Mechanisms. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**, 126–130 (2016).

BIBLIOGRAFIA

271. Symington, L. S. & Gautier, J. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. <https://doi-org.sire.ub.edu/10.1146/annurev-genet-110410-132435> **45**, 247–271 (2011).
272. Chen, H., Lisby, M. & Symington, L. S. RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol Cell* **50**, 589–600 (2013).
273. Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. & Jasin, M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, (2015).
274. Haber, J. E. DNA Repair: The Search for Homology. *BioEssays* **40**, (2018).
275. Her, J. & Bunting, S. F. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. (2018) doi:10.1074/jbc.TM118.000371.
276. Yang, K., Guo, R. & Xu, D. Non-homologous end joining: advances and frontiers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**, 632–640 (2016).
277. Shibata, A. & Jeggo, P. A. Canonical DNA non-homologous end-joining; capacity versus fidelity. *Br J Radiol* **93**, 20190966 (2020).
278. Ma, Y., Schwarz, K. & Lieber, M. R. The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)* **4**, 845–851 (2005).
279. Chang, H. H. Y., Watanabe, G. & Lieber, M. R. Unifying the DNA End-processing Roles of the Artemis Nuclease: KU-DEPENDENT ARTEMIS RESECTION AT BLUNT DNA ENDS*. *J Biol Chem* **290**, 24036 (2015).
280. McCarthy-Leo, C., Darwiche, F. & Tainsky, M. A. DNA Repair Mechanisms, Protein Interactions and Therapeutic Targeting of the MRN Complex. *Cancers 2022, Vol. 14, Page 5278* **14**, 5278 (2022).
281. Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. & Lahav, G. Molecular Cell Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol Cell* **47**, 320–329 (2012).
282. Matsuoka, S. *et al.* ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (1979)* **316**, 1160–1166 (2007).
283. Tibbetts, R. S. *et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. (1999).
284. Khanna, K. K. *et al.* ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* **20**, 398–400 (1998).
285. Matsuoka, S. *et al.* Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10389–10394 (2000).
286. Nghiem, P., Park, P. K., Kim, Y., Desai, B. N. & Schreiber, S. L. ATR Is Not Required for p53 Activation but Synergizes with p53 in the Replication Checkpoint*. (2001) doi:10.1074/jbc.M106113200.
287. Toledo, L. I., Murga, M., Gutierrez-Martinez, P., Soria, R. & Fernandez-Capetillo, O. ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes Dev* **22**, 297–302 (2008).
288. Kaneko, Y. *et al.* Cell cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* **18**, 3673–3681 (1999).

289. Ou, Y.-H., Chung, P.-H., Sun, T.-P. & Shieh, S.-Y. p53 C-Terminal Phosphorylation by CHK1 and CHK2 Participates in the Regulation of DNA-Damage-induced C-Terminal Acetylation. *Mol Biol Cell* **16**, 1684–1695 (2005).
290. Meek, D. W. & Anderson, C. W. Posttranslational Modification of p53: Cooperative Integrators of Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000950 (2009).
291. Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008** *9:5* **9**, 402–412 (2008).
292. Maya, R. *et al.* ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* **15**, 1067 (2001).
293. Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y. & Okamoto, K. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* **2003** *22:55* **22**, 8870–8880 (2003).
294. Delia, D., Fontanella, E., Ferrario, C., Chessa, L. & Mizutani, S. DNA damage-induced cell-cycle phase regulation of p53 and p21waf1 in normal and ATM-defective cells. *Oncogene* **2003** *22:49* **22**, 7866–7869 (2003).
295. Cao, L. *et al.* A Novel ATM/TP53/p21-Mediated Checkpoint Only Activated by Chronic γ -Irradiation. *PLoS One* **9**, e104279 (2014).
296. Zannini, L., Delia, D. & Buscemi, G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol* **6**, 442–457 (2014).
297. Zhao, J. *et al.* ATM is a key driver of NF- κ B-dependent DNA-damage-induced senescence, stem cell dysfunction and aging. *Aging (Albany NY)* **12**, 4688 (2020).
298. Aird, K. M. & Zhang, R. ATM in senescence. *Oncotarget* **6**, 14729 (2015).
299. Pusapati, R. v. *et al.* ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1446–1451 (2006).
300. Neelsen, K. J. & Lopes, M. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2015** *16:4* **16**, 207–220 (2015).
301. Quinet, A., Lemaçon, D. & Vindigni, A. Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Mol Cell* **68**, 830–833 (2017).
302. Atkinson, J. & McGlynn, P. Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Res* **37**, 3475 (2009).
303. Kolinjivadi, A. M. *et al.* Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol Cell* **67**, 867-881.e7 (2017).
304. Tagliatalata, A. *et al.* Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol Cell* **68**, 414-430.e8 (2017).
305. Vujanovic, M. *et al.* Replication Fork Slowing and Reversal upon DNA Damage Require PCNA Polyubiquitination and ZRANB3 DNA Translocase Activity. *Mol Cell* **67**, 882-890.e5 (2017).
306. Bai, G. *et al.* HLTF Promotes Fork Reversal, Limiting Replication Stress Resistance and Preventing Multiple Mechanisms of Unrestrained DNA Synthesis. *Mol Cell* **78**, 1237-1251.e7 (2020).

BIBLIOGRAFIA

307. Fugger, K. *et al.* FBH1 catalyzes regression of stalled replication forks. *Cell Rep* **10**, 1749–1757 (2015).
308. Gari, K., Dé, C., Delannoy, M., Wu, L. & Constantinou, A. Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *PNAS* **105**, 16107–16112 (2008).
309. Bugreev, D. v., Rossi, M. J. & Mazin, A. v. Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res* **39**, 2153–2164 (2011).
310. Ralf, C., Hickson, I. D. & Wu, L. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J Biol Chem* **281**, 22839–22846 (2006).
311. Machwe, A., Xiao, L., Lloyd, R. G., Bolt, E. & Orren, D. K. Replication fork regression in vitro by the Werner syndrome protein (WRN): Holliday junction formation, the effect of leading arm structure and a potential role for WRN exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* **35**, 5729–5747 (2007).
312. Kanagaraj, R., Saydam, N., Garcia, P. L., Zheng, L. & Janscak, P. Human RECQ5beta helicase promotes strand exchange on synthetic DNA structures resembling a stalled replication fork. *Nucleic Acids Res* **34**, 5217–5231 (2006).
313. Lemaçon, D. *et al.* MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nature Communications* **2017** *8*:1 **8**, 1–12 (2017).
314. Ying, S., Hamdy, F. C. & Helleday, T. Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res* **72**, 2814–2821 (2012).
315. Thangavel, S. *et al.* DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells. *J Cell Biol* **208**, 545–562 (2015).
316. Hashimoto, Y., Chaudhuri, A. R., Lopes, M. & Costanzo, V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1305–1311 (2010).
317. Mijic, S. *et al.* Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat Commun* **8**, (2017).
318. Zadorozhny, K. *et al.* Fanconi-Anemia-Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair Replication Fork Protection. *Cell Rep* **21**, 333–340 (2017).
319. Schlacher, K., Wu, H. & Jasin, M. A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* **22**, 106–116 (2012).
320. Higgs, M. R. *et al.* BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks. *Mol Cell* **59**, 462–477 (2015).
321. Berti, M. *et al.* Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology* **2013** *20*:3 **20**, 347–354 (2013).
322. Couch, F. B. *et al.* ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev* **27**, 1610–1623 (2013).
323. Davies, S. L., North, P. S., Dart, A., Lakin, N. D. & Hickson, I. D. Phosphorylation of the Bloom's Syndrome Helicase and Its Role in Recovery from S-Phase Arrest. *Mol Cell Biol* **24**, 1279–1291 (2004).

324. Davies, S. L., North, P. S. & Hickson, I. D. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:7 14, 677–679 (2007).
325. Pichierri, P., Rosselli, F. & Franchitto, A. Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* 2003 22:10 22, 1491–1500 (2003).
326. Thompson, R., Montano, R. & Eastman, A. The Mre11 nuclease is critical for the sensitivity of cells to Chk1 inhibition. *PLoS One* 7, (2012).
327. Forment, J. v., Blasius, M., Guerini, I. & Jackson, S. P. Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Eme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One* 6, (2011).
328. Técher, H. *et al.* Signaling from Mus81-Eme2-Dependent DNA Damage Elicited by Chk1 Deficiency Modulates Replication Fork Speed and Origin Usage. *Cell Rep* 14, 1114–1127 (2016).
329. Ma, X., Tang, T. S. & Guo, C. Regulation of translesion DNA synthesis in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 61, 680–692 (2020).
330. Bellí, G., Colomina, N., Castells-Roca, L. & Lorite, N. P. Post-Translational Modifications of PCNA: Guiding for the Best DNA Damage Tolerance Choice. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 621 8, 621 (2022).
331. Yoon, J. H. *et al.* Error-Prone Replication through UV Lesions by DNA Polymerase θ Protects against Skin Cancers. *Cell* 176, 1295-1309.e15 (2019).
332. Acharya, N. *et al.* Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase η in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17724–17729 (2008).
333. Plosky, B. S. *et al.* Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin. *EMBO J* 25, 2847–2855 (2006).
334. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002 419:6903 419, 135–141 (2002).
335. Bienko, M. *et al.* Biochemistry: Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* (1979) 310, 1821–1824 (2005).
336. Garg, P. & Burgers, P. M. Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases η and REV1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18361 (2005).
337. Kannouche, P. L., Wing, J. & Lehmann, A. R. Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 14, 491–500 (2004).
338. Acharya, N., Yoon, J. H., Hurwitz, J., Prakasha, L. & Prakasha, S. DNA polymerase η lacking the ubiquitin-binding domain promotes replicative lesion bypass in humans cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10401–10405 (2010).
339. Hendel, A. *et al.* PCNA Ubiquitination Is Important, But Not Essential for Translesion DNA Synthesis in Mammalian Cells. *PLoS Genet* 7, e1002262 (2011).
340. Yamada, M. *et al.* ATR–Chk1–APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7–ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev* 27, 2459–2472 (2013).

BIBLIOGRAFIA

341. Göhler, T., Sabbioneda, S., Green, C. M. & Lehmann, A. R. ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase η is needed for efficient recovery from UV damage. *J Cell Biol* **192**, 219 (2011).
342. García-Gómez, S. *et al.* PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells. *Mol Cell* **52**, 541–553 (2013).
343. Bianchi, J. *et al.* PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication. *Mol Cell* **52**, 566–573 (2013).
344. Elvers, I., Johansson, F., Groth, P., Erixon, K. & Helleday, T. UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res* **39**, 7049–7057 (2011).
345. Kobayashi, K. *et al.* Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides. *Cell Cycle* **15**, (2016).
346. Gonz Alez-Acosta, D. *et al.* PrimPol-mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *EMBO J* **40**, e106355 (2021).
347. Mourón, S. *et al.* Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1383–1389 (2013).
348. Jansen, J. G. *et al.* Separate Domains of Rev1 Mediate Two Modes of DNA Damage Bypass in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol* **29**, 3113–3123 (2009).
349. Diamant, N. *et al.* DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res* **40**, 170–180 (2012).
350. Quinet, A. *et al.* Translesion synthesis mechanisms depend on the nature of DNA damage in UV-irradiated human cells. *Nucleic Acids Res* **44**, 5717–5731 (2016).
351. Elvers, I., Johansson, F., Groth, P., Erixon, K. & Helleday, T. UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res* **39**, 7049–7057 (2011).
352. Edmunds, C. E., Simpson, L. J. & Sale, J. E. PCNA Ubiquitination and REV1 Define Temporally Distinct Mechanisms for Controlling Translesion Synthesis in the Avian Cell Line DT40. *Mol Cell* **30**, 519–529 (2008).
353. Tirman, S. *et al.* Temporally distinct post-replicative repair mechanisms fill PRIMPOL-dependent ssDNA gaps in human cells. *Mol Cell* **81**, 4026–4040.e8 (2021).
354. Quinet, A., Tirman, S., Cybulla, E., Meroni, A. & Vindigni, A. To skip or not to skip: choosing repriming to tolerate DNA damage. *Mol Cell* **81**, 649–658 (2021).
355. Branzei, D. Ubiquitin family modifications and template switching. *FEBS Lett* **585**, 2810–2817 (2011).
356. Giannattasio, M. *et al.* Visualization of recombination-mediated damage bypass by template switching. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**:10 **21**, 884–892 (2014).
357. Cybulla, E. & Vindigni, A. Leveraging the replication stress response to optimize cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **2022** 1–19 (2022) doi:10.1038/S41568-022-00518-6.
358. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **2002** **419**:6903 **419**, 135–141 (2002).
359. Mohiuddin, M. *et al.* SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 12793–12798 (2018).

360. Ripley, B. M., Gildenberg, M. S. & Todd Washington, M. Control of DNA Damage Bypass by Ubiquitylation of PCNA. doi:10.3390/genes11020138.
361. Malkova, A. & Ira, G. Break-induced replication: functions and molecular mechanism. doi:10.1016/j.gde.2013.05.007.
362. Kramara, J., Osia, B. & Malkova, A. Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The How. (2018) doi:10.1016/j.tig.2018.04.002.
363. Liu, L. & Malkova, A. Break-induced replication: unraveling each step. (2022) doi:10.1016/j.tig.2022.03.011.
364. Sakofsky, C. J. & Malkova, A. Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* vol. 52 395–413 Preprint at <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1314444> (2017).
365. Hanada, K. *et al.* The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:11 **14**, 1096–1104 (2007).
366. Regairaz, M. *et al.* Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol* **195**, 739–749 (2011).
367. Lydeard, J. R. *et al.* Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes Dev* **24**, 1133–1144 (2010).
368. Saini, N. *et al.* Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature* 2013 502:7471 **502**, 389–392 (2013).
369. Wilson, M. A. *et al.* Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* 2013 502:7471 **502**, 393–396 (2013).
370. Donnianni, R. A. & Symington, L. S. Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 13475–13480 (2013).
371. Lydeard, J. R., Jain, S., Yamaguchi, M. & Haber, J. E. Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* 2007 448:7155 **448**, 820–823 (2007).
372. Deem, A. *et al.* Defective Break-Induced Replication Leads to Half-Crossovers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **179**, 1845–1860 (2008).
373. Smith, C. E., Lam, A. F. & Symington, L. S. Aberrant double-strand break repair resulting in half crossovers in mutants defective for Rad51 or the DNA polymerase delta complex. *Mol Cell Biol* **29**, 1432–1441 (2009).
374. Costantino, L. *et al.* Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* (1979) **343**, 88–91 (2014).
375. Mayle, R. *et al.* Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science* (1979) **349**, 742–747 (2015).
376. Caldecott, K. W. DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends Cell Biol* **32**, 733–745 (2022).
377. Pardo, B. & Aguilera, A. Complex chromosomal rearrangements mediated by break-induced replication involve structure-selective endonucleases. *PLoS Genet* **8**, (2012).
378. Sakofsky, C. J. *et al.* Break-induced replication is a source of mutation clusters underlying kataegis. *Cell Rep* **7**, 1640–1648 (2014).
379. Deem, A. *et al.* Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biol* **9**, (2011).

BIBLIOGRAFIA

380. Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 15 276–280 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc3916> (2015).
381. Definition of cancer - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>.
382. Alvarez, M. G. & Besa, P. C. MOLECULAR BASIS OF CANCER AND CLINICAL APPLICATIONS. *Surgical Clinics of North America* **80**, 443–457 (2000).
383. Caldas, C. & Venkitaraman, A. R. Tumor Suppressor Genes. *Encyclopedia of Genetics* 2081–2088 (2001) doi:10.1006/RWGN.2001.1345.
384. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
385. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
386. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* vol. 144 646–674 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> (2011).
387. Berti, M. & Vindigni, A. Replication stress: getting back on track. *Nature Structural & Molecular Biology* 2016 23:2 **23**, 103–109 (2016).
388. Primo, L. M. F. & Teixeira, L. K. Dna replication stress: Oncogenes in the spotlight. *Genetics and Molecular Biology* vol. 43 Preprint at <https://doi.org/10.1590/1678-4685gmb-2019-0138> (2020).
389. Sakofsky, C. J., Ayyar, S. & Malkova, A. Break-Induced Replication and Genome Stability. *Biomolecules* **2**, 483 (2012).
390. Burrell, R. A. *et al.* Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 2013 494:7438 **494**, 492–496 (2013).
391. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* (1979) **319**, 1352–1355 (2008).
392. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
393. Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J. & Echo, B. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* **67**, 136–142 (1984).
394. Glover, T. W., Wilson, T. E. & Art, M. F. Fragile sites in cancer: more than meets the eye. *Nature Reviews Cancer* 2017 17:8 **17**, 489–501 (2017).
395. Zlotorynski, E. *et al.* Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites. *Mol Cell Biol* **23**, 7143 (2003).
396. le Beau, M. M. *et al.* Replication of a Common Fragile Site, FRA3B, Occurs Late in S Phase and is Delayed Further Upon Induction: Implications for the Mechanism of Fragile Site Induction. *Hum Mol Genet* **7**, 755–761 (1998).
397. LeTallec, B. *et al.* Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep* **4**, 420–428 (2013).
398. le Tallec, B. *et al.* Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nature Structural & Molecular Biology* 2011 18:12 **18**, 1421–1423 (2011).
399. Barlow, J. H. *et al.* Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* **152**, 620–632 (2013).

400. Madireddy, A. *et al.* FANCD2 Facilitates Replication through Common Fragile Sites. *Mol Cell* **64**, 388–404 (2016).
401. Zhu, M. & Weiss, R. S. Increased common fragile site expression, cell proliferation defects, and apoptosis following conditional inactivation of mouse Hus1 in primary cultured cells. *Mol Biol Cell* **18**, 1044–1055 (2007).
402. Durkin, S. G., Arlt, M. F., Howlett, N. G. & Glover, T. W. Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene* **25**:32 **25**, 4381–4388 (2006).
403. Miotto, B., Ji, Z. & Struhl, K. Selectivity of ORC binding sites and the relation to replication timing, fragile sites, and deletions in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E4810–E4819 (2016).
404. Simpson, B. S., Pye, H. & Whitaker, H. C. The oncological relevance of fragile sites in cancer. *Commun Biol* **4**, (2021).
405. Dillon, L. W., Burrow, A. A. & Wang, Y.-H. DNA Instability at Chromosomal Fragile Sites in Cancer. *Curr Genomics* **11**, 326–337 (2010).
406. Wilson, T. E. *et al.* Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress. *Genome Res* **25**, 189–200 (2015).
407. LeTallec, B. *et al.* Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep* **4**, 420–428 (2013).
408. Wu, H. liang *et al.* Targeting nucleotide metabolism: a promising approach to enhance cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology* **2022** **15**:1 **15**, 1–21 (2022).
409. Ubhi, T. & Brown, G. W. Exploiting DNA replication stress for cancer treatment. *Cancer Res* **79**, 1730–1739 (2019).
410. Hsieh, H. J. & Peng, G. Cellular responses to replication stress: Implications in cancer biology and therapy. *DNA Repair (Amst)* **49**, 9–20 (2017).
411. Chemotherapy to Treat Cancer - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>.
412. Duch, A. *et al.* Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature* **493**, 116–121 (2013).
413. Semple, J. I., Smits, V. A. J., Feraud, J. R., Mamely, I. & Freire, R. Cleavage and degradation of Claspin during apoptosis by caspases and the proteasome. *Cell Death Differ* **14**, 1433–1442 (2007).
414. Clarke, C. A. L., Bennett, L. N. & Clarke, P. R. Cleavage of claspin by caspase-7 during apoptosis inhibits the Chk1 pathway. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 35337–35345 (2005).
415. Cabrera, E. *et al.* PERK inhibits DNA replication during the Unfolded Protein Response via Claspin and Chk1. *Oncogene* **36**, 678–686 (2017).
416. Verlinden, L. *et al.* 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3-induced down-regulation of the checkpoint proteins, Chk1 and Claspin, is mediated by the pocket proteins p107 and p130. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **103**, 411–415 (2007).
417. Iwanaga, R. *et al.* Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene* **25**, 1786–1798 (2006).

BIBLIOGRAFIA

418. Bennett, L. N. & Clarke, P. R. Regulation of Claspin degradation by the ubiquitin-proteasome pathway during the cell cycle and in response to ATR-dependent checkpoint activation. *FEBS Lett* **580**, 4176–4181 (2006).
419. Kenneth, N. S., Mudie, S. & Rocha, S. IKK and NF- κ B-mediated regulation of Claspin impacts on ATR checkpoint function. *EMBO Journal* **29**, 2966–2978 (2010).
420. Gao, D. *et al.* Cdh1 Regulates Cell Cycle through Modulating the Claspin/Chk1 and the Rb/E2F1 Pathways. *Mol Biol Cell* **20**, 3305–3316 (2009).
421. Peschiaroli, A. *et al.* SCF β TrCP-Mediated Degradation of Claspin Regulates Recovery from the DNA Replication Checkpoint Response. *Mol Cell* **23**, 319–329 (2006).
422. Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J. & Lukas, J. Destruction of Claspin by SCF β TrCP Restrains Chk1 Activation and Facilitates Recovery from Genotoxic Stress. *Mol Cell* **23**, 307–318 (2006).
423. Mamely, I. *et al.* Polo-like Kinase-1 Controls Proteasome-Dependent Degradation of Claspin during Checkpoint Recovery. *Current Biology* **16**, 1950–1955 (2006).
424. Shaltiel, I. A., Krenning, L., Bruinsma, W. & Medema, R. H. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *Journal of Cell Science* vol. 128 607–620 Preprint at <https://doi.org/10.1242/jcs.163766> (2015).
425. Yoo, H. Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Dunphy, W. G. *Adaptation of a DNA Replication Checkpoint Response Depends upon Inactivation of Claspin by the Polo-like Kinase*. *Institute of Technology al* vol. 117 (2004).
426. McGarry, E. *et al.* The deubiquitinase USP9X maintains DNA replication fork stability and DNA damage checkpoint responses by regulating CLASPIN during S-Phase. *Cancer Res* **76**, 2384–2393 (2016).
427. Yuan, J. *et al.* HERC2-USP20 axis regulates DNA damage checkpoint through Claspin. *Nucleic Acids Res* **42**, 13110–13121 (2014).
428. Zhu, M., Zhao, H., Liao, J. & Xu, X. HERC2/USP20 coordinates CHK1 activation by modulating CLASPIN stability. *Nucleic Acids Res* **42**, 13074–13081 (2014).
429. Martín, Y. *et al.* USP29 controls the stability of checkpoint adaptor Claspin by deubiquitination. *Oncogene* **34**, 1058–1063 (2015).
430. Faustrup, H., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., Lukas, J. & Mailand, N. USP7 counteracts SCF β TrCP- but not APCCdh1 -mediated proteolysis of Claspin. *Journal of Cell Biology* **184**, 13–19 (2009).
431. Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T. W. & Elledge, S. J. A Role for the Deubiquitinating Enzyme USP28 in Control of the DNA-Damage Response. *Cell* **126**, 529–542 (2006).
432. Lee, J., Gold, D. A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Dunphy, W. G. Roles of replication fork-interacting and Chk1-activating domains from claspin in a DNA replication checkpoint response. *Mol Biol Cell* **16**, 5269–5282 (2005).
433. Uno, S. & Masai, H. Efficient expression and purification of human replication fork-stabilizing factor, Claspin, from mammalian cells: DNA-binding activity and novel protein interactions. *Genes to Cells* **16**, 842–856 (2011).
434. Sar, F. *et al.* Human claspin is a ring-shaped DNA-binding protein with high affinity to branched DNA structures. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 39289–39295 (2004).
435. Kumagai, A. & Dunphy, W. G. *Claspin, a Novel Protein Required for the Activation of Chk1 during a DNA Replication Checkpoint Response in Xenopus Egg Extracts*. *Molecular Cell* vol. 6 (2000).

436. Lopes, M., Foiani, M. & Sogo, J. M. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* **21**, 15–27 (2006).
437. Rainey, M. D., Harhen, B., Wang, G. N., Murphy, P. v. & Santocanale, C. Cdc7-dependent and -independent phosphorylation of Claspin in the induction of the DNA replication checkpoint. *Cell Cycle* **12**, 1560–1568 (2013).
438. Petermann, E. *et al.* Chk1 Requirement for High Global Rates of Replication Fork Progression during Normal Vertebrate S Phase. *Mol Cell Biol* **26**, 3319–3326 (2006).
439. Toledo, L., Neelsen, K. J. & Lukas, J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Molecular Cell* vol. 66 735–749 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.001> (2017).
440. Errico, A. & Costanzo, V. Mechanisms of replication fork protection: A safeguard for genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* vol. 47 222–235 Preprint at <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.655374> (2012).
441. Hao, J. *et al.* And-1 coordinates with Claspin for efficient Chk1 activation in response to replication stress. *EMBO J* **34**, 2096–2110 (2015).
442. Smits, V. A. J., Cabrera, E., Freire, R. & Gillespie, D. A. Claspin – checkpoint adaptor and DNA replication factor. *FEBS Journal* vol. 286 441–455 Preprint at <https://doi.org/10.1111/febs.14594> (2019).
443. Yang, C. C. *et al.* Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nat Commun* **7**, (2016).
444. Scora, J. & McGowan, C. H. *Claspin and Chk1 Regulate Replication Fork Stability by Different Mechanisms*.
445. Petermann, E., Helleday, T. & Caldecott, K. W. Claspin Promotes Normal Replication Fork Rates in Human Cells. *Mol Biol Cell* **19**, 2373–2378 (2008).
446. Hae, Y. Y., Jeong, S. Y. & Dunphy, W. G. Site-specific phosphorylation of a checkpoint mediator protein controls its responses to different DNA structures. *Genes Dev* **20**, 772–783 (2006).
447. Feu, S. *et al.* OZF is a Claspin-interacting protein essential to maintain the replication fork progression rate under replication stress. *FASEB Journal* **34**, 6907–6919 (2020).
448. Nieto-Soler, M. *et al.* *Efficacy of ATR inhibitors as single agents in Ewing sarcoma*. vol. 7 <https://portals.broadinstitute>. (2016).
449. Ubhi, T. & Brown, G. W. Exploiting DNA replication stress for cancer treatment. *Cancer Research* vol. 79 1730–1739 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3631> (2019).
450. Boyer, A. S., Walter, D. & Sørensen, C. S. DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology* vols 37–38 16–25 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.01.001> (2016).
451. Okita, N., Minato, S., Ohmi, E., Tanuma, S. I. & Higami, Y. DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Lett* **586**, 3974–3979 (2012).
452. Wassing, I. E. & Esashi, F. RAD51: Beyond the break. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 113 38–46 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.010> (2021).

BIBLIOGRAFIA

453. Lin, Z., Kong, H., Nei, M. & Ma, H. *Origins and evolution of the recARAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604232103 (2006).
454. Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. & Ishikawa, H. *Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS. NATURE* vol. 407 www.nature.com (2000).
455. Moran, N. A. & Mira, A. *The process of genome shrinkage in the obligate symbiont Buchnera aphidicola.* <http://genomebiology.com/2001/2/12/research/0054.1> (2001).
456. Muris, D. F. R. *et al. Cloning the RAD51 homologue of Schizosaccharomyces pombe. Nucleic Acids Research* vol. 21 (1993).
457. Symington, L. S. Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 630–670 (2002).
458. Storchová, Z. *et al. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. Nature* **443**, 541–547 (2006).
459. Lim, D.-S. & Hasty, P. *A Mutation in Mouse rad51 Results in an Early Embryonic Lethal That Is Suppressed by a Mutation in p53. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* vol. 16 (1996).
460. Sonoda, E. *et al. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. The EMBO Journal* vol. 17 (1998).
461. Tsuzuki, T. *et al. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice (gene targeting/homologous recombination/embryonic development) Communicated by. Genetics* vol. 93 (1996).
462. Chi, P., van Komen, S., Sehorn, M. G., Sigurdsson, S. & Sung, P. Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair (Amst)* **5**, 381–391 (2006).
463. Tomblin, G. & Fishel, R. Biochemical characterization of the human RAD51 protein. I. ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 14417–14425 (2002).
464. Stasiak, A. & Egelman, E. H. *Structure and function of RecA-DNA complexes.* (1994).
465. Takai, K. K., Kibe, T., Donigian, J. R., Frescas, D. & de Lange, T. Telomere Protection by TPP1/POT1 Requires Tethering to TIN2. *Mol Cell* **44**, 647–659 (2011).
466. Kim, C., Paulus, B. F. & Wold, M. S. *Interactions of Human Replication Protein A with Oligonucleotides.* *Biochemistry* vol. 33 (1994).
467. Kowalczykowski, S. C. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410> (2015).
468. Jensen, R. B., Carreira, A. & Kowalczykowski, S. C. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**, 678–683 (2010).
469. Zhang, F., Fan, Q., Ren, K. & Andreassen, P. R. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Molecular Cancer Research* **7**, 1110–1118 (2009).
470. Rahman, N. *et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. Nat Genet* **39**, 165–167 (2007).

471. Liu, J., Doty, T., Gibson, B. & Heyer, W. D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1260–1262 (2010).
472. Carreira, A. *et al.* The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. *Cell* **136**, 1032–1043 (2009).
473. Davies, O. R. & Pellegrini, L. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 475–483 (2007).
474. Chintapalli, S. v *et al.* *Reevaluation of the evolutionary events within recA/RAD51 phylogeny*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/240> (2013).
475. Rein, H. L., Bernstein, K. A. & Baldock, R. A. RAD51 paralog function in replicative DNA damage and tolerance. *Current Opinion in Genetics and Development* vol. 71 86–91 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.010> (2021).
476. Park, J. Y. *et al.* Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene* **33**, 4803–4812 (2014).
477. Sullivan, M. R. & Bernstein, K. A. RAD-ical new insights into RAD51 regulation. *Genes* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes9120629> (2018).
478. Zellweger, R. *et al.* Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *Journal of Cell Biology* **208**, 563–579 (2015).
479. Mason, J. M., Chan, Y. L., Weichselbaum, R. W. & Bishop, D. K. Non-enzymatic roles of human RAD51 at stalled replication forks. *Nat Commun* **10**, (2019).
480. Kolinjivadi, A. M. *et al.* Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol Cell* **67**, 867–881.e7 (2017).
481. Amunugama, R. *et al.* Replication Fork Reversal during DNA Interstrand Crosslink Repair Requires CMG Unloading. *Cell Rep* **23**, 3419–3428 (2018).
482. David T. Long, Markus Räschle, Vladimir Joukov & Johannes C. Walter1. Mechanism of RAD51-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science (1979)* **333**, 84–87 (2011).
483. Chaudhuri, A. R. *et al.* Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* **535**, 382–387 (2016).
484. Tarsounas, M., Davies, D. & West, S. C. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* **22**, 1115–1123 (2003).
485. Moudry, P. *et al.* TOP BP1 regulates RAD51 phosphorylation and chromatin loading and determines PARP inhibitor sensitivity. *Journal of Cell Biology* **212**, 281–288 (2016).
486. Tamar Uziel *et al.* Requirement of the MRN complex for ATM. *EMBO J* **22**, 5612–5621 (2003).
487. Saredi, G. *et al.* H4K20me0 marks post-replicative chromatin and recruits the TONSL-MMS22L DNA repair complex. *Nature* **534**, 714–718 (2016).
488. Moudry, P. *et al.* TOP BP1 regulates RAD51 phosphorylation and chromatin loading and determines PARP inhibitor sensitivity. *Journal of Cell Biology* **212**, 281–288 (2016).
489. Pasero, P. & Vindigni, A. Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annu Rev Genet* **51**, 477–499 (2017).

BIBLIOGRAFIA

490. Hashimoto, Y., Chaudhuri, A. R., Lopes, M. & Costanzo, V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1305–1311 (2010).
491. Quinet, A. *et al.* PRIMPOL-Mediated Adaptive Response Suppresses Replication Fork Reversal in BRCA-Deficient Cells. *Mol Cell* **77**, 461–474.e9 (2020).
492. Berti, M. *et al.* Sequential role of RAD51 paralog complexes in replication fork remodeling and restart. *Nat Commun* **11**, (2020).
493. Somyajit, K., Saxena, S., Babu, S., Mishra, A. & Nagaraju, G. Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Res* **43**, 9835–9855 (2015).
494. Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N. & Helleday, T. Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Mol Cell* **37**, 492–502 (2010).
495. Martino, J. *et al.* The human Shu complex functions with PDS5B and SPIDR to promote homologous recombination. *Nucleic Acids Res* **47**, 10151–10165 (2019).
496. Ercilla, A. *et al.* Acute hydroxyurea-induced replication blockade results in replisome components disengagement from nascent DNA without causing fork collapse. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**, 735–749 (2020).
497. Huang, F., Mazina, O. M., Zentner, I. J., Cocklin, S. & Mazin, A. v. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *J Med Chem* **55**, 3011–3020 (2012).
498. Ward, I. M., Minn, K. & Chen, J. UV-induced Ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) Activation Requires Replication Stress. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 9677–9680 (2004).
499. Feu, S. *et al.* RAD51 is a druggable target that sustains replication fork progression upon DNA replication stress. *PLoS One* **17**, e0266645 (2022).
500. Chang, P. & Ohi, R. *The Mitotic Spindle Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* 1413. <http://www.springer.com/series/7651>.
501. Moiseeva, T. N. & Bakkenist, C. J. Regulation of the initiation of DNA replication in human cells. *DNA Repair (Amst)* **72**, 99–106 (2018).
502. Geley, S. *et al.* Anaphase-promoting Complex/Cyclosome-dependent Proteolysis of Human Cyclin A Starts at the Beginning of Mitosis and Is Not Subject to the Spindle Assembly Checkpoint 7. *The Journal of Cell Biology* vol. 153 <http://www.jcb.org/cgi/content/full/153/1/137> (2001).
503. Wong, A., Soo, R. A., Yong, W. P. & Innocenti, F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metabolism Reviews* vol. 41 77–88 Preprint at <https://doi.org/10.1080/03602530902741828> (2009).
504. Meijer L. *Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases*. (1996).
505. Ercilla, A. *et al.* Acute hydroxyurea-induced replication blockade results in replisome components disengagement from nascent DNA without causing fork collapse. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**, 735–749 (2020).
506. Ercilla, A. *et al.* New origin firing is inhibited by APC/C^{Cdh1} activation in S-phase after severe replication stress. *Nucleic Acids Res* **44**, 4745–4762 (2016).

507. Takebayashi, S. I. *et al.* Regulation of replication at the R/G chromosomal band boundary and pericentromeric heterochromatin of mammalian cells. *Exp Cell Res* **304**, 162–174 (2005).
508. Takebayashi, S. I., Ogata, M. & Okumura, K. Anatomy of mammalian replication domains. *Genes* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes8040110> (2017).
509. Mantiero, D., MacKenzie, A., Donaldson, A. & Zegerman, P. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO Journal* **30**, 4805–4814 (2011).
510. Collart, C., Allen, G. E., Bradshaw, C. R., Smith, J. C. & Zegerman, P. *Titration of Four Replication Factors Is Essential for the Xenopus laevis Midblastula Transition*. <https://www.science.org> (2013).
511. Marchal, C., Sima, J. & Gilbert, D. M. Control of DNA replication timing in the 3D genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 721–737 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0162-y> (2019).
512. Rivera-Mulia, J. C. & Gilbert, D. M. Replicating Large Genomes: Divide and Conquer. *Molecular Cell* vol. 62 756–765 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.007> (2016).
513. Taylor JH. Asynchronous Duplication of Chromosomes in Cultured Cells of Chinese Hamster. *J Biophys Biochem Cytol* 455–464 (1960) doi:0.1083/jcb.7.3.455.
514. Takahashi, S. *et al.* Genome-wide stability of the DNA replication program in single mammalian cells. *Nat Genet* **51**, 529–540 (2019).
515. Dileep, V. & Gilbert, D. M. Single-cell replication profiling to measure stochastic variation in mammalian replication timing. *Nat Commun* **9**, (2018).
516. Rivera-Mulia, J. C. *et al.* DNA replication timing alterations identify common markers between distinct progeroid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E10972–E10980 (2017).
517. Ryba, T. *et al.* Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res* **22**, 1833–1844 (2012).
518. Hiratani, I. *et al.* Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol* **6**, 2220–2236 (2008).
519. White, E. J. *et al.* DNA replication-timing analysis of human chromosome 22 at high resolution and different developmental states. *PNAS* vol. 101 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408170101 (2004).
520. Woodfine, K. *et al.* Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet* **13**, 191–202 (2004).
521. Schübeler, D. *et al.* Genome-wide DNA replication profile for Drosophila melanogaster: A link between transcription and replication timing. *Nat Genet* **32**, 438–442 (2002).
522. Wilson, K. A., Elefanti, A. G., Stanley, E. G. & Gilbert, D. M. Spatio-temporal re-organization of replication foci accompanies replication domain consolidation during human pluripotent stem cell lineage specification. *Cell Cycle* **15**, 2464–2475 (2016).
523. Rivera-Mulia, J. C. *et al.* Dynamic changes in replication timing and gene expression during lineage specification of human pluripotent stem cells. *Genome Res* **25**, 1091–1103 (2015).
524. Hiratani, I. *et al.* Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis. *Genome Res* **20**, 155–169 (2010).

BIBLIOGRAFIA

525. Ryba, T. *et al.* Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res* **20**, 761–770 (2010).
526. Gilbert, D. M. Replication origin plasticity, Taylor-made: Inhibition vs recruitment of origins under conditions of replication stress. *Chromosoma* vol. 116 341–347 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0105-9> (2007).
527. Xiang, W. *et al.* Correlative live and super-resolution imaging reveals the dynamic structure of replication domains. *Journal of Cell Biology* **217**, 1973–1984 (2018).
528. Maya-Mendoza, A. & Jackson, D. A. Labeling DNA replication foci to visualize chromosome territories in vivo. *Curr Protoc Cell Biol* **2017**, 22.21.1-22.21.16 (2017).
529. Ferreira, J., Paoletta, G., Ramos, C. & Lamond, A. I. *Spatial Organization of Large-Scale Chromatin Domains in the Nucleus: A Magnified View of Single Chromosome Territories*. *The Journal of Cell Biology* vol. 139 <http://www.jcb.org> (1997).
530. Solovei, I. *et al.* Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. *Cell* **137**, 356–368 (2009).
531. Cremer, T. *et al.* Role of Chromosome Territories in the Functional Compartmentalization of the Cell Nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 777–792 (1993).
532. Jackson, D. A. & Pombo, A. *Replicon Clusters Are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence That Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of S Phase in Human Cells*. *The Journal of Cell Biology* vol. 140 <http://www.jcb.org> (1998).
533. Ferreira, J., Paoletta, G., Ramos, C. & Lamond, A. I. *Spatial Organization of Large-Scale Chromatin Domains in the Nucleus: A Magnified View of Single Chromosome Territories*. *The Journal of Cell Biology* vol. 139 <http://www.jcb.org> (1997).
534. Denker, A. & de Laat, W. The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization. (2016) doi:10.1101/gad.281964.
535. Rao, S. S. P. *et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* **159**, 1665–1680 (2014).
536. Lieberman-Aiden, E. *et al.* Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* (1979) **326**, 289–293 (2009).
537. Pope, B. D. *et al.* Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* **515**, 402–405 (2014).
538. Ryba, T. *et al.* Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res* **20**, 761–770 (2010).
539. Dixon, J. R. *et al.* Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature* **518**, 331–336 (2015).
540. Takebayashi, S. I., Dileep, V., Ryba, T., Dennis, J. H. & Gilbert, D. M. Chromatin-interaction compartment switch at developmentally regulated chromosomal domains reveals an unusual principle of chromatin folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12574–12579 (2012).
541. Dixon, J. R. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376–380 (2012).

542. Rodríguez-Carballo, E. *et al.* The HoxD cluster is a dynamic and resilient TAD boundary controlling the segregation of antagonistic regulatory landscapes. *Genes Dev* **31**, 2264–2281 (2017).
543. Moindrot, B. *et al.* 3D chromatin conformation correlates with replication timing and is conserved in resting cells. *Nucleic Acids Res* **40**, 9470–9481 (2012).
544. Kind, J. *et al.* Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell* **153**, 178–192 (2013).
545. Ragozy, T., Telling, A., Scalzo, D., Kooperberg, C. & Groudine, M. Functional redundancy in the nuclear compartmentalization of the Late-Replicating genome. *Nucleus* **5**, 626–635 (2014).
546. van Steensel, B. & Belmont, A. S. Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* vol. 169 780–791 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022> (2017).
547. Ferguson, B. M. & Fangman, W. L. *A Position Effect on the Time of Replication Origin Activation in Yeast*. *Cell* vol. 66 (1992).
548. Ke, Y. *et al.* 3D Chromatin Structures of Mature Gametes and Structural Reprogramming during Mammalian Embryogenesis. *Cell* **170**, 367–381.e20 (2017).
549. Nagano, T. *et al.* Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature* **547**, 61–67 (2017).
550. Dimitrova, D. S. & Gilbert, D. M. *The Spatial Position and Replication Timing of Chromosomal Domains Are Both Established in Early G1 Phase*. *Molecular Cell* vol. 4 (1999).
551. Dileep, V. *et al.* Topologically associating domains and their long-range contacts are established during early G1 coincident with the establishment of the replication-timing program. *Genome Res* **25**, 1104–1113 (2015).
552. Lu, J., Li, F., Murphy, C. S., Davidson, M. W. & Gilbert, D. M. G2 phase chromatin lacks determinants of replication timing. *Journal of Cell Biology* **189**, 967–980 (2010).
553. Li, F., Chen, J., Solessio, E. & Gilbert, D. M. Spatial distribution and specification of mammalian replication origins during G1 phase. *Journal of Cell Biology* **161**, 257–266 (2003).
554. Wu, J.-R. & Gilbert, D. M. Lovastatin arrests CHO cells between the origin decision point and the restriction point. *FEBS Letters* **484**, 108–112 (2000).
555. Demczuk, A. *et al.* Regulation of DNA replication within the immunoglobulin heavy-chain locus during B cell commitment. *PLoS Biol* **10**, 15 (2012).
556. Lubelsky, Y. *et al.* DNA replication and transcription programs respond to the same chromatin cues. *Genome Res* **24**, 1102–1114 (2014).
557. Cayrou, C. *et al.* The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res* **25**, 1873–1885 (2015).
558. Besnard, E. *et al.* Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 837–844 (2012).
559. Dellino, G. I. *et al.* Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: Levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing. *Genome Res* **23**, 1–11 (2013).

BIBLIOGRAFIA

560. Miotto, B., Ji, Z. & Struhl, K. Selectivity of ORC binding sites and the relation to replication timing, fragile sites, and deletions in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E4810–E4819 (2016).
561. Langley, A. R., Gräf, S., Smith, J. C. & Krude, T. Genome-wide identification and characterisation of human DNA replication origins by initiation site sequencing (ini-seq). *Nucleic Acids Res* **44**, 10230–10247 (2016).
562. Liu, J., Ali, M. & Zhou, Q. Establishment and evolution of heterochromatin. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1476 59–77 Preprint at <https://doi.org/10.1111/nyas.14303> (2020).
563. Yue, F. *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355–364 (2014).
564. Brustel, J. *et al.* Histone H4K20 tri-methylation at late-firing origins ensures timely heterochromatin replication. *EMBO J* **36**, 2726–2741 (2017).
565. Lande-Diner, L., Zhang, J. & Cedar, H. Shifts in Replication Timing Actively Affect Histone Acetylation during Nucleosome Reassembly. *Mol Cell* **34**, 767–774 (2009).
566. Zhao, P. A., Rivera-Mulia, J. C. & Gilbert, D. M. Replication domains: Genome compartmentalization into functional replication units. *Adv Exp Med Biol* **1042**, 229–257 (2017).
567. Tan, H., Wu, C. & Jin, L. A possible role for long interspersed nuclear elements-1 (Line-1) in huntington's disease progression. *Medical Science Monitor* **24**, 3644–3652 (2018).
568. Lander, S. *et al.* *Initial sequencing and analysis of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium* The Sanger Centre: Beijing Genomics Institute/Human Genome Center. NATURE* vol. 409 www.nature.com (2001).
569. Zhang, P. *et al.* L1 retrotransposition is activated by Ten-eleven-translocation protein 1 and repressed by methyl-CpG binding proteins. *Nucleus* **8**, 548–562 (2017).
570. Philippe, C. *et al.* Activation of individual L1 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci. *Elife* **5**, (2016).
571. Ajani, J. A., Song, S., Hochster, H. S. & Steinberg, I. B. Cancer stem cells: The promise and the potential. *Semin Oncol* **42**, S3–S17 (2015).
572. Zhongjian Liu *et al.* Coupling of serum CK20 and hyper-methylated CLIP4 as promising biomarker for colorectal cancer diagnosis. *Aging* **13**, (2021).
573. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (1979)* **347**, 78–81 (2015).
574. Moiseeva, T. N. *et al.* An ATR and CHK1 kinase signaling mechanism that limits origin firing during unperturbed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 13374–13383 (2019).
575. Saldivar, J. C. *et al.* An intrinsic S/G2 checkpoint enforced by ATR. *Science (1979)* **361**, 806–810 (2018).
576. Uhlén, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science (1979)* **347**, (2015).
577. le Chalony, C. *et al.* The OZF Gene Encodes a Protein Consisting Essentially of Zinc Finger Motifs. *J Mol Biol* **236**, 399–404 (1994).
578. Ferbus, D. *et al.* Identification, nuclear localization, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs. *Eur J Biochem* **236**, 991–995 (1996).

579. Hao, J. *et al.* And-1 coordinates with Claspin for efficient Chk1 activation in response to replication stress. *EMBO J* **34**, 2096–2110 (2015).
580. Yang, C. C. *et al.* Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nature Communications* **2016 7:1 7**, 1–14 (2016).
581. Yang, C. C., Kato, H., Shindo, M. & Masai, H. Cdc7 activates replication checkpoint by phosphorylating the chk1 binding domain of claspin in human cells. *Elife* **8**, (2019).
582. Sasi, N. K. *et al.* DDK Has a Primary Role in Processing Stalled Replication Forks to Initiate Downstream Checkpoint Signaling. (2018) doi:10.1016/j.neo.2018.08.001.
583. Antoine, K., Prospéri, M. T., Ferbus, D., Boule, C. & Goubin, G. A Kruppel zinc finger of ZNF 146 interacts with the SUMO-1 conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. *Mol Cell Biochem* **271**, 215–223 (2005).
584. Antoine, K., Ferbus, D., Kolahgar, G., Prospéri, M. T. & Goubin, G. Zinc finger protein overexpressed in colon carcinoma interacts with the telomeric protein hRap1. *J Cell Biochem* **95**, 763–768 (2005).
585. Creamer, K. M., Larsen, E. C. & Lawrence, J. B. ZNF146/OZF and ZNF507 target LINE-1 sequences. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **12**, (2022).
586. Jachowicz, J. W. *et al.* LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nature Genetics* **2017 49:10 49**, 1502–1510 (2017).
587. Ferbus, D. *et al.* AMPLIFICATION AND OVER-EXPRESSION OF OZF, A GENE ENCODING A ZINC FINGER PROTEIN, IN HUMAN PANCREATIC CARCINOMAS. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990129)80:3.
588. Ma, Y. *et al.* CircPIP5K1A facilitates gastric cancer progression via miR-376c-3p/ZNF146 axis. *Cancer Cell Int* **20**, (2020).
589. Ferbus, D., Bovin, C., Validire, P. & Goubin, G. The zinc finger protein OZF (ZNF146) is overexpressed in colorectal cancer. *J Pathol* **200**, 177–182 (2003).
590. Fernandez, P. C. *et al.* Genomic targets of the human c-Myc protein. (2003) doi:10.1101/gad.1067003.
591. Zhu, S., Chen, C. Y. & Hao, Y. LncRNA KCNQ1OT1 acts as miR-216b-5p sponge to promote colorectal cancer progression via up-regulating ZNF146. *J Mol Histol* **52**, 479–490 (2021).
592. Tennstedt, P. *et al.* RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* **132**, 2118–2126 (2013).
593. Liao, C. *et al.* RAD51 Is Implicated in DNA Damage, Chemoresistance and Immune Dysregulation in Solid Tumors. *Cancers (Basel)* **14**, 5697 (2022).
594. Maacke, H. *et al.* OVER-EXPRESSION OF WILD-TYPE RAD51 CORRELATES WITH HISTOLOGICAL GRADING OF INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER. (2000) doi:10.1002/1097-0215.
595. Pal, J. *et al.* Genomic evolution in Barrett's adenocarcinoma cells: critical roles of elevated hsRAD51, homologous recombination and Alu sequences in the genome. *Oncogene* **2011 30:33 30**, 3585–3598 (2011).
596. Shkundina, I. S., Gall, A. A., Dick, A., Cocklin, S. & Mazin, A. v. New RAD51 Inhibitors to Target Homologous Recombination in Human Cells. (2021) doi:10.3390/genes12060920.

BIBLIOGRAFIA

597. Feng, Y., Wang, D., Xiong, L., Zhen, G. & Tan, J. Predictive value of RAD51 on the survival and drug responsiveness of ovarian cancer. *Cancer Cell Int* **21**, 1–13 (2021).
598. Klein, H. L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair (Amst)* **7**, 686–693 (2008).
599. Guirouilh-Barbat, J. *et al.* Is homologous recombination really an error-free process? (2014) doi:10.3389/fgene.2014.00175.
600. Su, X., Bernal, J. A. & Venkitaraman, A. R. Cell-cycle coordination between DNA replication and recombination revealed by a vertebrate N-end rule degra-rad51. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 1049–1058 (2008).
601. Yoon, S.-W., Kim, D.-K., Kim, K. P. & Park, K.-S. Rad51 Regulates Cell Cycle Progression by Preserving G2/M Transition in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* **23**, 2700–2711 (2014).
602. Ward, I. M. & Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**, 47759–47762 (2001).
603. Gupta, A. *et al.* Role of 53BP1 in the Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Radiat Res* **181**, 1 (2014).
604. Budke, B. *et al.* RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res* **40**, 7347–7357 (2012).
605. Campisi, J. & D'Adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 729–740 (2007).
606. Hills, S. A. & Diffley, J. F. X. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Current Biology* **24**, (2014).
607. Wong, A., Soo, R. A., Yong, W. P. & Innocenti, F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab Rev* **41**, 77–88 (2009).
608. Lehman, N. L. *et al.* Tumorigenesis and Neoplastic Progression Oncogenic Regulators and Substrates of the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Are Frequently Overexpressed in Malignant Tumors. *Am J Pathol* **170**, 1793–1805 (2007).
609. Kernan, J., Bonacci, T. & Emanuele, M. J. Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1865 1924–1933 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.09.011> (2018).
610. Wang, Q. *et al.* Alterations of anaphase-promoting complex genes in human colon cancer cells. *Oncogene* **22**, 1486–1490 (2003).
611. VanGenderen, C., Harkness, T. A. A. & Arnason, T. G. The role of Anaphase Promoting Complex activation, inhibition and substrates in cancer development and progression. *Aging* **12**, 15818–15855 (2020).
612. Melloy, P. G. The anaphase-promoting complex: A key mitotic regulator associated with somatic mutations occurring in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **59**, 189–202 (2020).
613. Vaidyanathan, S. *et al.* In vivo overexpression of Emi1 promotes chromosome instability and tumorigenesis. *Oncogene* **35**, 5446–5455 (2016).
614. Wan, L. *et al.* The APC/C E3 Ligase Complex Activator FZR1 Restricts BRAF Oncogenic Function. *Cancer Discov* **7**, 424–441 (2017).

615. Fujita, T., Liu, W., Doihara, H., Date, H. & Wan, Y. Dissection of the APCCdh1-Skp2 cascade in breast cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 1966–1975 (2008).
616. Fujita, T., Liu, W., Doihara, H. & Wan, Y. Tumorigenesis and Neoplastic Progression Regulation of Skp2-p27 Axis by the Cdh1/Anaphase-Promoting Complex Pathway in Colorectal Tumorigenesis. *Am J Pathol* **173**, 217–228 (2008).
617. Garzón, J. *et al.* Shortage of dNTPs underlies altered replication dynamics and DNA breakage in the absence of the APC/C cofactor Cdh1. *Oncogene* *2017* **36:42** **36**, 5808–5818 (2017).
618. Listovsky, T. *et al.* Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *EMBO J* **23**, 1619–1626 (2004).
619. Lehman, N. L. *et al.* Oncogenic regulators and substrates of the anaphase promoting complex/cyclosome are frequently overexpressed in malignant tumors. *Am J Pathol* **170**, 1793–1805 (2007).
620. Fruman, D. A. *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**, 605–635 (2017).
621. Choudhury, R. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase SCF(Cyclin F) Transmits AKT Signaling to the Cell-Cycle Machinery. *Cell Rep* **20**, 3212–3222 (2017).
622. Bonacci, T. *et al.* Cezanne/OTUD7B is a cell cycle-regulated deubiquitinase that antagonizes the degradation of APC/C substrates. *EMBO J* **37**, e98701 (2018).
623. Bryant, V. L., Elias, R. M., McCarthy, S. M., Yeatman, T. J. & Alexandrow, M. G. Suppression of reserve MCM complexes chemosensitizes to gemcitabine and 5-fluorouracil. *Molecular Cancer Research* **13**, 1296–1305 (2015).
624. Falchi, F. *et al.* Synthetic Lethality Triggered by Combining Olaparib with BRCA2-Rad51 Disruptors. *ACS Chem Biol* **12**, 2491–2497 (2017).
625. Liu, Y. *et al.* RAD51 Mediates Resistance of Cancer Stem Cells to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **23**, 514–522 (2017).
626. Huang, F. & Mazin, A. v. A Small Molecule Inhibitor of Human RAD51 Potentiates Breast Cancer Cell Killing by Therapeutic Agents in Mouse Xenografts. *PLoS One* **9**, e100993 (2014).
627. Trenner, A., Godau, J. & Sartori, A. A. A Short BRCA2-derived cell-penetrating peptide targets RAD51 function and confers hypersensitivity toward PARP inhibition. *Mol Cancer Ther* **17**, 1392–1404 (2018).
628. Malkova, A., Naylor, M. L., Yamaguchi, M., Ira, G. & Haber, J. E. RAD51-Dependent Break-Induced Replication Differs in Kinetics and Checkpoint Responses from RAD51-Mediated Gene Conversion. *Mol Cell Biol* **25**, 933–944 (2005).
629. Hashimoto, Y., Puddu, F. & Costanzo, V. RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nature Structural & Molecular Biology* *2011* **19:1** **19**, 17–24 (2011).
630. Ira, G. & Haber, J. E. Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Mol Cell Biol* **22**, 6384–6392 (2002).
631. Downing, B., Morgan, R., Vanhulle, K., Deem, A. & Malkova, A. Large inverted repeats in the vicinity of a single double-strand break strongly affect repair in yeast diploids lacking Rad51. *Mutat Res* **645**, 9–18 (2008).
632. Sotiriou, S. K. *et al.* Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks. *Mol Cell* **64**, (2016).

BIBLIOGRAFIA

633. Saxena, S., Somyajit, K. & Nagaraju, G. XRCC2 Regulates Replication Fork Progression during dNTP Alterations. *Cell Rep* **25**, 3273-3282.e6 (2018).
634. Jasencakova, Z. & Groth, A. Replication stress, a source of epigenetic aberrations in cancer? *BioEssays* **32**, 847–855 (2010).
635. Jasencakova, Z. *et al.* Replication Stress Interferes with Histone Recycling and Predeposition Marking of New Histones. *Mol Cell* **37**, 736–743 (2010).
636. Li, W. *et al.* Replication stress affects the fidelity of nucleosome-mediated epigenetic inheritance. *PLoS Genet* **13**, e1006900 (2017).
637. Im, J. S. *et al.* ATR checkpoint kinase and CRL1 β TRCP collaborate to degrade ASF1a and thus repress genes overlapping with clusters of stalled replication forks. *Genes Dev* **28**, 875 (2014).
638. Hsu, C. L., Chong, S. Y., Lin, C. Y. & Kao, C. F. Histone dynamics during DNA replication stress. *Journal of Biomedical Science* 2021 28:1 **28**, 1–13 (2021).
639. Kim, J. *et al.* Replication Stress Shapes a Protective Chromatin Environment across Fragile Genomic Regions. *Mol Cell* **69**, 36-47.e7 (2018).
640. Yamazaki, S. *et al.* Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome. *EMBO J* **31**, 3667–3677 (2012).
641. Foti, R. *et al.* Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program. *Mol Cell* **61**, 260–273 (2016).
642. Klein, K. N. *et al.* Replication timing maintains the global epigenetic state in human cells. *Science (1979)* **372**, 371–378 (2021).
643. Rivera-Mulia, J. C. & Gilbert, D. M. Replication timing and transcriptional control: Beyond cause and effect - part III. *Curr Opin Cell Biol* **40**, 168–178 (2016).
644. Dellino, G. I. *et al.* Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing. *Genome Res* **23**, 1–11 (2013).
645. Picard, F. *et al.* The Spatiotemporal Program of DNA Replication Is Associated with Specific Combinations of Chromatin Marks in Human Cells. *PLoS Genet* **10**, e1004282 (2014).
646. Akerman, I. *et al.* A predictable conserved DNA base composition signature defines human core DNA replication origins. *Nature Communications* 2020 11:1 **11**, 1–15 (2020).
647. Thakur, B. L. *et al.* Convergence of SIRT1 and ATR signaling to modulate replication origin dormancy. *Nucleic Acids Res* **50**, 5111–5128 (2022).
648. Wang, W. *et al.* Genome-wide mapping of human DNA replication by optical replication mapping supports a stochastic model of eukaryotic replication Graphical abstract. *Mol Cell* **81**, 2975-2988.e6 (2021).
649. Jodkowska, K. *et al.* 3D chromatin connectivity underlies replication origin efficiency in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **1**, 13–14 (2022).
650. Sequeira-Mendes, J., Díaz-Uriarte, R., Apedaile, A., Huntley, D. & Brockdorff, N. Transcription Initiation Activity Sets Replication Origin Efficiency in Mammalian Cells. *PLoS Genet* **5**, 1000446 (2009).
651. Danis, E. *et al.* Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nature Cell Biology* 2004 6:8 **6**, 721–730 (2004).

652. Cadoret, J. C. *et al.* Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15837–15842 (2008).
653. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**, 1010–1022 (2011).
654. Liu, Y. *et al.* Transcription shapes DNA replication initiation to preserve genome integrity. *Genome Biol* **22**, 1–27 (2021).
655. Rivera-Mulia, J. C. *et al.* Dynamic changes in replication timing and gene expression during lineage specification of human pluripotent stem cells. *Genome Res* **25**, 1091–1103 (2015).
656. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr Protoc Mol Biol* **109**, 21.29.1-21.29.9 (2015).
657. Afgan, E. *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res* **50**, W345–W351 (2022).
658. Kent, W. J. *et al.* The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* **12**, 996–1006 (2002).
659. Batut, B. *et al.* Community-Driven Data Analysis Training for Biology. *Cell Syst* **6**, 752-758.e1 (2018).