

**Estudi dels mecanismes de reparació  
del dany oxidatiu en fase replicativa  
del DNA en humans:**

L'Anèmia de Fanconi i PCNA

**Pau Castillo Bosch**

Gener de 2012

Estudi dels mecanismes de reparació en fase replicativa del DNA en humans:  
L'Anèmia de Fanconi i PCNA

Pau Castillo Bosch

Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona  
26 de Gener de 2012

**Director:** Dr. Jordi Surrallés Calonge

**Supervisor:** Dr. Massimo Bogliolo

**Tribunal:** Dra. Neus Agell Jané  
Dra. Antonia Velázquez Henar  
Dr. Jose Luis García Giménez

**Suplents:** Dra. Anna Genescà Garrigosa  
Dr. Carlos Pipaón González

La recerca descrita en aquesta tesi doctoral ha estat duta a terme al Grup d'Inestabilitat Genòmica i Reparació del DNA del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. El doctorand ha estat finançat per una beca pública de "Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia" del govern espanyol i amb referència: AP2007-02850.

Portada: Imatge parcial del quadre de *L'Uomo vitruviano* (1490) de Leonardo da Vinci modificada.

2012, Pau Castillo



Facultat de Biociències

Departament de Genètica i Microbiologia

Unitat de Genètica

**Estudi dels mecanismes de reparació del dany oxidatiu en fase replicativa del DNA en humans: l'Anèmia de Fanconi i PCNA**

Memòria presentada per en PAU CASTILLO BOSCH, en el marc dels Estudis de Doctorat en GENÈTICA de la Universitat Autònoma de Barcelona per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

El Director de Tesi,

L'autor,

Dr. Jordi Surrallés Calonge  
Catedràtic de Genètica

Pau Castillo Bosch



**Tinc una pedra a les mans.  
Cada nit  
la deixo caure al pou profund del son  
i la'n trec l'endemà, xopa de vida.**

Miquel Martí i Pol (1978)



## Taula de continguts

<b>0. Abreviatures.....</b>	<b>iii</b>
<b>1. Introducció .....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalitats dany al DNA i reparació.....	1
1.2. Fonts de dany al DNA .....	2
1.3. Dany endogen: Espècies reactives d'oxigen .....	2
1.3.1. Lesions induïdes per ROS: Oxidacions de bases .....	4
1.3.2. Lesions induïdes per NOS: Hidròlisi de bases al DNA, l'exemple de la desaminació de la Citosina .....	6
1.4. Càncers causats per dany oxidatiu.....	8
1.5. Mecanismes de reparació del dany oxidatiu en cèl·lules eucariotes.....	9
1.6. Fase G <sub>1</sub> del cicle cel·lular .....	10
1.6.1. SP-BER.....	11
1.6.2. LP-BER .....	12
1.7. Mecanismes de reparació del dany oxidatiu en fase S del cicle cel·lular.....	14
1.7.1. BER post replicatiu: MUTYH.....	15
1.7.2. BER post replicatiu: UNG2.....	16
1.7.3. MMR .....	18
1.8. Importància de la senyalització per ubiquitinació en mecanismes de reparació del dany .....	20
1.9. Ruta molecular de l'Anèmia de Fanconi .....	24
1.9.1. Generalitats .....	24
1.9.2. Ruta molecular de FA.....	25
1.9.3. Reparació dels ICLs .....	30
1.9.4. La importància de la ruta FA en l'elecció de la reparació de DSBs.....	33
1.9.5. L'anèmia de Fanconi i dany oxidatiu .....	33
1.10. Atàxia telangiectàsica i dany oxidatiu .....	36
1.11. Antigen de proliferació nuclear (PCNA).....	37
1.11.1. La replicació del DNA i PCNA.....	37
1.11.2. Tolerància al dany: Les modificacions post-traduccionals de PCNA ....	38
1.11.3. Monoubiquitinació de PCNA .....	39
1.11.4. Poliubiquitinació de PCNA .....	41
1.11.5. Polimerases de translesió.....	42
1.11.6. PCNA i dany oxidatiu .....	46
<b>2. Objectius.....</b>	<b>47</b>
<b>3. Materials i mètodes.....</b>	<b>49</b>
3.1. Línies cel·lulars i cultius.....	49
3.2. Anàlisi per <i>western blot</i> .....	49
3.3. Anàlisi d'immunofluorescència.....	51
3.4. Assaig de supervivència .....	52
3.5. Assaig d'interferència per RNA .....	52
3.6. Assaig de quantificació de la 8-oxoG.....	53
3.7. Assaig <i>in vitro</i> per testar el sistema de reparació per escissió de bases .....	53
3.8. Assaig de síntesi de DNA per citometria de flux .....	55
3.9. Assaig de sincronització de cèl·lules primàries.....	55
3.10. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux.....	55
3.11. Assaig de transfecció de DNA.....	56
<b>4. Resultats .....</b>	<b>57</b>
4.1. Resposta de la ruta FA a baixes dosis de IR.....	57

4.1.1.	FANCD2 es monoubiquitina en resposta a baixes dosis de IR.....	57
4.1.2.	FANCD2 colocalitza amb $\gamma$ H2AX als llocs de dany després de baixes dosis de IR en fase replicativa del cicle cel·lular.....	59
4.2.	Acció coordinada de FA i ATM en resposta a dany oxidatiu .....	61
4.2.1.	Les cèl·lules FA no són sensibles a $H_2O_2$ ni a $KBrO_3$ .....	61
4.2.2.	El dany induït per $H_2O_2$ desencadena la monoubiquitinació de FANCD2 mentre que el dany induït per $KBrO_3$ és incapaç de fer-ho .....	64
4.2.3.	L' $H_2O_2$ i el $KBrO_3$ generen diferents nivells de 8-oxoG al DNA.....	66
4.2.4.	El sistema de reparació BER és funcionalment eficient en absència de FANCD2 per a la reparació de 8-oxoG .....	67
4.2.5.	El tractament amb $H_2O_2$ indueix fosforilació de la histona H2AX mentre que el tractament de $KBrO_3$ és incapaç de fer-ho.....	70
4.2.6.	Les línies cel·lulars deficientes per FANCD2 i per ATM tenen afectat el punt de control del cicle cel·lular després de tractament amb $H_2O_2$ .....	71
4.3.	PCNA respon a dany oxidatiu monoubiquitinant-se i reclutant DNA polt....	74
4.3.1.	PCNA és monoubiquitinat després de tractaments inductors de dany oxidatiu	74
4.3.2.	La cinètica d'activació de PCNA per monoubiquitinació després de $H_2O_2$ és diferent a la coneguda activació després de radiació UV.....	76
4.3.3.	PCNA s'activa per monoubiquitinació després de tractament amb $KBrO_3$	78
4.3.4.	La monoubiquitinació de PCNA després de dany oxidatiu depèn de replicació del DNA.....	79
4.3.5.	La monoubiquitinació de PCNA després de dany oxidatiu depèn de RAD18	81
4.3.6.	La polimerasa de TLS polt colocalitza i forma foci amb PCNA després de tractaments inductors de dany oxidatiu .....	82
<b>5.</b>	<b>Discussió .....</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>Annex.....</b>	<b>122</b>
	<b>Agraïments.....</b>	<b>131</b>





## **0. Abreviatures**

---



## 0. Abreviatures

<b>5'dRp</b>	5'deoxiribosafosfat	<b>IDLs</b>	Bucles d'inserció delecio
<b>5-OHU</b>	5-hidroxiuracil	<b>IF</b>	Immunofluorescència
<b>6,4-PP</b>	6,4-Fotoproductes	<b>IR</b>	Radiació ionitzant
<b>8-oxoA</b>	7,8-dihidroxi-8-oxoadenina	<b>K</b>	Lisina
<b>8-oxoG</b>	7,8-dihidroxi-8-oxoguanina	<b>KBrO<sub>3</sub></b>	Bromat de potassi
<b>A</b>	Adenina	<b>LP-BER</b>	Reparació llarga de BER
<b>AP</b>	Llocs bàsics al DNA	<b>MEF</b>	Línies cel·lulars embrioniques de fibroblast de ratolí
<b>A-T</b>	Atàxia telangiectàsica	<b>MMC</b>	Mitomicina C
<b>ATM</b>	Proteïna mutada en atàxia telangiectàsica	<b>MMR</b>	Reparació per reconeixement de mals aparellaments de bases
<b>ATP</b>	Trifosfat d'adenosina	<b>MMS</b>	Metanosulfonat
<b>ATR</b>	Cinasa 3 relacionada amb atàxia telangiectàsica	<b>NER</b>	Reparació per escissió de nucleòtids
<b>BER</b>	Reparació per escissió de bases	<b>NHEJ</b>	Reparació per unió d'extrems no homòlegs
<b>BRCA</b>	Proteïnes de càncer de mama	<b>NOS</b>	Espècies reactives de nitrogen
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anió superòxid
<b>BSA</b>	Albúmina de sèrum boví	<b>OGG1</b>	Glicosilasa de DNA de 8-oxoG
<b>C</b>	Citosina	<b>OH<sup>-</sup></b>	Grup hidroxil
<b>coIP</b>	Coimmunoprecipitació	<b>PCNA</b>	Antigen de proliferació nuclear
<b>CPDs</b>	Dímers de pirimidina	<b>PI</b>	Iodur de propidi
<b>DDT</b>	Tolerància al dany al DNA	<b>RDS</b>	DNA radioresistent
<b>DEB</b>	Diepoxibutà	<b>RFC</b>	Factor de replicació C
<b>DNA ligX</b>	Lligasa de DNA x	<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>DNA polx</b>	Polimerases de DNA x	<b>RPA</b>	Proteïna de replicació A
<b>DSBs</b>	Trencaments de doble cadena	<b>Ser</b>	Serina
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena	<b>siRNA</b>	Petit RNA d'interferència
<b>DUBs</b>	Enzims de deubiquitinació	<b>SP-BER</b>	Reparació curta de BER
<b>dXTP</b>	Trifosfat del nucleòtid X	<b>SSBs</b>	Trencaments de cadena senzilla
<b>EdU</b>	5-etinil-2-desoxiuridina	<b>ssDNA</b>	DNA de cadena senzilla
<b>FA</b>	Anèmia de Fanconi	<b>SUMO</b>	Petit modificador semblant a ubiquitina
<b>faPy-A</b>	4,6-diamino-5-formopirimidina	<b>T</b>	Timidina
<b>faPy-G</b>	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina	<b>TLS</b>	Síntesi per translesió
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví	<b>U</b>	Uracil
<b>FEN1</b>	Endonucleasa flap 1	<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>G</b>	Guanina	<b>UBM</b>	Domini d'unió a ubiquitina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peròxid d'hidrogen	<b>UBZ</b>	Domini d'unió a ubiquitina en dits de zinc
<b>His</b>	Histidina	<b>UNG</b>	Glicosilasa de DNA d'U
<b>HR</b>	Reparació per recombinació homòloga	<b>UV</b>	Llum ultraviolada
<b>HU</b>	Hidroxiurea	<b>XP</b>	Xerodèrmia pigmentosa
<b>ICLs</b>	Entrecreuaments entre cadenes	<b>XP-V</b>	Variant de xerodèrmia pigmentosa
<b>ID</b>	Complex format per FANCD2 i FANCI	<b>XRCC1</b>	Proteïna I de complementació de raigs X





# 1. Introducció

---



# 1. Introducció

## 1.1. Generalitats dany al DNA i reparació

La preservació de la integritat genòmica és essencial pel funcionament i la supervivència de tots els organismes vius. La reparació del DNA és el procés a través del qual les cèl·lules són capaces d'identificar i corregir el dany produït a les pròpies molècules de DNA amb l'objectiu de preservar íntegre el genoma per al correcte i normal funcionalment de la cèl·lula i de la seva descendència [1]. De fet, es postula que en humans, el dany al DNA està involucrat en diverses malalties genètiques hereditàries, envelliment [2] i carcinogènesi [3]. El dany pot ser produït per diversos factors: endògens, incloent la pròpia activitat metabòlica de la cèl·lula o per errors durant el procés de replicació del DNA, o per factors exògens com ara l'exposició a llum ultraviolada (UV) o a radiació ionitzant (IR) entre d'altres.

Es calcula que una cèl·lula humana rep al llarg del dia aproximadament un milió de lesions moleculars que causen danys estructurals a les molècules de DNA i que poden provocar mutacions i inestabilitat genòmica [4]. Per combatre totes aquestes agressions, les cèl·lules han desenvolupat processos de resposta coordinats i altament regulats per assegurar que el material genètic sigui preservat, duplicat i segregat correctament a la descendència. Aquests processos inclouen la detecció del dany i el bloqueig de les forquilles de replicació, l'establiment de punts de control o parada de cicle cel·lular per tal de donar temps als mecanismes de reparació de corregir el dany i l'activació de mecanismes transcripcionals adaptatius [5]. Si el dany és sever la cèl·lula desencadena mecanismes d'apoptosi o mort cel·lular [6].

Els mecanismes bàsics de reparació de dany al DNA estan molt conservats evolutivament des d'eucariotes inferiors com *Sacharomyces* fins a eucariotes superiors com mamífers de manera que podem identificar proteïnes homòlogues en molts casos [7]. Aquest elevat grau de conservació indica la importància de desenvolupar mecanismes eficaços per a la preservació del genoma i per la supervivència cel·lular. En mamífers superiors aquests mecanismes de reparació del dany han anat evolucionant cap a una major especialització, diversificació i complexitat.

## **1.2. Fonts de dany al DNA**

El DNA és una estructura dinàmica constantment atacada per diferents fonts de dany i és vital que sigui preservat. La importància de l'especificitat d'aparellament entre les bases nitrogenades de l'adenina (A) amb la timina (T) i la guanina (G) amb la citosina (C) postulat per Watson i Crick és essencial per mantenir intacte la informació del genoma. El DNA està subjecte a canvis en la seva estructura, en les seves bases nitrogenades i en els sucres, desencadenant dany. Depenent de la font, el DNA pot ser danyat per reaccions espontànies, bàsicament hidròlisi i desaminacions; per productes del propi metabolisme tals com les espècies reactives d'oxigen (ROS) i les espècies reactives de nitrogen (NOS); i per agents exògens tan físics com químics [8].

Entre les fonts exògenes de dany al DNA s'inclouen factors ambientals com la radiació UV o la IR, toxines, agents químics i contaminants [9]. Els tipus de dany induït per aquests agents són bàsicament trencaments de doble cadena (DSBs), trencaments de cadena senzilla (SSBs), entrecreuaments entre cadenes (ICLs) o dins la pròpia cadena de DNA o mals aparellaments de base així com modificacions químiques de les bases o els sucres de l'estructura del DNA [10].

La present tesi doctoral, està centrada en explorar el dany oxidatiu induït al DNA al que s'enfronten els mamífers aeròbics per a la preservació del seu genoma. Es centra especialment en l'estudi dels mecanismes de reparació d'aquest dany en fase replicativa del cicle cel·lular i més concretament en l'acció de les proteïnes de la ruta molecular de reparació de l'Anèmia de Fanconi (FA) i de l'antigen de proliferació nuclear (PCNA).

## **1.3. Dany endogen: Espècies reactives d'oxigen**

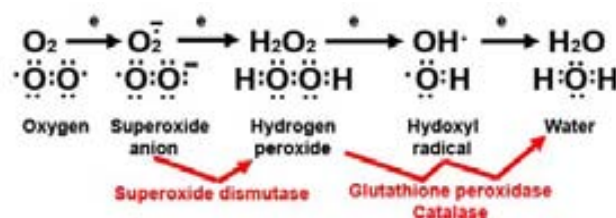
Des de fa aproximadament un segle s'han anat acumulant observacions que indiquen que els animals amb metabolisme elevat tendeixen a tenir una esperança de vida menor. D'aquesta manera es comencen a formular les primeres hipòtesis conegudes referents a l'envelliment i el metabolisme. Cap a mitjans dels anys cinquanta, Denham Harman va articular la teoria dels radicals lliures on especulava que els radicals d'oxigen generats pel propi metabolisme cel·lular serien els causants d'acumular dany i produir l'envelliment i la mort [11]. Des de llavors, el coneixement que tenim fins ara



del dany endogen produït per la cèl·lula i com aquest pot ser causant de certes malalties humanes s'ha incrementat considerablement, i ha esdevingut un camp d'estudi clau per a la biomedicina.

L'exposició a ROS es considera de llarg la principal font de dany endogen al DNA tot i que també caldria destacar les desaminacions, la hidròlisi espontània i la metilació. Els ROS són generats constantment durant el propi metabolisme oxidatiu en organismes vius aeròbics com a productes de la respiració oxidativa als mitocondris. Altres fonts de ROS són l'exposició a agents físics i químics. Entre els físics destaquen els ROS induïts per la IR a través de reaccions redox, incloent les reaccions Fenton emprant metalls pesats, i els químics, entre els quals destaquen alguns fàrmacs quimioterapèutics o l'exposició ambiental a metalls tòxics o a agents químics oxidants [12]. A més, els ROS són produïts endògenament com a mecanisme de defensa per macròfags i neutròfils en processos d'inflamació i per combatre infeccions [13].

Durant el metabolisme oxidatiu mitocondrial, la majoria d'oxigen és reconvertit en aigua i tan sols entre un 0,2 - 2% en ROS degut a la fuga d'electrons donant lloc a la formació d'anions superòxid ( $O_2^-$ ) [14]. Els  $O_2^-$  poden ser posteriorment convertits a peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) espontàniament o a través de catàlisi per les superòxid dismutases. El  $H_2O_2$  pot ser reduït a aigua o parcialment reduït al grup hidroxil ( $OH^\cdot$ ), potent oxidant. Es pot observar un esquema del procés de generació de ROS durant el metabolisme mitocondrial a la figura 1 (fig.1). Tot i que el  $H_2O_2$  no sigui el ROS més potent de tots per la seva reactivitat, és probablement el ROS clau en la generació de dany oxidatiu i en processos de carcinogènesi degut a la seva capacitat per difondre a través de membranes cel·lulars. D'aquesta manera, pot accedir amb facilitat a altres departaments cel·lulars, entre ells el nucli on pot atacar i causar dany al DNA [15].



**Figura 1. Representació del procés de formació de les espècies reactives d'oxigen (ROS).** L'oxigen ( $O_2$ ), necessari pel metabolisme oxidatiu, juga un paper fonamental en la formació de ROS ja que té un nombre imparell d'electrons (representat pel puntejat negre). Quan l' $O_2$  capta un electró ( $e$ ) es transforma en superòxid ( $O_2^-$ ) amb alta capacitat reactiva. Aquest pot ser transformat a peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) espontàniament o a través de les superòxid dismutases. Finalment, el  $H_2O_2$  és catalitzat a grup hidroxil ( $OH^\cdot$ ) i a aigua per mitjà d'uns enzims anomenats catalases. Tant el  $O_2^-$  com el  $H_2O_2$  i el  $OH^\cdot$  són considerats els ROS més freqüents derivats del metabolisme oxidatiu [16].

Els ROS causen dany a diferents macromolècules vitals com ara proteïnes, lípids i el ja comentat DNA. La primera defensa contra els efectes perjudicials dels ROS són diversos antioxidants. Quan les cèl·lules es troben en situacions d'estrès oxidatiu, la proporció d'oxidants respecte antioxidants augmenta, incrementant el risc de dany cel·lular. La forma més catastròfica de dany són les lesions al DNA que, si no són reparades correctament, poden provocar inestabilitat genòmica i conduir a diverses malalties associades com ara l'Alzheimer [17]. La resposta cel·lular al dany oxidatiu al DNA implica diversos processos com ara la pròpia reparació, la parada del cicle cel·lular i en últim terme, l'apoptosi. Si el dany generat es fixa en forma de mutacions irreversibles pot contribuir a l'oncogènesi [3].

### **1.3.1. Lesions induïdes per ROS: Oxidacions de bases**

Les lesions al DNA induïdes per ROS són variades afectant des de les bases nitrogenades, els sucres i, fins i tot, afectant la pròpia estructura del DNA amb trencaments de cadena. Es coneixen més de 100 modificacions de bases oxidatives identificades al genoma de mamífers, sent les més importants i freqüents les lesions de la G, especialment vulnerable a oxidació degut al seu pobre potencial redox [18]. En destaquen la 7,8-dihidroxi-8-oxo-guanina (8-oxoG) i la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (faPy-G). Els productes més freqüents d'oxidació de l'A són la 7,8-dihidroxi-8-oxo-adenina (8-oxoA) i la 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (faPy-A). L'oxidació de les pirimidines C i T dóna lloc principalment a timina glicol, 5-hidroxicitosina i 5-hidroxiuracil (5-OHU). Un exemple de l'estructura química d'algunes d'aquestes bases danyades al DNA es pot observar a la fig.2.

De totes les lesions induïdes per ROS, la 8-oxoG és la més freqüent i es postula que se'n produeixen aproximadament  $10^3$  per cèl·lula i dia en teixits normals i fins a  $10^5$  per cèl·lula i dia en teixits tumorals [19]. Habitualment es pren la presència de 8-oxoG com a biomarcador de dany oxidatiu [20]. La 8-oxoG té un potencial mutagènic important ja que és una base anàloga a la T, de manera que quan és present a la pròpia cadena de DNA durant la replicació, és una font directe de mutació al genoma per transversió de C:G a A:T. A diferència d'altres tipus de dany al DNA, les característiques estructurals de la 8-oxoG permeten que aquesta sigui replicada, encara

que de manera inexacte, per les polimerases replicatives funcionals DNA polimerasa delta/èpsilon (DNA pol $\delta/\epsilon$ ) en fase S del cicle cel·lular sense bloquejar la progressió de la forquilla de replicació [21]. La replicació dóna lloc a l'aparellament 8-oxoG:A. Aquest aparellament no distorsiona l'estructura en doble hèlix de les cadenes de DNA. Contràriament, l'aparellament 8-oxoG:C dóna lloc a un mal aparellament de bases que indueix distorsions a la cadena de DNA i que és detectat i reparat pels mecanismes de reparació adients en fase no replicativa del DNA. Així doncs, i gràcies a la capacitat estructural de mimetisme de la 8-oxoG a la T, és més fàcil la inserció d'una A abans que una C al lloc complementari de la cadena de DNA per les polimerases replicatives. L'aparellament erroni 8-oxoG:A, també es pot produir per la inserció i aparellament d'una 8-oxo-G procedent de la bossa de nucleòtids lliures amb una A en comptes de amb una C en fase replicativa de DNA de manera que la 8-oxoG incorporada es fixa al genoma. L'aparellament 8-oxoG:A no és detectat com a erroni per part de l'activitat correctora de les polimerases replicatives de DNA amb el conseqüent perill de fixació de la mutació que això comporta.



**Figura 2. Estructura d'alguna de les bases danyades al DNA i processades per la ruta de reparació BER.** Es mostren a la figura l'estructura de la 7,8-dihidroxi-8-oxo-guanina (8-oxoG) i la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (faPy-G) productes de la oxidació de la guanina i l'uracil present al DNA com a base danyada producte de la desaminació de la citosina [22].

Quan es produeixen dos o més lesions oxidatives dins un fragment de 10 parells de bases es consideren com a lesions en clústers. Es calcula que els clústers de lesions oxidatives es produeixen de manera normal en cèl·lules primàries humanes amb una freqüència aproximada d'entre 0,02 i 0,8 clústers per cada milió de parells de bases [23]. Mentre que els mecanismes de reparació de bases individuals acostumen a ser eficients, alguns clústers poden ser més complicats de resoldre donant lloc a altres lesions secundàries com ara DSBs [24]. Els DSBs generats poden ser deguts al propi

processament del dany quan es produeix l'intent de reparació simultani de dos lesions en clúster o quan l'excisió de la base té lloc oposat a un SSB proper no reparat. Així doncs, quan el dany induït per ROS interfereix en els processos de replicació del DNA o transcripció gènica també es poden generar DSBs de manera secundària en el procés de reparació del dany induït per ROS [25]. Els DSBs són un dels tipus de lesió més greu al DNA ja que pocs DSBs són suficients per induir mutació gènica, aberracions cromosòmiques i transformació cel·lular [26]. Per tant, desenvolupar mecanismes eficients de reparació del DSBs és essencial per a la preservació cel·lular i per combatre l'efecte nociu de l'exposició a estrès oxidatiu.

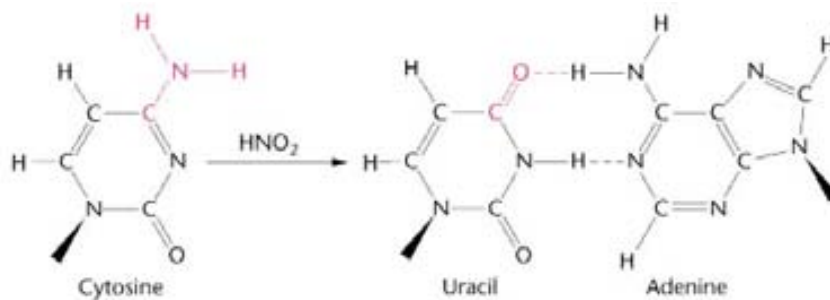
### **1.3.2. Lesions induïdes per NOS: Hidròlisi de bases al DNA, l'exemple de la desaminació de la Citosina**

La hidròlisi de bases és l'altre tipus de dany endogen principal amb que és atacat el DNA de cèl·lules de mamífer juntament amb la prèviament comentada oxidació de bases. La desaminació hidrolítica de la C al DNA genera l'uracil (U), una base aberrant i altament mutagènica. La desaminació pot ser induïda per alguns agent químics de la família de les NOS, entre ells l'anhídrid nitrós que es produeix *in vivo* per oxidació del seu regulador endogen l'òxid nítric, especialment present en inflamacions cròniques sent factor de risc de càncers [27]. L'estrès oxidatiu genera derivats de la C semblants a U que són processats per les glicosilases d'U [28]. La inducció directe d'U al DNA per les ROS es considera un tema en controvèrsia.

La desaminació de la C és molt més freqüent en regions de cadena senzilla de DNA (ssDNA) que en regions on la C es troba aparellada amb la seva base complementària en regions de doble cadena de DNA (dsDNA). Per tant, les forquilles de replicació i les bombolles de transcripció són dos punts especialment sensibles a la desaminació. Així doncs, és essencial desenvolupar mecanismes eficients de reparació de la base aberrant U al DNA per minimitzar les transicions C:G a T:A després de replicació degut al l'aparellament erroni de la C desaminada a U amb l'A [29] com s'esquematitza a la fig.3 presentada a continuació.

Es postula que l'U incorporat al DNA sorgit de la desaminació espontània de la C ocorre entre 100-500 vegades per cèl·lula humana i dia [30] mentre que és tres vegades superior la ràtio de C metilada al DNA (5-metilcitosina) desaminada a U.

Aquestes dues fonts es consideren les més importants en la introducció d'U aberrant al DNA [31]. A més, l'U pot aparèixer també com a base no canònica al DNA degut a la incorporació errònia de dUTP lliure durant la replicació de DNA en lloc de T. Les polimerases replicatives incorporen dUTP amb la mateixa eficiència que dTTP en concentracions equivalents, de manera que la regulació es produeix per compartimentació cel·lular sent la concentració al nucli clarament favorable al nucleòtid lliure dTTP [32]. La incorporació errònia de dUTP es considera una de les fonts de lloc abàsics (AP) més important generats de manera endògena al DNA, com a mínim en *S.cerevisiae* [33]. Es considera que la desregulació de les concentracions de dTTP respecte dUTP nuclears podrien ser un mecanisme de citotoxicitat de certs fàrmacs quimioterapèutics. Aquests fàrmacs, afecten més pronunciadament els teixits replicatius o cancerígens que els no proliferatius generant un increment de llocs AP i trencaments de cadena que desembocarien en la mort cel·lular específica del teixit cancerigen [34].



**Figura 3. Desaminació de la citosina a uracil i posterior fixació de la mutació per l'aparellament amb l'adenina.** La C es pot desaminar espontàniament o per l'acció de l'àcid nítrós ( $\text{HNO}_2$ ) procedent del processament del nitrat de sodi, preservant alimentici utilitzat de manera comuna. En l'exemple, l'àcid actua de mutagen afavorint la desaminació de la C per la pèrdua del grup  $\text{NH}_2$ . Un cop té lloc la replicació, les polimerases replicatives de DNA acomoden l'A davant de l'U afavorint les transicions C:G a T:A [35].

L'alta capacitat mutagènica de l'U mal incorporat al DNA s'ha vist recentment involucrada en la generació de mutació induïda pel propi organisme per realitzar diversificació d'anticossos en els processos de mutació hipersomàtica i de recombinació per canvi de classe en cèl·lules limfocítiques B. La diversificació d'anticossos comporta una millor resposta adaptativa contra infeccions. Aquesta major mutagenicitat s'assoleix mitjançant l'expressió de la desaminasa de citosina específicament en aquest tipus cel·lular per introduir U al DNA altament mutagènics [36].

## 1.4. Càncers causats per dany oxidatiu

L'estrès oxidatiu s'ha postulat com un dels possibles causants del procés de carcinogènesi. De fet, la observació de l'increment de susceptibilitat a càncers en persones amb una diversitat de malalties cròniques inflamatòries tals com l'hepatitis viral, la prostatitis, infeccions per *Helicobacter pylori*, i altres [37] corrobora la hipòtesi. L'estrès oxidatiu, però, no només està involucrat en l'aparició de càncer sinó que també podria tenir un paper fonamental en la seva progressió; nivells elevats de ROS, la presència de dany al DNA i mancances en els sistemes de reparació i de control del cicle cel·lular són característiques freqüents en teixits neoplàsics [38]. A més, s'observen deficiències en la replicació donant lloc a aberracions cromosòmiques [39].

D'aquesta manera, es considera que la fixació de mutacions puntuals al genoma de cèl·lules en divisió pot provocar que aquestes noves cèl·lules incrementin la seva capacitat de creixement respecte les altres, desenvolupant càncer. Aquest tipus de mutació que contribueixen al desenvolupament de càncer s'anomenen mutacions conductores mentre que s'anomenen mutacions passatgeres si no contribueixen a un descontrol del creixement ni càncer. Analitzant genomes de càncer humà s'han identificat diverses mutacions puntuals conductores C:G a A:T predominants en càncers de pulmó, mama, ovari, gàstric, colorectal i melanòmic [40] així com nivells elevats de bases oxidades al DNA (8-oxo-G, faPy-A, faPy-G,...) [38]. És especialment destacable el cas del càncer de pulmó que es troba estretament lligat al consum de tabac. El tabac és una mescla complexa de més de 7000 components que inclouen un mínim de 60 potents oxidants i inductors de ROS [41] capaços d'unir-se i modificar químicament el DNA generant transversions de C:G a A:T i contribuint, d'aquesta manera, al desenvolupament i progressió de càncers [42]. En tumors malignes de diferents orígens s'observa, a més de les mutacions puntuals, un increment dels nivells de clústers de lesions oxidatives respecte teixits no cancerígens [23] així com nivells més elevats de DSBs [43].

La presència de lesions persistents al DNA de cèl·lules tumorals permet emprar alguns biomarcadors d'estrès oxidatiu per a diagnòstic, progressió i predicció de càncer de manera clínica [43]. Una estratègia per induir la mort cel·lular del tumor és la d'inhibir la maquinària redox. Les cèl·lules tumorals ja presenten nivells més elevats de ROS, de manera que incrementar-los pot ser una estratègia específica per induir la mort de les cèl·lules cancerígenes [44]. L'estrès oxidatiu és un marcador fenotípic de diversos

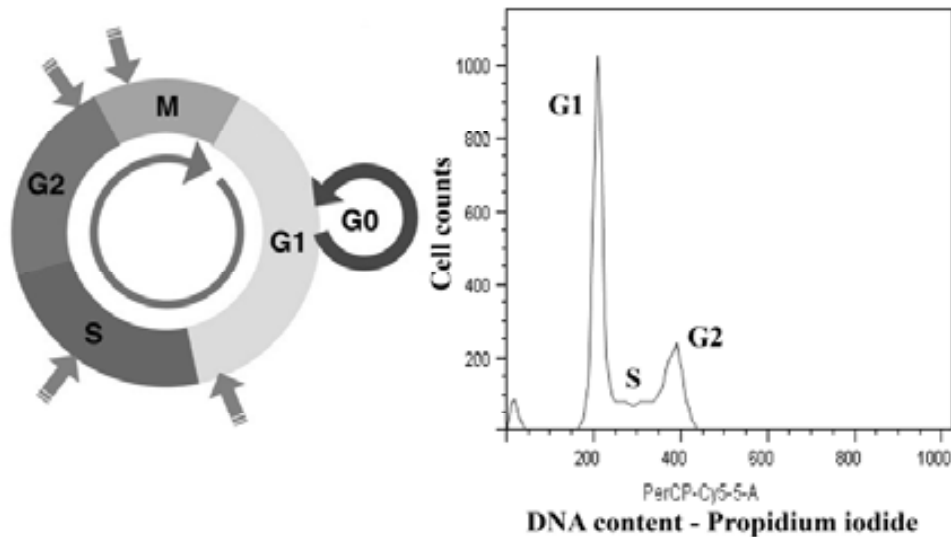
síndromes genètics caracteritzats per una alta predisposició a càncer i envelliment prematur tals com el síndrome de Down, l'Anèmia de Fanconi (FA), l'Atàxia telangiectàsica (A-T) o el síndrome de Werner [45].

Així doncs, la relació entre càncer i dany oxidatiu és molt estreta i extensa sent de màxima importància l'estudi dels mecanismes de reparació i de la resposta cel·lular al dany per comprendre globalment el procés de càncer.

## **1.5. Mecanismes de reparació del dany oxidatiu en cèl·lules eucariotes**

Les cèl·lules han desenvolupat diversos mecanismes de reparació del dany, cada un d'ells específic per un tipus de lesió concreta. Per a reparar el dany oxidatiu i les mutacions induïdes per ROS i NOS, les cèl·lules empren diferents mecanismes de reparació concrets i altament especialitzats per preservar la integritat del genoma. La via essencial i fonamental de reparació del dany oxidatiu i bases oxidades és la reparació per escissió de bases (BER) i, en menor mesura, el sistema de reparació per excisió de nucleòtids (NER) [46]. Altres mecanismes involucrats en la reparació del dany oxidatiu són els mecanismes de reconeixement de mals aparellaments de bases (MMR) i la reparació mitjançant BER post-replicatiu amb l'acció de les glicosilases específiques MUTYH i UNG2.

Els mecanismes de reparació de les lesions induïdes pel dany oxidatiu difereixen lleugerament segons la fase del cicle cel·lular en que es produeix el dany. És per aquest motiu que es classifiquen en aquesta introducció segons la fase del cicle cel·lular. Així doncs, s'han dividit els sistemes de reparació entre els que tenen lloc durant la fase del cicle cel·lular posterior a la mitosi i abans de la següent fase de replicació del DNA (fase  $G_1$  o estacionària  $G_0$  si la cèl·lula entra en quiescència) i els que tenen lloc durant la fase replicativa o fase S i abans de la mitosi (en fase  $G_2$ ). Aquesta divisió dels sistemes de reparació es basa en la capacitat de la cèl·lula de disposar d'una còpia exacte de DNA com a substrat de reparació, en fase S i  $G_2$  del cicle, o l'absència d'aquesta còpia, en fase  $G_1/G_0$ . Un esquema del cicle cel·lular de cèl·lules eucariotes i l'anàlisi del cicle mitjançant iodur de propidi (PI) i citometria de flux es presenta a la fig.4.



**Figura 4. Esquema representatiu del cicle cel·lular en cèl·lules eucariotes i anàlisi del cicle per citometria de flux.** A l'esquerra es mostra un esquema del cicle cel·lular incloent totes les fases. En fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular, la cèl·lula incrementa el seu volum cel·lular i es prepara per iniciar la duplicació del seu material genètic. En fase S del cicle cel·lular es produeix la replicació del DNA per passar a la fase G<sub>2</sub>. Finalment la cèl·lula es prepara per la divisió mitòtica (M) i es divideix en dues cèl·lules filles que tornen a iniciar el cicle en fase G<sub>1</sub>. Les cèl·lules que no es divideixen activament entren en quiescència o fase G<sub>0</sub> del cicle. Les fletxes indiquen punts de control del cicle cel·lular en els quals la cèl·lula pot decidir aturar el cicle. A la dreta, anàlisi de la quantitat de DNA present durant el cicle cel·lular en cèl·lules en cultius asincrònics. En fase G<sub>1</sub>, les cèl·lules contenen una quantitat de DNA "n" mentre que en fase S incrementa la quantitat de DNA fins assolir la duplicació completa en fase G<sub>2</sub> en que les cèl·lules tenen una quantitat de DNA "2n" just abans de la divisió o mitosi en dues cèl·lules filles.

## 1.6. Fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular

La reparació per BER és el tipus essencial i principal de reparació de bases oxidades al DNA. La ruta de reparació BER és capaç de reparar el DNA per dos subrutes, la reparació per via curta (SP-BER) i la reparació per via llarga (LP-BER). La SP-BER permet la reparació d'un únic nucleòtid mentre que la LP-BER genera un pedaç de com a mínim dos nucleòtids en el procés de reparació. El sistema de reparació BER va ser descobert cercant l'activitat enzimàtica que podia catalitzar l'eliminació de la base mutagènica U al DNA identificant les proteïnes d'*E.coli* responsables de fer-ho [47], per acabar identificant la ruta completa de SP-BER. Cap a mitjans dels anys 90, es va descobrir una ruta alternativa per a la reparació de bases oxidades, la LP-BER en que intervenen noves proteïnes en una escissió més llarga de nucleòtids en la reparació d'una única base danyada [48].

Ambdues rutes són iniciades per l'escissió de la base danyada per part d'una de les moltes glicosilases de DNA que la reconeixen específicament i en catalitzen l'eliminació (faPyG, 8-oxoG, U, fapyA,...). Per completar la reparació BER es necessita



com a mínim l'acció coordinada de tres enzims addicionals més. Aquests enzims duen a terme l'escissió, el farciment dels espais i la lligació final a la cadena original. Així doncs, per realitzar la reparació BER es necessiten quatre proteïnes essencials: una glicosilasa de DNA, una endonucleasa de llocs AP o una liasa AP, una polimerasa de DNA i una lligasa de DNA [49]. Degut a l'acció continuada dels ROS durant el metabolisme cel·lular i la necessitat de preservació del genoma de les espècies per a la pròpia supervivència, el sistema de reparació BER, principal responsable de la reparació del dany induït per ROS, està fortament conservat des de *E.coli* fins a mamífers amb petites modificacions [22]. Aquest alt grau de conservació indica que el sistema de reparació BER és un sistema de reparació essencial en la majoria d'organismes vius.

### 1.6.1. SP-BER

El procés s'inicia per les glicosilases de DNA, funció que en humans desenvolupa bàsicament la proteïna 8-oxoG glicosilasa de DNA (OGG1) encarregada de corregir les bases oxidades 8-oxoG, faPyG i 8-oxoA del DNA [50], i en menor mesura, la glicosilasa I semblant a endonucleasa VIII (NEIL1) encarregada d'entre altres de l'eliminació de faPyG i 5-OHU. Convé també destacar l'acció de les quatre glicosilases de DNA d'U (UNGs) conegudes fins al moment i en especial SMUG1 que escindeix específicament en fase no replicativa l'U de la desaminació de la C aparellat amb la G (U:G) [51]. Actualment s'han descrit fins a 11 glicosilases diferents i específiques per les bases oxidades al DNA, moltes de les quals amb funcions d'identificació redundants de bases oxidades.

La funció de les glicosilases de DNA és reconèixer específicament, escindir de manera hidrolítica i eliminar la base alterada. Les glicosilases generen un lloc AP sense modificar l'estructura del DNA [47]. El lloc AP és processat i tallat per les endonucleases AP, bàsicament APEX1, que escindeix el sucre fosfat romanent del lloc AP generant un 3'-hidroxil i un extrem 5'-deoxiribosafosfat (5'dRp) [52]. L'extrem 5'dRp és escindit gràcies a l'activitat dRp liasa de la polimerasa de DNA beta (DNA pol $\beta$ ). D'aquesta manera es genera un lloc orfe de nucleòtid que serà posteriorment omplert per la pròpia activitat d'incorporació d'un únic nucleòtid de la DNA pol $\beta$  [53]. Algunes glicosilases tenen capacitat liasa intrínseca de manera que elles mateixes són capaces d'escindir la cadena; són les glicosilases bifuncionals com ara OGG1. Les

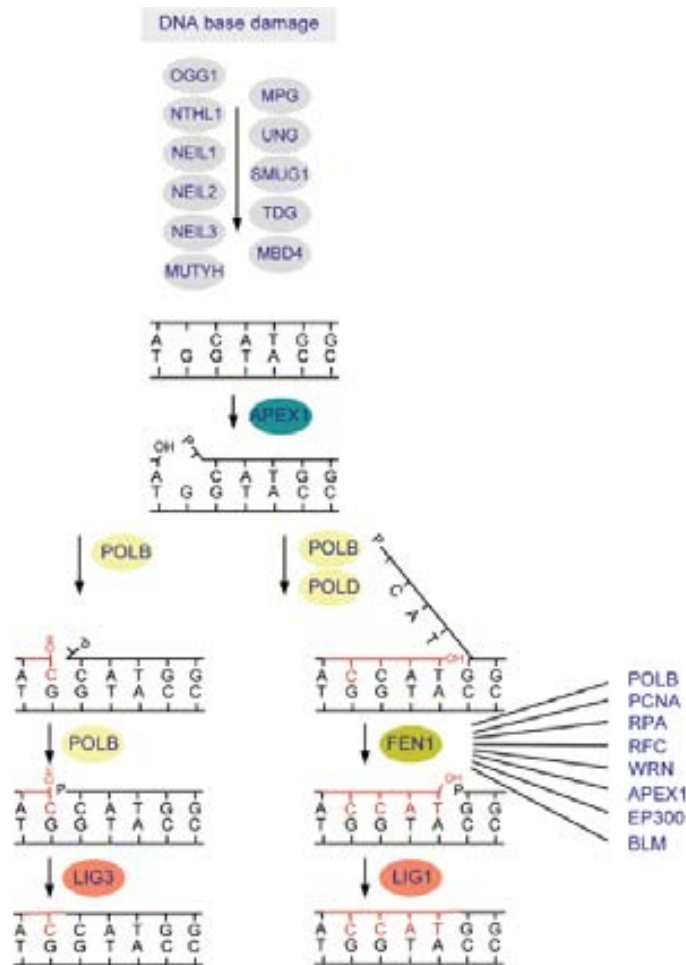
glicosilases que els manca aquesta activitat són les anomenades glicosilases monofuncionals com ara SMUG1. Finalment una lligasa de DNA, la lligasa III de DNA (DNA ligIII) unida a la proteïna I de complementació a raig X transversals (XRCC1), segella el *nick* i finalitza el procés de reparació per SP-BER de manera que es recupera l'estructura original de la doble hèlix de DNA [54]. XRCC1 és reclutada ràpidament després de l'acció la APEX1 al mateix lloc on s'ha produït el tall o *nick*. La seva funció, tot i que no té activitat enzimàtica coneguda, és la de reclutar i actuar com a base d'interacció de varies proteïnes tals com la DNA pol $\beta$  i coordinar la ruta de SP-BER [49].

El sistema de reparació SP-BER és capaç d'identificar correctament una base danyada, escindir-la i substituir-la per la base corresponent generant un sol lloc AP durant el procés de reparació. El procés es mostra esquematitzat a la part esquerra de la fig.5.

### **1.6.2. LP-BER**

En LP-BER, el reconeixement del dany es produeix de manera semblant mitjançant les mateixes glicosilases de DNA que en SP-BER per iniciar la reparació. Després del tall generat per la APEX1 es forma el *nick* 5' al lloc AP i es recluten la DNA pol $\beta$  i/o la DNA pol $\delta$  i la DNA pol $\epsilon$ , l'antigen de proliferació nuclear (PCNA), el factor C de replicació (RF-C) que carrega PCNA al DNA, la endonucleasa flap 1 (FEN1), i probablement la lligasa replicativa I (LigI) [55]. Totes aquestes proteïnes són les encarregades de finalitzar la reparació de la base generant un pedaç de com a mínim dos nucleòtids que restableix l'estructura original descrita per Watson i Crick. Es postula que la DNA pol $\beta$  iniciaria la incorporació del nucleòtid escindit [56] i, tot i que té capacitat de desplaçament de la cadena de DNA, seria substituïda per les DNA pol $\delta$  o DNA pol $\epsilon$ . Aquestes polimerases replicatives polimeritzarien fragments de DNA d'entre dos i dotze nucleòtids de llargada de manera dependent de PCNA [48]. El desplaçament de la cadena per part de l'activitat de síntesi de la DNA pol $\beta$ /pol $\delta$ / $\epsilon$  genera una estructura en penjoll que és refractària a lligació. La endonucleasa FEN1 resol el problema generat per l'activitat sintètica de les polimerases catalitzant l'eliminació de l'estructura en penjoll generada per permetre la lligació final. D'aquesta manera, finalitza la reparació per LP-BER i es reconstitueix l'estructura original en doble hèlix contínua (fig.5). L'acció de la proteïna FEN1, modulada per la seva

interacció amb PCNA [57], és imprescindible per al correcte processament del dany a través de LP-BER però en canvi és irrellevant en SP-BER [58].



**Figura 5. Ruta de reparació de SP-BER i LP-BER.** La figura mostra el conjunt d'interaccions entre el DNA i les proteïnes en la reparació per BER en mamífers. La reparació per SP-BER està esquematitzada a l'esquerra de la imatge mentre que la reparació per LP-BER a la dreta. Quan es produeixen lesions oxidatives en bases del DNA, les glicosilases de DNA (encerclades en color lila clar) s'encarreguen de reconèixer específicament la base i excidir-la de manera que generen un lloc AP a la cadena de DNA. Posteriorment, APEX1 excideix el sucre fosfat romanent del lloc AP. La reparació prossegueix mitjançant les DNA pol $\beta$  en la SP-BER i la cadena és lligada per l'acció de la DNA ligIII (esquerra). En LP-BER intervien les polimerases DNA pol $\beta$  i la replicativa DNA pol $\delta$  unida a PCNA en la polimerització d'un fragment de DNA de com a mínim dos bases (dreta). Posteriorment, la endonucleasa FEN1 excideix l'estructura en penjoll romanent i es produeix la lligació final per la DNA ligI. Les proteïnes que apareixen en blau i sense cercle són proteïnes complementàries i necessàries per al correcte processament del dany per LP-BER [22].

Pel correcte funcionament i eficiència de la via de reparació curta i llarga es produeixen nombroses interaccions entre les diferents glicosilases de DNA específiques iniciadores del procés i la resta de components del sistema de reparació BER [59]. L'elecció d'una o altra via de reparació per part de la maquinària de reparació cel·lular no és del tot coneguda tot i que s'hipotetitza que podria estar controlat per la

concentració de trifosfat d'adenosina (ATP) proper al lloc AP mitjançant el complex format per la DNA lligIII/XRCC1 [60].

## **1.7. Mecanismes de reparació del dany oxidatiu en fase S del cicle cel·lular**

Si els mecanismes per mantenir la integritat genòmica són importants en fase no replicativa del DNA com s'ha comentat en l'apartat anterior, durant la replicació del DNA probablement adquireixen una major importància. Per assegurar una bona transmissió del material genètic a la descendència és fonamental que aquest sigui replicat correctament per preservar el correcte funcionament de les cèl·lules filles. Quan el DNA és atacat per agents oxidants durant la replicació es poden produir amb certa regularitat errors en la inserció de les bases corresponents per les polimerases replicatives DNA pol $\delta/\epsilon$ . Aquests errors són deguts, com ja s'ha comentat anteriorment, al mimetisme que poden tenir algunes bases oxidades amb les bases intrínseques al DNA. La perillositat de la incorporació d'algunes de les bases oxidades al DNA és molt elevada ja que s'aparellen de tal manera que són estructuralment idèntiques a la conformació habitual en dúplex del DNA. Al no modificar l'estructura en doble hèlix, és més fàcil que les bases oxidades escapin els mecanismes de control de la cèl·lula provocant la fixació de mutacions en la posterior replicació. Per evitar-ho, la cèl·lula eucariota disposa de mecanismes de reconeixement d'aquests aparellaments un cop s'ha sintetitzat, o s'està en el procés de síntesi de la nova cadena que serà transmesa a la cèl·lula filla. L'aparellament més freqüent i el més estudiat és el que es produeix entre la 8-oxoG:A que és bàsicament reparat per dos mecanismes diferents: el sistema BER postreplicatiu i el sistema de reparació per MMR. Convé recordar que l'aparellament U:A degut a la desaminació de la C és també molt freqüent en condicions d'estrès oxidatiu i en estats cel·lulars proinflamatoris i és específicament reparat en fase S del cicle cel·lular pel procés de BER postreplicatiu mitjançat per la glicosilasa de fase S UNG2.

### 1.7.1. BER post replicatiu: MUTYH

Les proteïnes MutY d'*E.coli* i la seva homòloga en humans MUTYH són les glicosilases de DNA monofuncionals capaces de reconèixer l'aparellament erroni entre la base oxidada 8-oxoG/fapyG/5-OHU i l'A després de replicació. Aquestes glicosilases escindeixen específicament l'A mal incorporada [61]. L'estructura de MUTYH és considerablement més llarga que MutY i incorpora, a més del domini catalític, dos dominis d'interacció a PCNA i a la proteïna de replicació A (RPA) a més d'incloure una seqüència de localització nuclear [62]. Aquesta estructura, permet a MUTYH encerclar específicament el DNA i gràcies a la interacció amb PCNA i RPA identificar la cadena apropiada [63] per voltejar l'A mal incorporada, reclutar APEX1 i procedir a la escissió de l'A [62].

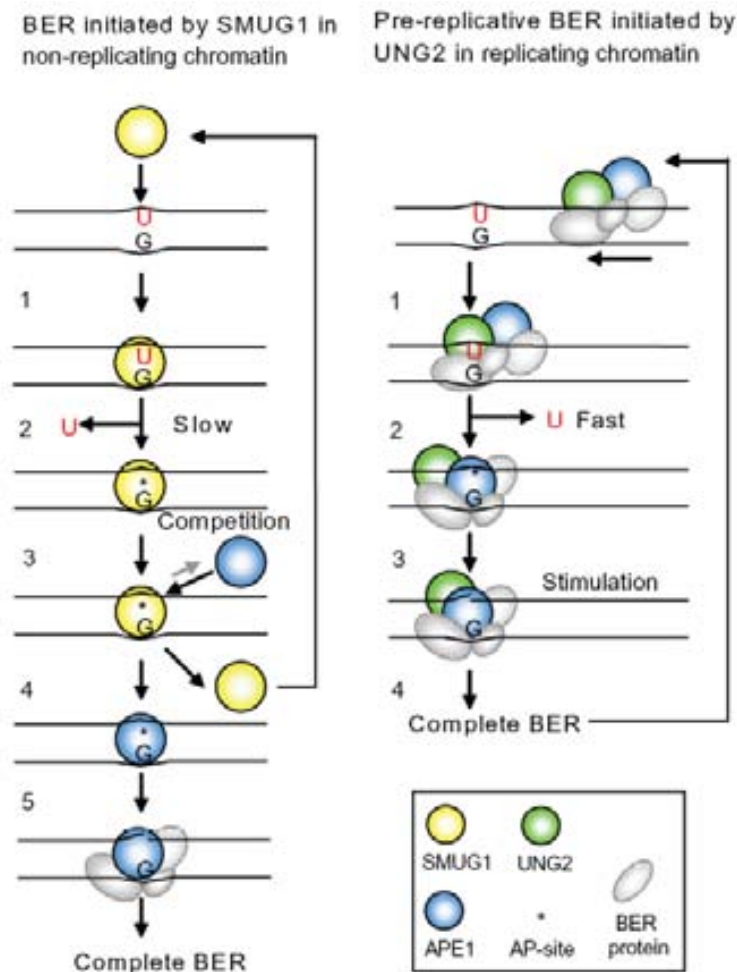
El mecanisme de regulació de MUTYH *in vivo* no és molt conegut tot i que es coneixen certs mecanismes de regulació: la localització nuclear de MUTYH incrementa en fase S o replicativa del cicle cel·lular de 3 a 4 vegades respecte la seva localització nuclear en fase primerenca G<sub>1</sub> o no replicativa. Aquesta diferència en la localització ens dóna a entendre que la seva acció principal té lloc de manera coordinada amb PCNA durant la síntesi de DNA per a la detecció de mals aparellaments en fase replicativa [64]. La observació de MUTYH en foci replicatius o acumulacions de proteïnes replicatives juntament amb PCNA i RPA [62] reforça aquesta hipòtesi conjuntament amb l'observació d'un increment de fins a 14 vegades de la seva activitat de reparació d'un substrat replicatiu respecte d'un de no replicatiu *in vivo* [63]. Són molt poc conegudes les modificacions post-traduccionals que podrien regular l'activitat de MUTYH ja que només es disposen de dades *in vitro*. La fosforilació de MUTYH per la proteïna cinasa K incrementa la seva activitat de reparació de substrats 8-oxoG:A [65] tot i que caldria aprofundir en com aquesta fosforilació afectaria la seva estabilitat i activitat *in vivo*.

En conjunt, és extremadament interessant estudiar la regulació a través de cicle cel·lular de MUTYH i la seva associació amb PCNA amb més detall; modificacions post-traduccionals de PCNA com ara la seva coneguda monoubiquitinació o sumorilació al residu lisina 164, dels quals en parlarem abastament en capítols posteriors, així com la pròpia fosforilació de MUTYH podrien està involucrats en la regulació i estabilització de la interacció PCNA-MUTYH i en la posterior reparació del dany oxidatiu induït al DNA.

### 1.7.2. BER post replicatiu: UNG2

La desaminació de la C a U és absolutament mutagènica si no és reparada abans de la replicació ja que les polimerases replicatives DNA pol  $\delta/\epsilon$  incorporen sempre una A al lloc oposat afavorint la fixació de mutacions per transicions C:G a T:A com s'ha comentat amb anterioritat. Si en fase no replicativa de DNA la glicosilasa UNG SMUG1 és la responsable de l'escissió de la base, en fase replicativa ho és la glicosilasa UNG2 que reconeix específicament l'aparellament U:A generant un lloc AP que serà subseqüentment processat i reparat [66]. L'expressió de la glicosilasa UNG2 està altament regulada durant el cicle cel·lular de manera que és expressada específicament durant la fase S del cicle cel·lular. Així doncs, UNG2 és expressada principalment en teixits proliferatius tals com l'intestí prim, testicle i colon [67] i pràcticament no s'expressa en cèl·lules quiescents. El seu mecanisme de reconeixement del dany sembla lligat a la progressió de la forquilla de replicació mitjançant la interacció amb PCNA i RPA en els foci replicatius per escindir ràpidament l'U mal incorporat, aparellat amb la G, abans que aquest sigui sintetitzat per les polimerases replicatives de DNA. D'aquesta manera, s'evita la fixació de mutacions [68]. La glicosilasa UNG2 és el principal enzim d'eliminació d'U en fase replicativa de DNA, reconeix l'aparellament U:G com SMUG1 i és pràcticament exclusiu en el reconeixement de la parella U:A. Així, és especialment important mantenir una correcta regulació i funcionament de l'enzim per evitar la fixació de mutacions [69]. S'hipotetitza que UNG2 escindeix pre-replicativament l'aparellament U:G generat per desaminació de la C immediatament davant de la forquilla de replicació com es descriu a la fig.6B. La interacció de UNG2 amb la proteïna RPA als llocs de ssDNA i més concretament a les forquilles de replicació indica la potencialitat d'escissió de l'enzim de la parella altament mutagènica U:A que ha escapat la reparació pre-replicativa per evitar o minimitzar mutacions [70]. El mecanisme a través del qual es finalitza el sistema de BER post-replicatiu iniciat per UNG2 és poc conegut; UNG2 s'ha vist associat a complexos de reparació de SP i LP-BER juntament amb APEX1, DNA pol $\beta$ , DNA pol $\delta$ , PCNA, XRCC1 i lligases de DNA [69] tot i que no és clar si tots aquests factors es presenten en un únic complex o si coexisteixen en dos complexos, un per SP-BER i l'altre per LP-BER. D'igual manera, per escindir l'aparellament U:A post-replicatiu s'hipotetitza que podrien estar involucrats mecanismes de reparació per recombinació (HR) i de síntesi per translesió (TLS) [71] tot i que aquestes hipòtesis estant poc estudiades.

Una qüestió important que queda per elucidar és el mecanisme a través del qual la glicosilasa UNG2 reconeix l'U i com, juntament amb d'altres factors, és modificada post-traduccionament per assegurar la correcta reparació de la C desaminada en fase S del cicle cel·lular. De ben segur que aquestes noves interaccions ajudaran a comprendre la desregulació en el processament de l'U genòmic i d'algunes malalties humanes associades a defectes en el correcte processament de l'U.



**Figura 6. Model il·lustratiu de la reparació de la C desaminada a U per les rutes de reparació de BER pre-replicatiu iniciada per SMUG1 i BER post-replicatiu iniciada per UNG2.** Esquerra, la glicosilasa SMUG1 s'uneix a la lesió i interacciona amb les dues cadenes de DNA de la doble hèlix i elimina l'U generant un lloc AP (1 i 2). Llavors, APE1 competeix amb SMUG1 per unir-se al lloc del dany i el desplaça (3 i 4). La glicosilasa SMUG1 pot seguir realitzant la seva funció detectant nous U al DNA. Finalment APE1 escindeix la cadena del DNA i es recluten la DNA pol $\beta$ , XRCC1 i la DNA ligIII per completar la reparació BER (5). Dreta, UNG2 forma part d'un complex que detecta l'aparellament U:G just davant de la forquilla de replicació (1). Un cop es detecta l'U, el domini catalític de UNG2 escindeix l'U de la doble hèlix de DNA de manera molt eficient. Un cop s'ha produït l'escissió, UNG2 és ràpidament desplaçat del lloc AP per APE1 que realitza el tall a la cadena de DNA estimulat per UNG2 i es completa la reparació BER (2 i 3) [72].

### 1.7.3. MMR

El sistema de reparació MMR és el sistema clàssic de reparació de bases mal aparellades al DNA. Els aparellaments erronis de bases es produeixen principalment com a resultat d'errors que passen inadvertits per part de l'activitat correctora de les polimerases de DNA durant el procés de replicació. El sistema MMR també és capaç de reconèixer i corregir els bucles d'inserció o deleció (IDLs) produïts per errors en la síntesi en regions repetitives de DNA o microsatèl·lits [73]. Així doncs, el sistema MMR és un sistema eminentment lligat a replicació i que, per al seu correcte funcionament, necessita a part del reconeixement eficient de les bases danyades i els IDLs, dirigir la maquinària de reparació cap a la cadena de nova síntesi que és la que conté la informació genètica errònia. D'aquesta manera, es dona una nova oportunitat de còpia de la cadena original sense cometre nous errors a les polimerases replicatives de DNA.

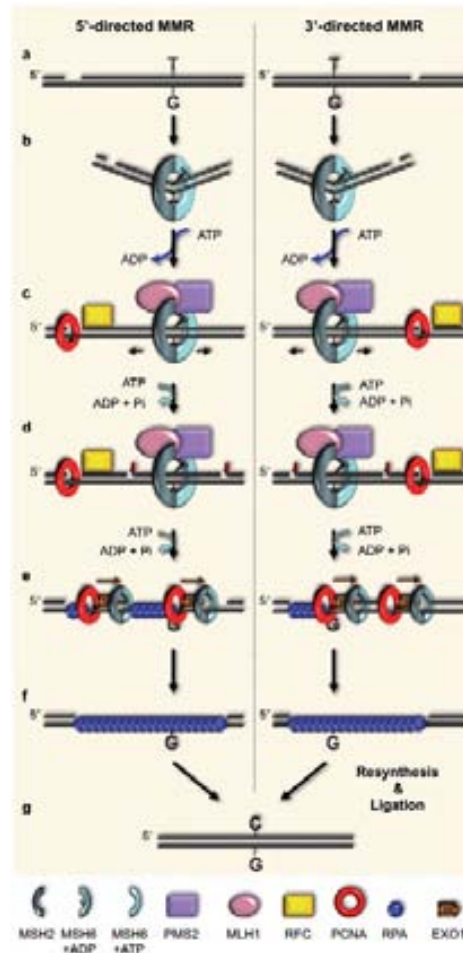
Tal i com succeeix en BER, MMR té moltes proteïnes homòlogues entre bacteris i mamífers sent un mecanisme de reparació molt conservat evolutivament [74]. Es postula que tant les glicosilases de DNA com MUTYH i el sistema de reparació MMR competeixen en el processament de mals aparellaments de base generats pel dany oxidatiu després de replicació de DNA com ara l'aparellament 8-oxoG:A i que ambdós mecanismes són capaços d'escindir correctament la base mal incorporada i eliminar-la [75]. Aquest solapament de funcions en rutes independents es veu confirmat en l'increment de nivells de 8-oxoG en DNA d'animals dobles mutants per la glicosilasa MUTYH i proteïnes essencials de MMR respecte els mutants senzills que també mostren un increment de nivells de 8-oxoG respecte animals salvatges [76].

El sistema de MMR en eucariotes està format per 5 proteïnes homòlogues a MutS d'*E.coli* (MSH). MSH2 forma un heterodímer amb MSH6 per iniciar la reparació i el reconeixement de les bases mal aparellades o de petits IDLs en l'anomenat complex MutS $\alpha$  mentre que l'heterodímer MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ) és capaç de reconèixer llargs IDLs [74]. El complex MutS $\alpha$  eucariota reconeix específicament els aparellaments erronis gràcies al domini altament conservat de MSH6 Phe-X-Glu [77] mentre que el mecanisme de reconeixement dels petits IDLs pel complex MutS $\beta$  és desconegut.

Els complexos MutS tenen dominis d'interacció a PCNA i al complex replicatiu de manera que se suposa que ambdós heterodímers tenen capacitat de controlar la correcta progressió de la síntesi de DNA i que és per aquest mecanisme que inicien la



reparació del dany [78]. De fet, la unió de MutS $\alpha$  amb PCNA és dependent de replicació. Quan es produeix la localització d'una base mal aparellada es produeix la dissociació del complex PCNA/MutS per permetre la correcte reparació per MMR evitant o minimitzant nova síntesi de DNA errònia [79].



**Figura 7. Esquema general del sistema de reparació per MMR en mamífers.** El sistema de reparació MMR requereix una discontinuïtat a 3' o a 5' de la cadena per iniciar la identificació de la base introduïda erròniament durant la síntesi de DNA (a). L'heterodímer format per MSH2/MSH6 (MutS $\alpha$ ) reconeix el mal aparellament (b) i recluta el complex format per PMS2 i MLH1 (MutL $\alpha$ ) (c). L'activitat endonucleasa latent de PMS2 genera talls a la cadena de DNA de nova síntesi depenent de la hidròlisi d'ATP i de la interacció amb PCNA, RFC, i MutS $\alpha$  (d). Aquests talls permeten a la exonucleasa EXO1 actuar a la cadena de nova síntesi i degradar-la conjuntament amb l'acció de MutS $\alpha$  (e). Les regions de ssDNA són ràpidament protegides per RPA que s'uneix al DNA evitant-ne la degradació (f). Finalment, es carrega la DNA pol $\delta$  i es realitza la resíntesi de la cadena per restablir l'estructura del DNA sense errors (g) [80].

El procés de reparació continua gràcies a les proteïnes homòlogues a MutL d'*E.coli*: MLH1, MLH2, PMS1 (proteïna de segregació post-mitòtica 1) i PMS2 que s'organitzen en tres heterodúplex, sent el format per MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) el més important per la seva interacció amb MutS $\alpha$  i per la seva capacitat de reconèixer la nova

cadena de DNA. D'aquesta manera, es dirigeix la maquinària de reparació en la direcció adequada. A més, el complex desenvolupa funcions en el procés de recombinació meiótica. La resta de complexos MutL $\beta$  i  $\gamma$  són de funció desconeguda. Mutacions en proteïnes del complex MutL $\alpha$  produeixen inestabilitat de microsatèl·lits i fenotip mutador a nivells comparables al mutant deficient per MSH2 [74]. Un cop el complex MutS $\alpha$  reconeix les bases mal aparellades i activa el complex MutL $\alpha$ , es produeix l'escissió de la cadena de DNA de nova síntesi mitjançant la exonucleasa 1 (EXO1) amb activitat bidireccional 5'-3' i viceversa [81] fins que és eliminada la base mal aparellada. Llavors, MutL $\alpha$  inhibeix l'activitat EXO1 per aturar la degradació de DNA i es carrega la DNA pol $\delta$  acompanyada de PCNA per a la re-síntesi de DNA. El tros de cadena senzilla de DNA generat per l'escissió és protegida de degradació mitjançant la proteïna d'unió a ssDNA RPA. Finalment la DNA ligI segella el *nick* completant el procés de reparació per MMR. D'aquesta manera, es reconstitueix *in vitro* el sistema de reparació MMR amb la presència de les proteïnes MutS $\alpha$ , MutL $\alpha$ , DNA pol $\delta$ , RPA, PCNA i EXO1 [82]. El procés de reparació es visualitza pas a pas a l'esquema presentat a la fig.7.

Tot i que la reconstitució *in vitro* del sistema MMR no involucra cap polimerasa de TLS es podria hipotetitzar que en el cas de l'escissió del mal aparellament entre les bases oxidades i bases normals de nova síntesi, com ara 8-oxoG:A, el procés de re-síntesi requerís la presència d'alguna polimerasa de translesió per la correcte inserció d'una C oposada a la base oxidada 8-oxoG.

## **1.8. Importància de la senyalització per ubiquitinació en mecanismes de reparació del dany**

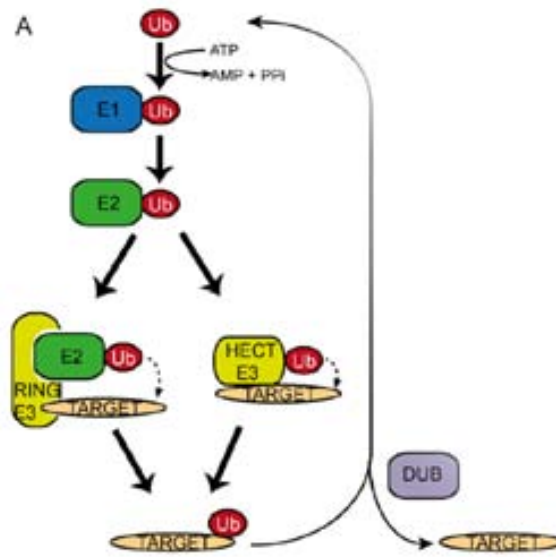
La ubiquitinació és el procés químic clàssic d'unió covalent de residus ubiquitina (Ub) a residus lisina (K) de proteïnes cel·lulars dianes per dirigir-les al proteasoma on són subseqüentment degradades. Recentment, s'ha descrit la ubiquitinació com un procés de regulació post-traducciona modulador de la funció d'algunes proteïnes involucrades en la reparació del dany al DNA. El procés d'ubiquitinació està catalitzat per tres enzims: l'enzim d'activació de la Ub o E1, l'enzim de conjugació de la Ub o E2 i l'enzim de lligació de la Ub a la proteïna diana corresponent o E3 [83]. El procés d'ubiquitinació és reversible de manera que es pot

recuperar la forma no ubiquitinada de les proteïnes mitjançant els enzims de deubiquitinació (DUBs) [84]. Es presenta una visió general esquemàtica de la cascada d'ubiquitinació d'una proteïna diana a la fig.8. Les proteïnes diana poden ser modificades per l'addició d'un monòmer d'Ub a un residu K en el procés denominat monoubiquitinació, per l'addició d'Ub a múltiples K per multi-monoubiquitinació, o l'addició d'una cadena d'Ub a un residu K prèviament ubiquitinat en el procés de poliubiquitinació. Resta en controvèrsia si la monoubiquitinació és un requisit necessari per a la poliubiquitinació [85]. La Ub té 7 residus K, sent un dels més importants el residu K48 que en cadena de poliubiquitinació determina que les proteïnes diana poliubiquitinades siguin degradades pel proteasoma 26S en eucariotes. Aquest procés es considera un mecanisme bàsic de renovació de proteïnes cel·lulars [86].

Recentment, s'han descrit nombroses modificacions post-traduccionals d'ubiquitinació en moltes proteïnes encarregades de la senyalització i reparació del dany al DNA. La monoubiquitinació també s'ha vist involucrada en processos d'endocitosi, regulació transcripcional i de modulació del codi d'histones. Tant la monoubiquitinació com la poliubiquitinació de proteïnes provoquen que aquestes canviïn de conformació de manera que la proteïna modificada post-traduccionalment adquireix noves funcions tals com canvis en la seva localització cel·lular, modulacions en la seva activitat enzimàtica i/o permet el reclutament d'altres proteïnes. El reclutament d'altres proteïnes a través de la interacció amb els residus de proteïnes ubiquitinades està estretament vinculat a la reparació del DNA i n'existeixen nombrosos exemples que detallarem a continuació. Les proteïnes reclutades, interaccionen específicament amb els residus Ub de proteïnes monoubiquitinades/poliubiquitinades a través dels dominis d'unió a Ub, UBM i UBZ principalment, afavorint les cascades de senyalització i reparació del dany [87].

En el cas de proteïnes de resposta a dany al DNA modificades per ubiquitinació, s'utilitza el residu K63 de la Ub per a la poliubiquitinació de les proteïnes diana. La resta de residus K de la Ub poden formar cadenes d'Ub *in vitro* tot i que la seva funció resta per elucidar *in vivo*. Es postula però que aquests altres residus K de la Ub podrien tenir implicacions en processos de reparació del DNA [88]. El que sembla clar és que estudiar més profundament les modificacions post-traduccionals d'ubiquitinació així com de les més conegudes fosforilacions de les proteïnes involucrades en la reparació del DNA portarà a comprendre millor el seu funcionament i a descriure com, el codi d'ubiquitinació utilitzat per la cèl·lula modula i coordina la resposta al dany al DNA.

Una de les rutes de reparació en que juga un paper fonamental la ubiquitinació és la ruta de reparació dels DSBs on s'ha demostrat que els foci o acumulacions de proteïnes al lloc del dany per a la correcte reparació depèn de les ubiquitinacions de varies proteïnes [89]. En destaca la funció de la lligasa E3 RNF8 i el seu enzim de conjugació E2 UBC13 que catalitzen la poliubiquitinació de les histones H2A i H2AX extensament conegudes per la seva senyalització del dany [90]. La poliubiquitinació de les histones de resposta a DSBs permet el reclutament i la localització en foci de proteïnes tant importants com BRCA1 o 53BP1 imprescindibles per la reparació dels DSBs.



**Figura 8. Cascada d'ubiquitinació estàndard per una proteïna diana.** Cascada d'ubiquitinació representada pels enzims d'activació de la Ub o E1, l'enzim de conjugació de la Ub o E2 i l'enzim de lligació de la Ub o E3. Un cop la proteïna diana és ubiquitinada, aquesta pot ser deubiquitinada per l'enzim de deubiquitinació específic o DUB. El procés d'ubiquitinació/deubiquitinació és un procés dinàmic i en equilibri [91].

Una altra ruta molt important de reparació regulada per ubiquitinació és la ruta de FA de reparació d'enllaços ICLs al DNA que serà descrita extensament al capítol posterior. En aquest cas, les proteïnes centrals de la ruta FANCD2 i FANCI són monoubiquitinades per un complex de proteïnes que actua com a E3, de les quals FANCL en té l'activitat catalítica conjuntament amb la conjugasa d'Ub E2 UBE2T [92]. La monoubiquitinació de FANCD2 i FANCI als residus K561 i K523 respectivament provoca que ambdues migrin a cromatina al lloc de reparació o foci de reparació de ICLs reclutant noves proteïnes de reparació. De fet, la majoria de casos clínics de FA estant caracteritzats per deficiències en l'activació de FANCD2 per

monoubiquitinació donant a entendre la importància biomèdica d'aquest tipus de senyalització [93].

La presència de lesions al DNA que bloquegen la forquilla de replicació és un dels problemes més greus amb els que ha de bregar la cèl·lula. Si la cèl·lula no és capaç d'aturar i reparar la lesió, les forquilles poden col·lapsar generant DSBs capaços de provocar reordenaments cromosòmics i, en el més greu dels casos, la mort cel·lular. Per evitar-ho, la cèl·lula ha desenvolupat sistemes de tolerància al dany (DDT) de manera que és capaç de sobrepassar la lesió sense repara-la per assegurar la replicació del DNA. Aquest mecanisme serà descrit amb més detall més endavant. Un dels punts claus per a realitzar DDT és la monoubiquitinació d'una altra proteïna, en aquest cas, de PCNA que es monoubiquitina en resposta a lesions capaces de bloquejar les forquilles de replicació al residu K164. Aquest residu de PCNA es troba molt conservat evolutivament i és del tot imprescindible per a la correcta resposta a lesions bloquejants [94]. A més de la monoubiquitinació, PCNA pot ser modificat per poliubiquitinació i sumorilació desencadenant diferents rutes de reparació.

Com s'ha comentat, el procés d'ubiquitinació/deubiquitinació és un procés dinàmic. El genoma humà codifica per més de 100 DUBs encarregades d'eliminar els residus Ub de les proteïnes diana [95]. Aquí en destacarem una, abastament estudiada per la seva capacitat deubiquitina de les dos proteïnes principals monoubiquitinades en resposta a lesions bloquejants al DNA que acabem de comentar FANCD2 i PCNA; la DUB 1 de la família de les proteases específiques d'ubiquitina, USP1 [96, 97]. USP1 connecta d'aquesta manera ambdues rutes moleculars i desenvolupa un paper important en la regulació de l'equilibri dinàmic entre ubiquitinació/deubiquitinació. De fet, el fenotip del mutant d'USP1 en ratolí presenta una acumulació de PCNA i FANCD2 monoubiquitinats i un increment de la sensibilitat a ICLs i fragilitat cromosòmica [98]. El mecanisme de regulació de les modificacions post-traduccionals per ubiquitinació de les dues proteïnes no només es limita a l'enzim de DUB USP1, sinó que l'equilibri també està regulat per l'enzim lligasa d'ubiquitina E3, RAD18. RAD18 és imprescindible per a la monoubiquitinació de PCNA en resposta a dany al DNA i per a la localització de FANCD2 i FANCI a cromatina després de dany per desenvolupar les seves funcions de reparació [99].

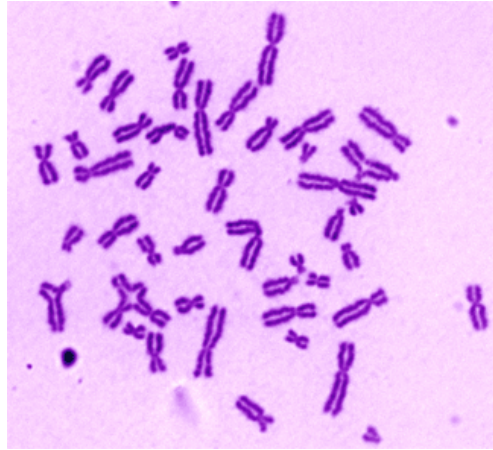
Aquests són alguns dels exemples de les proteïnes involucrades en la reparació del dany que estan modificades post-traduccionalment a través de la introducció d'Ub [91]. En el present treball estudiarem les modificacions per monoubiquitinació

observades després de tractaments amb agents inductors de dany oxidatiu i les seves possibles funcions en la senyalització i reparació del dany i, bàsicament ens centrarem en la ruta FA i en l'antigen de proliferació nuclear PCNA.

## **1.9. Ruta molecular de l'Anèmia de Fanconi**

### **1.9.1. Generalitats**

FA és una malaltia genètica rara amb una freqüència de mutacions en portadors d'entre 1/65 a 1/300 [100]. Va ser descrita per primera vegada el 1927 pel metge suís Guido Fanconi i es caracteritza per una disfunció al moll de l'os, per malformacions congènites i per l'alta incidència de càncer, principalment de tipus hematopoètics i carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll [101]. FA és genèticament heterogènia i fins l'actualitat s'han descrit 15 grups de complementació diferents després dels exhaustius estudis de complementació genètics [102]. En els propers anys és possible que aquest nombre es vegi incrementat ja que resten pacients FA sense cap grup de complementació assignat i on s'han descartat tots els 15 grups coneguts fins ara. Totes les proteïnes codificades pels 15 gens Fanconi actuen en una ruta molecular conjunta denominada ruta molecular de FA/BRCA per la seva interrelació amb les proteïnes causants del càncer de mama (BRCA1 i BRCA2). El diagnòstic de FA comporta l'anàlisi citogenètic de limfòcits o fibroblasts del pacient tractats amb agents inductor d'enllaços ICLs al DNA tals com la mitomicina C (MMC) o el diepoxibutà (DEB) en el conegut com a test del DEB. Les cèl·lules de pacients diagnosticats positivament per FA mostren un increment en els nivells d'aberracions cromosòmiques, incloent trencaments cromatídics i la formació de figures radials [103, 104]. Un exemple d'una preparació de metafases procedents de cèl·lules de limfòcits d'un pacient FA tractades amb DEB es mostra a la fig. 9. A més, les cèl·lules FA s'acumulen en fase G2/M del cicle cel·lular en resposta a tractaments amb agents inductors de ICLs suggerint una funció cel·lular de resposta al dany de les proteïnes FA [105]. La sensibilitat extrema dels pacients FA a ICLs prohibeix rotundament el tractament dels càncers en pacients mitjançant qualsevol fàrmac quimioterapèutic inductor de ICLs tals com la MMC. Les proteïnes FA es consideren doncs responsables de la resposta cel·lular a estrès replicatiu.



**Figura 9. Imatge representativa d'una metafase de limfòcits d'un pacient d'anèmia de Fanconi.** Després de tractament amb dosis baixes de diepoxibutà (DEB), es produeixen aberracions cromosòmiques tals com trencaments cromatídics, cromosomes radials, dicèntrics i d'altres figures. Aquests defectes observats en metafases de limfòcits de pacients FA es produeixen per mancances en la reparació del dany induït i s'utilitzen de manera rutinària en el diagnòstic de pacients FA.

## 1.9.2. Ruta molecular de FA

Fins ara, s'han descrit mutacions en 15 gens FANC en pacients Fanconi o semblants a Fanconi: FANCA,-B,-C,-D1,-D2,-E,-F,-G,-I,-J,-L,-M,-N,-O i -P [106] tot i que la rellevància de FANCM en l'etiologia de FA resta en controvèrsia [107]. FA és una malaltia autosòmica per tots els gens excepte per FANCB que es troba localitzat al cromosoma X [108].

### 1.9.2.1. Grup I: Complex central de FA

Les proteïnes FA es classifiquen dins de tres grans grups: el primer grup inclou FANCA,-B,-C,-E,-F,-G,-L i -M que formen el complex central de FA juntament amb les proteïnes associades a FA: FAAP100 i FAAP24 [109]. La nomenclatura d'aquestes proteïnes és deguda a que no s'han identificat pacients FA amb mutacions en cap d'aquestes proteïnes. Totes 10 actuen com a lligasa d'ubiquitina E3 per monoubiquitinar les proteïnes FA del segon complex. Aquest segon complex és un heterodímer, el denominat dímer ID, format per les proteïnes FANCD2 i FANCI. Mutacions en qualsevol de les proteïnes del complex central de FA impedeixen la monoubiquitinació del dímer ID encara que és pròpiament FANCL la que té l'activitat catalítica E3 lligasa del complex [110]. El fet que no tots els pacients FA del grup central tinguin el mateix fenotip clínic dóna suport a la hipòtesi de múltiples funcions de les proteïnes del complex a part de la de monoubiquitinar FANCD2/FANCI [111].

S'ha observat que les proteïnes d'aquest primer grup FANCM i FAAP24 tenen dominis d'unió al DNA i formen un complex entre elles sent les úniques proteïnes del complex amb capacitat d'unió a DNA [112]. FANCM té dominis helicasa i nucleasa tot i que la funcionalitat d'ambdós dominis no ha estat mai verificada; de fet, no s'ha detectat activitat endonucleasa per a cap de les proteïnes del complex central. FANCM es considera paràleg de XPF perquè són les dues úniques proteïnes conegudes en humans amb dominis en tàndem helicasa – nucleasa en la seva estructura i se suposa que deriven d'un ancestre comú en funcions de reparació del DNA, la proteïna Hef d'arqueobacteris. La proteïna Hef d'arqueobacteris funciona en forma homodimèrica per resoldre les forquilles de replicació bloquejades [113]. Anàlisis detallats de la seqüència de FANCM han conclòs que aquesta és incapaç de desenvolupar activitat endonucleasa des d'eucariotes inferiors a mamífers de manera que FANCM no seria la endonucleasa responsable de resoldre les forquilles de replicació bloquejades i hauria adquirit noves funcions. L'activitat helicasa de FANCM no s'ha pogut comprovar mai *in vitro* tot i que conserva activitat translocasa de DNA de manera que és capaç de translocar el complex central al DNA de manera dependent a ATP facilitant els següents passos de la reparació juntament amb FAAP24 [114]. D'aquesta manera, es suggereix una funció de control del processament i estabilització de la forquilla de replicació bloquejada [115] per a FANCM. FANCM es fosforila per la cinasa 3 relacionada amb atàxia telangiectàsica (ATR) i contribueix a l'activació de tota la ruta FA/BRCA [116].

Algunes de les proteïnes del complex central de FA són hiperfosforilades en resposta a dany al DNA a través de les cinases de control del dany en fase replicativa del DNA ATR i la seva cinasa 1 de punt de control del cicle cel·lular Chk1. En destaquen FANCA,-M,-E i -G [117]. Mitjançant aquestes fosforilacions, ATR controla l'activitat del complex en resposta a dany al DNA; per exemple, la fosforilació en certs residus de FANCG promouen la formació d'un nou subcomplex nuclear format per FANCD1/BRCA2-FANCD2-FANCG-XRCC3. Així, la fosforilació a FANCG inhibeix la interacció de FANCG amb la resta de proteïnes del complex central i promou un nou paper de la proteïna en HR [118].

### **1.9.2.2. Grup II: el complex ID**

Les proteïnes FANCD2 i FANCI són proteïnes paràlogues i coexisteixen en varies espècies, tret que les diferencia de la resta de proteïnes FA pel fet de tenir



homòlegs en espècies que no són vertebrades [119]. Actuen com a heterodímer i la seva funció és interdependent, tant en l'estabilitat com la capacitat de ser ubiquitinades. La monoubiquitinació de les dues proteïnes és clau en l'activació de la ruta FA/BRCA i permet connectar les proteïnes del grup primer amb les del tercer grup [93]. Com s'ha comentat anteriorment, el complex ID és substrat de la lligasa E3 FANCL que juntament amb la E2 UBE2T el monoubiquitina. La monoubiquitinació es veu accentuada i és un mecanisme de resposta a cèl·lules tractades amb agents inductors de ICLs al DNA o en cèl·lules que pateixen estrès replicatiu. De fet, s'observen nivells basals de monoubiquitinació de FANCD2 durant la proliferació de cèl·lules. La monoubiquitinació de FANCD2 al residu K561 és clau per la seva localització a la cromatina [111]. La importància d'aquesta localització a cromatina és vital per a la reparació dels ICLs ja que la proteïna FANCD2 mutant en el residu K561 és incapaç de corregir la hipersensibilitat d'una línia cel·lular deficient en FANCD2 a agents inductors de ICLs mentre que la proteïna intacte sí que ho és [120]. Així doncs, la ubiquitinació és un mecanisme per dirigir eficientment el complex ID a cromatina i als foci nuclears on té lloc la reparació del DNA. Aquesta localització no només depèn del grup central de proteïnes de FA sinó que també hi intervenen altres proteïnes relacionades amb la ruta com BRCA1 [121], ATR, responsable de la fosforilació del complex ID i activada com a resposta a forquilles de replicació bloquejades [122], i la forma fosforilada de la histona H2AX,  $\gamma$ H2AX [123]. La fosforilació de la histona H2AX és un mecanisme clau per a la senyalització del dany al DNA, principalment de DSBs i ICLs, i el subseqüent reclutament de proteïnes de reparació [124]. Línies cel·lulars deficientes en  $\gamma$ H2AX són hipersensibles a MMC mostrant-se incapaces de reclutar el complex ID a la cromatina tot i ser capaces de monoubiquitinar FANCD2. Aquest fet demostra la importància de la fosforilació de la histona H2AX per la correcta localització del complex ID en foci i per a dirigir la maquinària de reparació al lloc del dany [123].

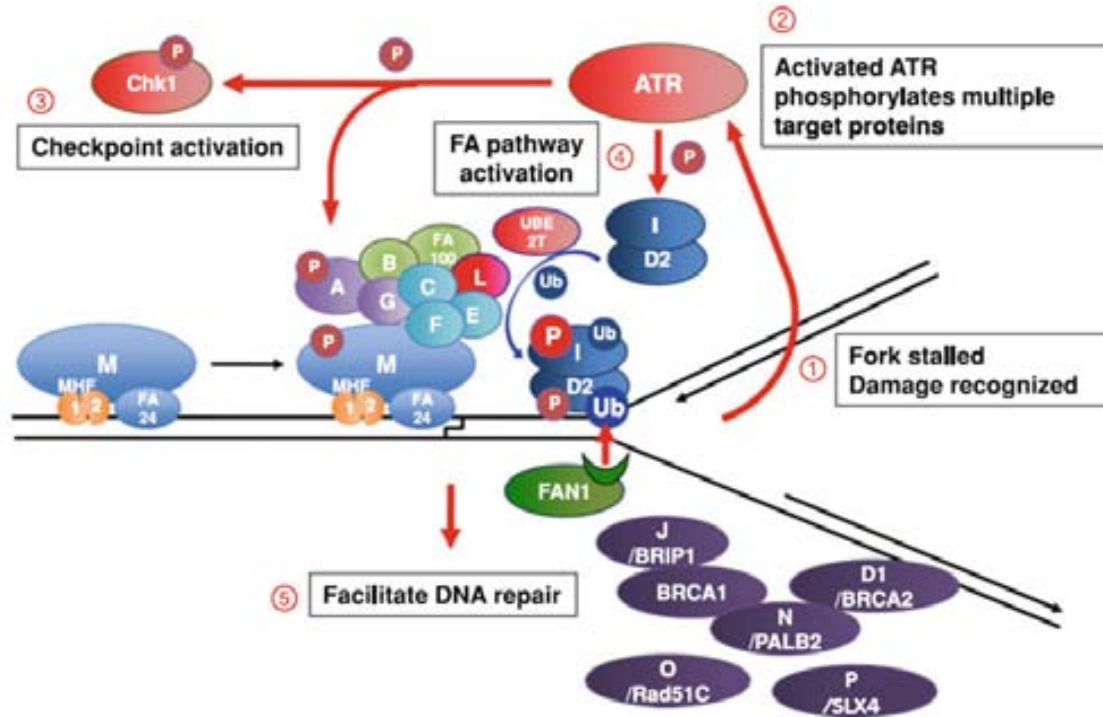
El fenotip clínic de pacients FA amb mutacions a FANCD2 és més sever que el de pacients FA amb mutacions a gens del complex central confirmant la hipòtesi que postula que deficiències en proteïnes del final de la ruta són més severes que no pas del principi. Aquesta observació suggereix funcions crítiques per a FANCD2 independents de la ruta [125]. A més, les mutacions de pacients FANCD2 són hipomòrfiques de manera que es mantenen nivells basals de proteïna amb capacitat de ser monoubiquitinada [126]. El fet que no existeixin pacients FA totalment deficientes per FANCD2 indica la importància de la proteïna durant el desenvolupament i es demostra

que la inactivació completa de FANCD2 és letal. Per contra, els pacients del grup central de FA són més freqüents i a vegades presenten mutacions de pèrdua d'expressió suggerint prescindibilitat durant el desenvolupament. El cas més conegut és el de pacients del grup de complementació A amb una àmplia gamma de mutacions a la proteïna FANCA, el grup de FA més freqüent a nivell mundial [127]. Totes aquestes observacions ens porten doncs a concloure noves funcions per a FANCD2 independents de la seva monoubiquitinació. En destacarem la seva capacitat per contribuir en establir el punt de control en fase replicativa del cicle cel·lular després de dany al DNA. Els punts de control de diverses fases del cicle cel·lular són activables en resposta a dany i donen temps a la cèl·lula a reparar el dany al DNA. En el cas del punt de control en que intervé FANCD2 també ajuda a prevenir el col·lapse de les forquilles de replicació i evita lesions més greus al DNA com ara DSBs i la conseqüent inestabilitat genòmica que comporten. El punt de control en fase S del cicle cel·lular s'estableix de la següent manera en resposta a dany induït per IR: la proteïna mutada en atàxia telangiectàsica (ATM), una de les cinases de fosforilació més importants en resposta a dany al DNA, fosforila FANCD2 al residu serina 222 (S222). Juntament amb la fosforilació d'altres substrats, ATM coordina l'establiment del punt de control de fase S en resposta a IR [128]. En aquesta tesi doctoral, investigarem si aquesta fosforilació de FANCD2 és important per establir el punt de control de dany després de tractar les cèl·lules amb agents inductors de dany oxidatiu. Les dades obtingudes es discutiran àmpliament en l'apartat de discussió i resultats d'aquest treball.

Així doncs, el complex ID desenvolupa com a mínim dues funcions controlades per les cinases de la família de les semblants a fosfatidilinositol 3 cinasa de resposta al dany ATR i ATM. La monoubiquitinació i conseqüent reparació depèn de la senyalització per ATR i el complex central de FA mentre que l'establiment del punt de control de fase S depèn de la senyalització per ATM. De manera semblant, FANCI és fosforilada en múltiples llocs per ATR de manera que aquesta controla l'activitat de monoubiquitinació del complex ID [129] mentre que fosforilacions per ATM relacionades amb el control del cicle cel·lular no han estat descrites fins ara per a FANCI.

### 1.9.2.3. Grup III: proteïnes FA relacionades amb càncer

Contràriament als altres dos grups de proteïnes, deficiències en proteïnes d'aquest tercer grup no impedeixen la monoubiquitinació del complex ID. Per tant, la funció d'aquestes proteïnes és posterior al propi complex o fins i tot independent. Aquest grup inclou la resta de proteïnes FA descrites fins ara: FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1, FANCO/Rad51C i FANCP/SLX4. La mutació en els dos al·lels o homozigosi d'aquestes proteïnes desencadena un fenotip de FA o de fenotip semblant a FA mentre que la mutació d'un dels dos al·lels o en heterozigosi predisposa a patir càncer familiar de mama i ovari suggerint una ruta comuna d'aquests gens supressors de tumors en la reparació del DNA. FANCP/SLX4 és l'excepció i és l'única proteïna del grup per al qual no han estat descrita aquesta associació a càncer familiar de mama i ovari [130]. Totes les proteïnes del tercer grup desenvolupen funcions en el mecanisme de reparació per HR; FANCD1/BRCA2, la primera identificada d'aquest tercer grup [131], i FANCO/Rad51C [132] són imprescindibles per a la localització al lloc del dany de Rad51, proteïna recombinasa essencial per realitzar correctament la reparació per HR. FANCN/PALB2 interacciona amb BRCA2 i en regula la seva localització a la cromatina [133]. FANCI/BRIP1 va ser identificada com a helicasa interactora de BRCA1, un altre dels gens de susceptibilitat a càncer de mama familiar involucrat en la reparació per HR [134]. FANCP/SLX4, identificat recentment com a nou gen FA [135] és responsable de resoldre les unions de Holliday produïdes durant el procés de HR [136], a més d'interaccionar amb FANCD2 monoubiquitinat ajudant a la resolució de les estructures generades per reparar ICLs [137]. Així doncs, FANCP/SLX4 és reclutat per FANCD2 als llocs dels ICLs [137] on actua com a proteïna plataforma per a l'acoblament de les nucleases XPF/ERCC1 i Mus81/Eme1 en la resolució dels ICLs [138] (fig.11). Tots aquests resultats indicarien que aquest tercer grup podria funcionar com una xarxa interconnectada amb les proteïnes de reparació per HR de manera parcial o totalment independent a la resta de gens FA del grup central i del complex ID [139]. Es pot observar una representació esquemàtica de l'activació de la ruta FA amb els tres grups de proteïnes involucrats a la fig. 10.

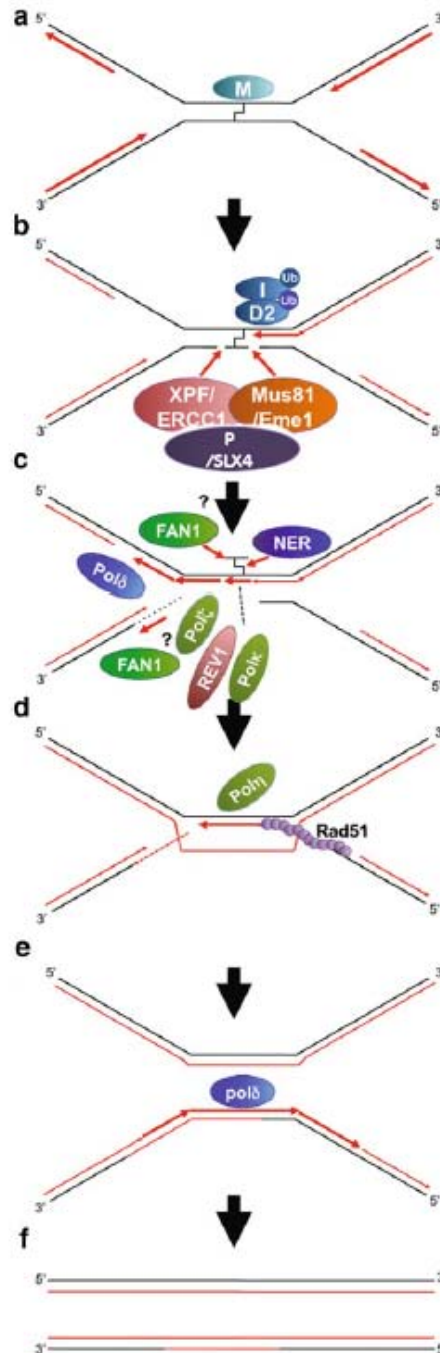


**Figura 10. Visió esquemàtica de l'activació de la ruta FA/BRCA.** En resposta a forquilles de replicació bloquejades en condicions d'estrès replicatiu (1), ATR s'activa i fosforila varies proteïnes diana (2), entre elles Chk1 i FANCI. Llavors es desencadena l'activació del punt de control de cycle cel·lular (3) i la monoubiquitinació del complex FANCD2/FANCI. La monoubiquitinació del complex ID per part de les proteïnes del complex central activades per fosforilació permet que el complex ID es dirigeixi a cromatina (4) per facilitar la reparació del dany (5) i reclutar les proteïnes del tercer grup. Imatge modificada de [139].

### 1.9.3. Reparació dels ICLs

El mecanisme de resolució dels ICLs és complicat ja que hi intervenen varies rutes de reparació que probablement actuen de manera coordinada en diferents passos. Aquestes rutes de reparació són la FA, la HR, la TLS i la NER. Mentre que el sistema de HR s'encarrega de reparar DSBs utilitzant la còpia de la cromàtide germana com a model i és lliure d'error, la TLS, de la qual en parlarem en més profunditat al capítol posterior, és un mecanisme centrat en la tolerància a diferents tipus d'adductes al DNA de manera que permet la replicació sense reparar pròpiament el dany. El mecanisme a través del qual les proteïnes del grup I i II de FA contribueixen en HR i TLS és poc conegut ja que les proteïnes d'aquests grups no són proteïnes necessàries per cap dels dos sistemes i es creu que tindrien funcions diferents en la reparació dels ICLs [139]. Recentment s'ha proposat el model de col·lisió de les dues forquilles esquematitzat a la fig.11 per explicar la reparació dels ICLs: dues forquilles de replicació s'acostarien des de direccions oposades per col·lisionar amb l'ICL [140]. Llavors, les nucleases

Mus81/Eme1 i XPF/ERCC1 incideixen el DNA als dos costats de la lesió generant un DSB. Coordinadament a aquesta incisió, les polimerases de TLS Rev1 o DNA polk sintetitzen el DNA per sobre la lesió [141]. Finalment, el DSB generat és reparat pels mecanismes clàssics d'HR i l'adducte generat és escindit per NER. La funció de FANCD2 en tot aquest procés sembla que és clau ja que la seva deficiència mitjançant competició per anticossos inhibeix les incisions nucleotídiques a ambdós costats de l'ICL i impedeix la síntesi per TLS de la lesió [142]. Així doncs, FANCD2 estaria reclutant endonucleases i exonucleases específiques per al processament dels ICLs. Aquesta hipòtesi sembla confirmada amb la identificació d'una nova proteïna nucleasa associada a FA, la proteïna FAN1 amb activitat exonucleasa 5' a 3' que interactua amb FANCD2 mitjançant dominis d'unió a ubiquitina UBZ per localitzar als foci de reparació [143, 144]. La funció exacte de FAN1 es poc coneguda tot i que sembla que podria estar involucrada en la digestió dels fragments d'oligonucleòtids romanents de l'escissió dels ICLs. Els mutants DT40 deficients en FAN1 presenten sensibilitat a MMC fet que confirma la importància de FAN1 per a la correcta reparació dels ICLs. Sorprenentment, el doble mutant FAN1 i FANCC o FANCI mostra una relació de sinèrgia en quan a la sensibilitat a MMC. Aquest resultat indica que FAN1 funciona en una ruta independent a la ruta FA clàssica o que FAN1 és capaç de reparar altres lesions generades per ICL malgrat la seva interacció amb FANCD2 monoubiquitinat [145]. A més, FANCD2 monoubiquitinat també és capaç de reclutar la proteïna FA descrita recentment, SLX4/FANCP al lloc del dany [137]. Aquesta proteïna és una plataforma de nucleases de manera que facilita la localització de Mus81/Eme1 i XPF/ERCC1 al lloc dels ICLs on potencialment poden realitzar l'escissió de la cadena de DNA [138]. D'aquesta manera, es proposa i s'esquematitza a la fig.11 el mecanisme de reparació dels ICLs en que intervenen la ruta FA, HR, NER i TLS.



**Figura 11. Model de la col·lisió de dues forquilles de replicació en la reparació dels ICLs.** Dues forquilles de replicació s'aproximen a un ICL procedents de dos sentits oposats. En aquest punt, FANCM podria reconèixer la lesió i carregar el complex central de FA a la cromatina (a). La ruta FA s'activa i es generen dos *nicks* flanquejant l'ICL per l'acció de les endonucleases específiques XPF-ERCC1 i Mus81-Eme1. Es postula que XPF-ERCC1 i Mus81-Eme1 són reclutades al lloc del dany a través de la proteïna plataforma SLX4/FANCP. Es genera un DSB (b). La polimerasa replicativa DNA pol $\delta$  és intercanviada per polimerases de TLS, possiblement Rev1, polk o pol $\zeta$  de manera que la forquilla de replicació bloquejada és capaç de sobrepassar la lesió (c). Un cop la lesió és sobrepassada, es torna a carregar la DNA pol $\delta$ . La nucleasa FAN1 podria degradar els nucleòtids romanents lligats al ICL a més de generar uns extrems de DSB compatibles per HR. El mecanisme de reparació NER és l'encarregat d'escindir el ICL i eliminar-lo després del pas de reparació per TLS (c). RAD51 promou la recombinació per reparar el DSB generat (d). La DNA pol $\delta$  finalitza la reparació del DSB generat omplint per síntesi el pedaç de DNA (e). Finalment, l'ICL és reparat i es completa la replicació del DNA (f) [139].

#### **1.9.4. La importància de la ruta FA en l'elecció de la reparació de DSBs**

Estudis recents indiquen que la inestabilitat genòmica, mort cel·lular i l'alta freqüència de cromosomes radials observada en cèl·lules FA sota tractament amb inductors de ICLs es pot explicar per una deficiència en l'elecció del sistema de reparació adequat dels DSBs [146]. Els DSBs són lesions molt greus al DNA i són reparades bàsicament per dos sistemes de reparació: la HR esmentada prèviament que utilitza una cromàtide germana com a còpia fidedigna de la informació danyada i el sistema de reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ). Aquest sistema de reparació té la particularitat que no necessita cap còpia per reparar els DSBs, de manera que és tendent a error però està disponible al llarg de tot el cicle cel·lular. Els estudis que expliquen el fenotip FA per deficiències en la reparació dels DSBs proposen que les proteïnes FA, més que promoure la HR, protegirien el DNA de la reparació inapropiada per NHEJ en fase replicativa del cicle cel·lular. La hipòtesi es veu corroborada en l'observació que línies cel·lulars deficientes en FA milloren el seu fenotip de sensibilitat a MMC amb la inhibició de gens claus de la ruta NHEJ [147]. Aquestes observacions poden portar a desenvolupar nous tractaments per a millorar la simptomologia clínica de pacients FA malgrat que és necessària una major comprensió del mecanisme d'elecció per part de la ruta FA en la reparació dels DSBs.

Actualment doncs, es comença a conèixer el funcionament de la ruta FA en la reparació dels ICLs i com es regula la resposta a forquilles de replicació bloquejades mitjançant la intervenció de nombroses proteïnes susceptibles a ser modificades post-traduccionament. Malgrat tot, resten moltes preguntes per resoldre en quan al funcionament de la reparació i la ruta en general. La identificació de noves proteïnes causants de FA en pacients en els quals s'han descartat tots els 15 grups de complementació descrits fins ara de ben segur que contribuiran a aprofundir el coneixement de la ruta i a clarificar-ne millor les seves funcions.

#### **1.9.5. L'anèmia de Fanconi i dany oxidatiu**

Està ben establert que les cèl·lules FA són sensibles a agents inductors de ICLs al DNA tals com la MMC o el cisplatí, i en menor mesura a IR, ara bé, l'explicació de com aquesta observació es trasllada al fenotip clínic observat en pacients ja és un tema

més discutit. El fenotip de pacients FA està caracteritzat per anomalies congènites, deficiències hematològiques i predisposició a certs tipus de càncer tals com leucèmies, carcinomes escamosos de cap i coll, del tracte digestiu i urogenital, de pulmó i de cervell [148]. El fenotip observat és molt divers i estranyament podria ser derivat per l'exposició exògena a un agent inductor de ICLs a diferència d'altres malalties humanes tals com la xerodèrmia pigmentosa (XP), amb un fenotip clar de incidència de càncer de pell per exposició a llum solar [149]. Probablement doncs, les proteïnes de FA desenvolupen funcions en la resposta a fonts de dany o estrès replicatiu intrínsec a la pròpia cèl·lula de manera que és clau entendre la resposta a l'estrès endogen per comprendre la fisiopatologia de FA [150]. Es proposa l'estrès replicatiu i el dany oxidatiu endogen com a clau per entendre el fenotip dels pacients FA tot i que aquest és un debat llarg i en controvèrsia en el camp de la FA [151]. Recentment, alguns autors han observat que la ruta de reparació de FA és capaç de contrarestar l'efecte carcinogènic i teratogènic induït al DNA per l'acetaldehid. L'acetaldehid és un producte comú de varies rutes metabòliques endògenes que, si no és enzimàticament catalitzat, pot provocar dany al DNA. D'aquesta manera, els autors expliquen les deficiències observades al moll de l'os i la alta incidència de leucèmies en ratolins deficients per FA tractats amb etanol, un dels precursor de l'acetaldehid [152].

Com s'ha comentat en el primer capítol d'aquesta introducció, les ROS produïdes pel propi metabolisme generen una gran varietat de lesions sent les més freqüents les lesions de bases, incloent la 8-oxoG i les bases desaminades, i els trencaments de cadena senzilla reparats principalment pel sistema BER [17]. Les cèl·lules FA són sensibles a altes concentracions d'oxigen [153] i estudis recents demostren que dietes riques en antioxidants són capaces de retardar l'edat d'aparició dels tumors epitelials en models de FA en ratolí [154]. De fet, l'estat redox de la cèl·lula FA està alterat [155] i tant pacients com cèl·lules FA mostren una acumulació anòmala de nivells de 8-oxoG al DNA [156] suggerint un possible defecte en la reparació d'aquest tipus de lesió. A més, la ruta FA s'ha vist involucrada en la regulació de la glicosilasa de DNA NEIL1 en humans [157], responsable del reconeixement de la 8-oxoG entre d'altres bases oxidades [158]. La sobrepressió de NEIL1 és capaç de recuperar parcialment el fenotip en cèl·lules deficients per FA.

La completa funcionalitat de la ruta BER en el processament de les bases oxidades incloent el reconeixement, l'escissió, el farciment del pedaç i la lligació final no ha estat comprovada fins ara en cèl·lules deficients en FANCD2. En el present



treball, fruit d'aquesta tesi doctoral intentarem esbrinar la funcionalitat de la ruta BER en FA i esbrinar si l'acumulació de 8-oxoG al DNA dels pacients FA i a les seves cèl·lules és degut a la superproducció de ROS o a defectes en la reparació de la lesió.

Altres línies de recerca han connectat l'estrès oxidatiu amb FA. Convé recordar que la característica clínica i més greu dels pacients amb FA és l'hematològica, sent la disfunció al moll de l'os la causa principal de mort. A més, els pacients tenen una alta incidència de leucèmies [159]. L'excessiva apoptosi als progenitors de cèl·lules mare hematopoètiques en FA és la causant de la disfunció al moll de l'os i podria estar vinculada amb una hipersensibilitat a l'estrès oxidatiu d'aquests progenitors [160]. La hipòtesi sembla confirmada amb la incapacitat de repoblació de cèl·lules hematopoètiques del moll de l'os en ratolins FANCC deficients [161] i la recuperació amb l'expressió ectòpica de FANCC [162]. Aquesta característica de repoblament, explicaria el perquè els pacients de FA mosaics que han patit una reversió espontània de la mutació no presenten el fenotip hematològic. La característica principal dels pacients de FA mosaics és que recuperen de manera espontània l'expressió de la proteïna FANCC mutada als progenitors hematopoètics. Per contra, si que són susceptibles a altres tipus de càncer associats a FA ja que la resta de línies cel·lulars presenten la mutació al gen FA corresponent. Aquesta reversió del fenotip hematopoètic pot obrir nous camps per teràpies correctores del fenotip en sang [163].

La citoquina proinflamatòria del TNF $\alpha$  és considerada un factor patològic clau en l'anòmala hematopoesi de FA [164]. La sobreproducció de TNF $\alpha$  de manera crònica observada en ratolins FANCC deficients podria contribuir al desenvolupament de la disfunció al moll de l'os i de l'aparició de leucèmies per increment de ROS susceptible a atacar el DNA [165]. D'aquesta manera, l'excessiva producció de TNF $\alpha$  provocaria l'apoptosi al moll de l'os mentre que les cèl·lules que adquirissin una resistència a TNF $\alpha$  tindrien un avantatge proliferatiu i serien susceptibles de generar leucèmies [160]. Malgrat tot, es desconeix el mecanisme a través del qual les proteïnes FA regularien la producció de ROS via la citoquina proinflamatòria del TNF $\alpha$ . Un estudi molt recent postula que la proteïna FANCD2 monoubiquitinada seria capaç de modular l'expressió transcripcional del TNF $\alpha$  de manera que cèl·lules deficients per a la monoubiquitinació de FANCD2 es trobarien en un estat pro-inflamatori constitutiu [166]. Aquest estudi i d'altres que indiquen que la inhibició del TNF $\alpha$  en cultius cel·lulars de medul·la òssia permet la recuperació de la línia hematopoètica en FA [164]

poden obrir potencials teràpies per a pacients FA modulant l'expressió artificialment de TNF $\alpha$ .

Com s'ha resumit en aquest apartat, nombrosos estudis s'encaminen a explorar la relació entre l'estrès oxidatiu i FA des de fa aproximadament uns 30 anys per donar explicació al fenotip clínic observat. Un bon recull de les dades acumulades fins avui es pot trobar a la següent revisió recent del tema [167]. De ben segur que, en els propers anys, noves investigacions encaminades a elucidar la relació entre FA i l'estrès oxidatiu emergiran amb l'objectiu de promoure accions adequades per la prevenció de la progressió del fenotip clínic de FA.

### **1.10. Atàxia telangiectàsica i dany oxidatiu**

La mutació o inactivació del gen de ATM, la proteïna del qual dona lloc a la principal cinasa multifuncional encarregada d'orquestrar la resposta cel·lular a DSBs, provoca el trastorn genètic d'atàxia - telangiectàsica (A-T). El fenotip clínic de A-T es caracteritza per la degeneració neuronal, la immunodeficiència, la inestabilitat genòmica, l'envelliment prematur, la predisposició a càncer i la hipersensibilitat a IR [168]. La cinasa ATM és una cinasa Serina/Treonina d'eucariotes de control del cicle cel·lular i de resposta a dany al DNA capaç de fosforilar nombrosos substrats. ATM s'activa en resposta a DSBs al DNA i desencadena una activació cel·lular en xarxa de manera que coordina varies vies per resoldre correctament el dany generat [169].

Per explicar el fenotip clínic dels pacients A-T es suggereix, com a mínim parcialment, l'efecte del dany oxidatiu [170]. Les cèl·lules deficientes en ATM són sensibles als efectes tòxics de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'òxid nítric i a tractaments amb superòxids, confirmant la hipòtesi. A més, els ratolins deficientes per ATM presenten nivells elevats de marcadors d'estrès oxidatiu [171]. Recentment s'ha provat que la proteïna cinasa Chk2 fosforilada i activada per ATM és capaç de fosforilar XRCC1 connectant directament el sistema de reparació BER amb ATM [172]. La fosforilació de FANCD2 per ATM és important per al correcte establiment del punt de control de fase S del cicle cel·lular en resposta a IR [128]. Com que A-T i FA presenten fenotips comuns de sensibilitat al dany oxidatiu s'estudia, en aquesta tesi doctoral, la relació de les dues proteïnes i l'estrès oxidatiu centrant-nos principalment al ROS endogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 1.11. Antigen de proliferació nuclear (PCNA)

PCNA és un factor auxiliar de les polimerases i forma la denominada plataforma de lliscament del DNA eucariòtic. La seva expressió cíclica durant les diferents fases del cicle cel·lular va conduir a la seva identificació com a ciclina reguladora de la proliferació cel·lular [173]. L'estructura de PCNA està molt conservada evolutivament i està composta per un trímer de monòmers associats en forma d'anella composta tancada de dos costats [174]. La part interior de l'anell és ric en residus arginina i lisina carregats positivament de manera que permet una conformació eficaç d'embolcallament del dúplex de DNA, carregat negativament. PCNA desenvolupa funcions essencials durant la replicació del DNA i en els mecanismes de DDT per circumval·lar la lesió en fase replicativa [175].

### 1.11.1. La replicació del DNA i PCNA

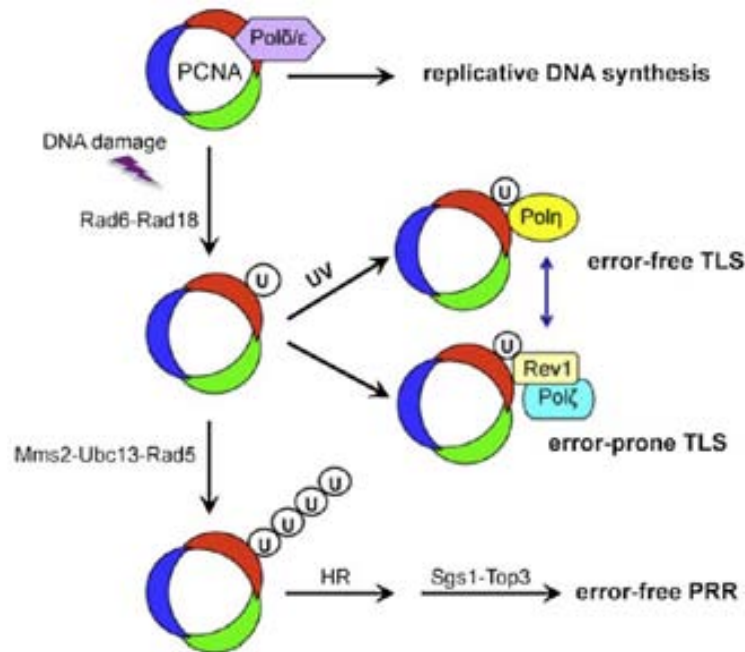
PCNA és un factor de processivitat de les polimerases de DNA i funciona com una plataforma de càrrega per a la maquinària de replicació mitjançant l'associació de diversos factors necessaris per la replicació. Les proteïnes que interaccionen amb PCNA tenen uns dominis característics molt conservats evolutivament entre els que destaca el pèptid d'interacció a PCNA o caixa PIP [176]. Durant la replicació, el RFC s'uneix al punt d'unió entre l'encebador d'RNA i al DNA reclutant i carregant PCNA [177]. Un cop PCNA és carregada al DNA, es desplaça la polimerasa alpha (DNA pol $\alpha$ ) que ha sintetitzat l'encebador i es carrega la DNA pol $\epsilon$  que s'encarrega de la síntesi i elongació de la cadena avançada. La cadena endarrerida és sintetitzada i elongada mitjançant la DNA pol $\delta$  un cop els fragments d'RNA encebadors han estat escindits per la endonucleasa FEN-1. Finalment, els fragment d'Okazaki de nova síntesi són lligats mitjançant la DNA ligI. PCNA carrega i estimula l'activitat enzimàtica de DNA pol $\delta$  durant tot aquest procés [178].

### 1.11.2. Tolerància al dany: Les modificacions post-traduccionals de PCNA

PCNA no només desenvolupa un paper fonamental en processos de replicació del DNA en fase S del cicle cel·lular sinó que també està involucrat en la sensibilització del dany i la reparació. Algunes lesions al DNA que afecten la cèl·lula en fase replicativa, ja sigui perquè han escapat la reparació prèvia a fase S pels sistemes esmentats anteriorment BER i NER o perquè la lesió s'ha produït directament durant la replicació, són capaces d'interferir el procés replicatiu normal descrit al punt anterior. Les polimerases replicatives són doncs incapaces de replicar substrats de DNA modificats o danyats. La manca de correcció de les lesions abans de l'entrada en fase S pot provocar inestabilitat genòmica i mort cel·lular i és per aquest motiu que les cèl·lules han desenvolupat mecanismes sofisticats i complexes de tolerància al dany. D'aquesta manera les lesions són sobrepassades i s'assegura la supervivència cel·lular, permetent la síntesi de DNA en presència de lesions bloquejants de la progressió de la maquinària de replicació. Aquestes lesions bloquegen especialment l'activitat de síntesi de les polimerases replicatives DNA pol $\delta/\epsilon$  i, si no són correctament circumval·lades, poden generar trencaments més greus al DNA. Aquest sistema de circumval·lació de la lesió es divideix en tres rutes: síntesi per TLS de manera tendent a error, TLS lliure d'errors i reparació post-replicativa lliure d'error o de DDT [179]. Les tres rutes requereixen de la senyalització de PCNA i que aquesta sigui modificada post-traduccionament i de manera covalent de diferents maneres: per ubiquitinació, ja sigui amb la incorporació d'un sol residu ubiquitina (monoubiquitinació) o varis (poliubiquitinació), o pel petit modificador semblant a ubiquitina (SUMO). Segons la modificació adquirida, es determina quina de les rutes de tolerància serà emprada per fer front a la lesió [180].

La ubiquitinació es produeix, com s'ha comentat amb anterioritat, per la lligació covalent d'Ub a un residu K. A PCNA, aquesta modificació succeeix al residu K164 que és monoubiquitinat pel complex E2-E3, Rad6-Rad18. El residu K63 de la Ub pot ser posteriorment poliubiquitinat pel complex E2-E3, Mms2-Ubc13-Rad5 com es pot observar a la fig.12. Aquests passos de modificació per mono i poliubiquitinació han estat reconstituïts *in vitro* [181] confirmant el model genètic prèviament proposat [94]. A més, el residu K164 de PCNA pot ser modificat per sumorilació mitjançant un nou complex E2-E3, Ubc9-Siz1 [94]. La sumorilació succeeix durant la fase S del cicle

cel·lular en condicions basals i es postula que la seva funció és antirecombinogènica i de prevenció de la monoubiquitinació evitant el reclutament de les polimerases TLS durant la replicació de DNA no danyat [182].



**Figura 12. Funcions de PCNA en la replicació del DNA i la tolerància al dany.** PCNA està involucrat en la síntesi de DNA genòmic com a plataforma de càrrega de la maquinària de replicació (part superior). Carrega entre altres factors, les polimerases replicatives DNA pol $\delta/\epsilon$ . En resposta a dany al DNA capaç de bloquejar les forquilles de replicació com ara la radiació UV, PCNA es monoubiquitina gràcies al complex E2-E3 Rad6-Rad18. Les polimerases replicatives perden afinitat per PCNA i es carreguen les polimerases de TLS: pol $\eta$  en la síntesi per TLS lliure d'error o Rev1/pol $\zeta$  en la síntesi per TLS tendent a error (part central). El complex de poliubiquitinació Mms2-Ubc13-Rad5 pot posteriorment poliubiquitinar PCNA per a realitzar HR en un mecanisme de reparació post-replicatiu lliure d'error (part inferior) [183].

### 1.11.3. Monoubiquitinació de PCNA

La monoubiquitinació de PCNA es produeix quan la forquilla de replicació és bloquejada per una lesió i es recluten els complexos de monoubiquitinació Rad6-Rad18. En primer lloc, Rad18 s'uneix a ssDNA a través de RPA per posteriorment formar un complex estable amb la E2 multifuncional Rad6 a través d'uns dominis d'unió específics. La funció de Rad6 en resposta a dany al DNA és totalment dependent de la interacció amb la seva lligasa E3, Rad18. Finalment, el complex Rad6-Rad18 és capaç de transferir el residu Ub a PCNA eficientment *in vitro* [184]. Aquest procés de tolerància al dany està conservat i es produeix de la mateixa manera tant en llevats com en cèl·lules de mamífer. La deleció de RAD18 en cèl·lules humanes provoca una manca

total de la monoubiquitinació de PCNA en resposta a dany al DNA [185] mentre que la seva expressió ectòpica n'indueix la monoubiquitinació en absència de dany [186]. La depleció per RNA d'interferència de Rad6 també redueix dramàticament la monoubiquitinació de PCNA en cèl·lules humanes després de dany [184] confirmant la capacitat de transferència del residu Ub a PCNA de manera coordinada per part de les dues proteïnes.

La monoubiquitinació de PCNA en mamífers es produeix en resposta a diferents agents inductors de dany al DNA, com ara la radiació UV, l'agent alquilant metanosulfonat (MMS), la MMC, la HU i l'agent formador d'adductes al DNA benzoapiren dihidrodiol epòxid [187]. La radiació UV n'és el més estudiat i es coneix que tant les lesions de dímers de pirimidina (CPD) com els 6-4 fotoproductes (6-4 PP) indueixen el bloqueig de la forquilla i la conseqüent monoubiquitinació de PCNA. Per contra, els agents que generen DSBs i bloquegen el cicle cel·lular sense provocar el bloqueig de les forquilles de replicació són incapaços d'induir la monoubiquitinació de PCNA. Entre aquests destaquen la bleomicina, la captotecina, el nocodazol i la IR [187]. Totes aquestes observacions són molt consistents amb el model d'activació per monoubiquitinació proposat a través de la interacció de Rad18 amb RPA a les regions de ssDNA [188].

La monoubiquitinació de PCNA també es pot produir espontàniament degut a l'estrès replicatiu o pel dany espontani induït per la pròpia cèl·lula en fase S del cicle cel·lular; de fet es detecten cert nivells basals de monoubiquitinació en cèl·lules no danyades. Es postula que el grau de monoubiquitinació basal depèn de la freqüència de dany espontani provocat pels defectes genètics de cada línia cel·lular [189].

La monoubiquitinació és un procés altament regulat per altres factors globals de resposta al dany al DNA que s'hipotetitza que estabilitzarien la forquilla de replicació tot i que el seu mecanisme d'acció exacte resta per elucidar. La càrrega de l'homotrímer al DNA per RFC és un factor indispensable per a la posterior monoubiquitinació [190]. El control de la monoubiquitinació pels punts de control del cicle cel·lular és també un factor de regulació important sent el més important d'ells la cinasa de control del cicle cel·lular en fase replicativa Chk1 [191]. Resta en controvèrsia l'acció d'ATR en la monoubiquitinació, ja que alguns treballs la consideren prescindible mentre que d'altres necessària [186]. A més, les proteïnes supressores de tumors p53 i p21 també tenen un paper en la regulació de PCNA inhibint-ne la seva monoubiquitinació [192].

La monoubiquitinació és un procés reversible [193]. Les proteases classificades dins el grup de les deubiquitinases funcionen com a reguladores negatives eliminant el residu Ub. La proteasa específica d'ubiquitina USP1 és la responsable de deubiquitar PCNA monoubiquitinat [97]. Els nivells de USP1 estan estretament lligats amb els de PCNA monoubiquitinat de manera que a altes dosis d'UV disminueixen els nivells d'USP1 funcional per escissió de la pròpia proteïna USP1 de manera correlacionada amb l'increment de la monoubiquitinació de PCNA [187]. De fet, la depleció per RNA d'interferència d'USP1 dona lloc a nivells elevats de monoubiquitinació de PCNA després de tractament amb UV així com en absència de dany [189] demostrant la importància d'USP1 en la regulació de PCNA monoubiquitinat. Sorprenentment, la depleció d'USP1 no es veu correlacionada amb l'increment de monoubiquitinació de PCNA en cèl·lules de mamífer després de tractament amb MMS ni MMC [187]. Aquesta observació suggereix que noves deubiquitinases capaces de regular la monoubiquitinació de PCNA en resposta a altres tipus de tractaments podrien realitzar la funció. L'efecte d'USP1 en la deubiquitinació de PCNA poliubiquitinat resta en controvèrsia encara que sembla que la depleció d'USP1 provoca un increment de PCNA poliubiquitinat [189].

#### **1.11.4. Poliubiquitinació de PCNA**

La poliubiquitinació de PCNA en cadena d'ubiquitina lligades pel residu K48 d'Ub provoca que la proteïna sigui degradada al proteasoma per a la renovació de la proteïna cel·lular [85] mentre que la poliubiquitinació pel residu K63 d'Ub provoca que aquesta desenvolupi funcions concretes en processos de reparació del DNA. La poliubiquitinació es produeix gràcies al complex Mms2-Ubc13-Rad5 sent Ubc13 la corresponent E2 i Rad5 la E3 [94]. Per a la correcta poliubiquitinació de PCNA es requereix també del complex de monoubiquitinació Rad6-Rad18 ja que cèl·lules delacionades per Rad6 són incapaces de poliubiquitar PCNA. Per contra, mutants del complex de poliubiquitinació permeten l'activació de PCNA per monoubiquitinació en resposta a dany al DNA. En cèl·lules de mamífer en cultiu es detecta la poliubiquitinació de PCNA en cadenes unides per residus K63 i es postula com un mecanisme molt conservat evolutivament entre la branca eucariòtica. La principal funció de la poliubiquitinació per residus K63 és la d'inhibició de la monoubiquitinació

per prevenir mutacions degut a TLS [194] en la ruta de derivació de la lesió lliure d'error. Tot i que el mecanisme d'acció de la ruta resta per elucidar, s'hipotetitza que la lesió bloquejant de la forquilla seria reparada mitjançant l'intercanvi de cromàtides homòlogues i per HR resolent les unions de Holliday mitjançant la coordinació de la helicasa i E3, Rad5 a més de proteïnes de recombinació com Rad51 [195].

### **1.11.5. Polimerases de translesió**

El mecanisme molecular de DDT permet completar la replicació del DNA sobrepassant lesions bloquejants encara que no es restableix la seqüència correcte lliure de dany. Les polimerases de TLS estant altament especialitzades i són les responsables del procés de DDT. Estant molt conservades evolutivament en eucariotes i procariotes i tenen la capacitat de síntesi sobre llocs danyats al DNA [196]. La majoria de polimerases de TLS pertanyen a la família de polimerases Y, tot i que algunes polimerases de la família A, B, X podrien realitzar TLS en condicions particulars [197]. Les polimerases de TLS de la família Y permeten sintetitzar nucleòtids oposats al lloc de la lesió per la seva capacitat d'acomodar-se a regions de DNA distorsionades; com a contrapartida, tenen una baixa fidelitat de replicació per manca d'activitat correctora exonucleasa 3' a 5' a diferència de les polimerases replicatives [198]. En mamífers es coneixen quatre polimerases Y: la polimerasa eta (DNA pol $\eta$ ), la polimerasa iota (DNA pol $\iota$ ), la polimerasa kappa (DNA pol $\kappa$ ) i la polimerasa Rev1. Totes elles contenen dominis d'unió a proteïnes ubiquitinades (UBM i/o UBZ) que els permeten la interacció amb PCNA monoubiquitinat [199]; a més, DNA pol $\eta$ , DNA pol $\kappa$  i DNA pol $\iota$  contenen també dominis PIP d'interacció a PCNA mentre que Rev1 interacciona amb PCNA a través del seu domini BRCT [200].

Les polimerases de TLS són específiques segons el substrat o lesió a sintetitzar; per exemple, DNA pol $\eta$  és l'encarregada de TLS lliure d'error per sobre dels CPDs induïts per UV [201] mentre que DNA pol $\iota$  és capaç d'inserir deoxinucleòtids oposats als 6-4 PP i llocs AP [202]. Així doncs, les rutes de DDT poden ser mutagèniques o no depenent del tipus d'ubiquitinació de PCNA així com de la polimerasa utilitzada. El model establert actualment indicaria doncs que la modificació de PCNA per ubiquitinació facilitaria el canvi de les polimerases replicatives per a les polimerases de



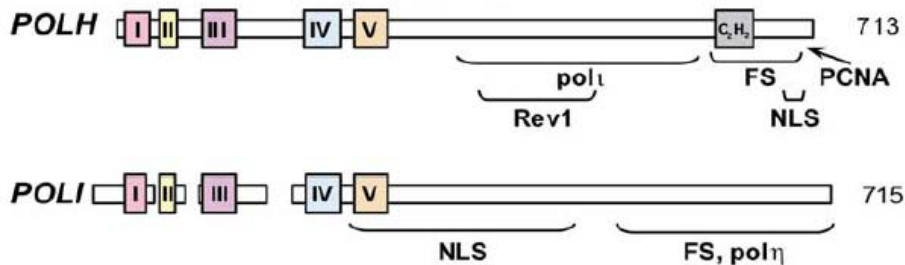
TLS en resposta a dany al DNA bloquejant de la forquilla. La monoubiquitinació provocaria una resposta TLS lliure o tendent a error segons la polimerasa reclutada, mentre que la poliubiquitinació mitjançada per Rad5 determinaria una via de DDT lliure d'error [183]. Un model esquematitzat de les modificacions post-traduccionals de PCNA es mostra a la fig12.

#### 1.11.5.1. Polη

Entre totes les polimerases de TLS, la DNA polη és la més estudiada de totes ja que la seva deficiència està lligada a la malaltia genètica rara de variant de xeroderma pigmentosa (XP-V). XP és un síndrome de predisposició a càncer caracteritzat per una alta incidència de càncers de pell i sensibilitat a radiació solar [203]. El fenotip clínic de XP-V és molt semblant al dels altres pacients de XP caracteritzats per mutacions en gens del sistema de reparació de NER. El fet que el fenotip clínic dels pacients XP-V sigui tant semblant al dels XP postula una funció de protecció de la DNA polη al dany al DNA induït per la radiació solar. De fet, es coneix, com s'ha comentat amb anterioritat, que la DNA polη és una polimerasa no mutagènica tot i pertànyer a la família de TLS. La DNA polη és la responsable de la correcta síntesi de nucleòtids sobre els CPDs induïts per radiació UV i la seva deficiència provoca l'alta incidència de càncer de pell observada als pacients XP-V [204]. DNA polη, a més de la seva capacitat de síntesi no mutagènica en CPDs, també és capaç de sintetitzar *in vitro* altres bases modificades al DNA tals com la 8-oxoG incorporant preferentment dCTP oposat a la lesió de manera que no s'indueix mutació [205] i altres adductes de la guanina mentre és incapaç de sintetitzar substrats que presenten llocs AP [206]. Un estudi recent discrepa sobre la capacitat de síntesi sobre lesions AP i considera que la DNA polη és capaç d'incorporar el nucleòtid correcte amb relativa eficàcia i fidelitat, com a mínim de manera *in vitro* [207]. A diferència d'altres polimerases de TLS com ara Rev1 identificada pel seu potencial mutagènic [208], l'acció de la DNA polη és profundament antimutagènica; la seva capacitat de síntesi de DNA no danyat és pràcticament inexistent *in vitro* [209] i la seva inhibició per RNA d'interferència incrementa la freqüència de mutagènesi espontània [210] mentre que la sobreexpressió no té efecte en

humans [211]. Aquest fet suggereix una forta regulació de la DNA pol $\eta$  per l'accés a substrats de DNA no danyats.

La regulació de l'activitat catalítica de la DNA pol $\eta$  ve determinada per les interaccions a d'altres proteïnes, sent la més important la seva interacció amb PCNA monoubiquitinat a través dels dominis PIP i d'unió a ubiquitina en dits de zinc (UBZ) en el procés clàssic de TLS descrit anteriorment [212]. Després de tractament amb radiació UV, la DNA pol $\eta$  forma foci i colocalitza amb PCNA a les forquilles de replicació bloquejades per realitzar TLS [213] on també colocalitza amb Rad18 [184] per completar la síntesi per sobrepassar la lesió.



**Figura 13. Representació de l'estructura i regions conservades de les polimerases de TLS DNA pol $\eta$  (POLH) i pol $\iota$  (POLI) en humans.** Els dominis conservats entre les dues proteïnes estan pintats i es representen en caixes de colors de I a V. La longitud de les proteïnes en aminoàcids s'indica a la dreta del diagrama de manera numèrica. La DNA pol $\eta$  té un domini conservat en dit de zinc (UBZ) indicat per la caixa gris. NLS indica els dominis de localització nuclear. S'indiquen també les regions d'interacció amb d'altres proteïnes. FS indica regió necessària per a la localització en foci després de dany. Corresponen als dominis d'interacció a PCNA ubiquitinat UBZ en DNA pol $\eta$  i UBM en DNA pol $\iota$  [214].

### 1.11.5.2. Pol $\iota$

Malgrat que estructuralment la polimerasa de TLS DNA pol $\iota$  és molt semblant a la DNA pol $\eta$ , la seva funció no és tant coneguda. DNA pol $\iota$  és present en eucariotes superiors però no es localitza en *S.cerevisiae* on s'han realitzat la majoria d'estudis genètics de TLS [215]. Es postula que prové d'una duplicació de la DNA pol $\eta$  i que ha diversificat posteriorment la seva funció. El fet que la DNA pol $\iota$  no sigui present en llevats i que la seva deficiència no estigui associada a cap malaltia genètica humana coneguda són dos dels principals motius pels quals se'n coneix parcialment la seva funció. La DNA pol $\iota$  contribueix a la mutagènesi induïda per UV en línies de pacients XP-V [216] tot i que es considera que en presència de les rutes de reparació i DDT

intactes no contribueix a un augment de la mutagenicitat *in vivo*. De fet, en ratolins i humans que manquen l'expressió de la DNA polt s'observa una tendència a desenvolupar càncers postulant una funció protectora de DNA polt en la mutagenicitat [217, 218]. Recentment s'ha suggerit una funció protectora de la DNA polt per combatre el dany oxidatiu induït al DNA tot i que el mecanisme d'acció resta per descriure: línies cel·lulars deficientes per DNA polt són sensibles a tractaments amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i DNA polt interactua amb el factor de BER XRCC1 després d'aquest tipus de tractament [219]. La regulació de la seva activitat catalítica sembla que vindria determinada per la concentració de manganès. Aquest cofactor és essencial per incrementar la seva activitat catalítica tant de DNA danyat com d'intacte [220]. La DNA polt interacciona amb la DNA polη i sembla que aquesta interacció és necessària per a la localització als foci de dany de DNA polt, com a mínim en resposta a radiació UV [221]. Per a la correcta localització de DNA polt a foci de reparació també és necessari el seu domini UBM d'interacció a ubiquitina. Aquest domini permet la localització de DNA polt específicament amb PCNA monoubiquitinat a les forquilles de replicació bloquejades [199, 222]. A més, també és necessària per a la correcta localització de DNA polt la funcionalitat de la lligasa d'Ub RAD18 [223]. Malgrat tot, la rellevància biològica de la interacció entre DNA polt i PCNA monoubiquitinat i com es desenvolupa una TLS clàssica mitjançant DNA polt no ha estat mai provada ni se'n coneix cap substrat específic. Per tant, és d'un interès cabdal entendre el tipus de lesió sobre el qual podria sintetitzar la DNA polt per comprendre els processos de càncer associats a DNA polt en humans. El fet que DNA polt incorpori una base oposada a llocs AP [202] i que sigui prescindible per el procés d'hipermutació somàtica [224] en el qual es genera diversificació d'anticossos per inducció de mutacions per desaminació de C pot fer hipotetitzar una funció protectora de DNA polt per combatre lesions AP [225]. Molt recentment s'ha descrit l'estructura cristal·lina de DNA polt en conformació amb el DNA danyat amb una base 8-oxoG i s'ha observat que l'estructura d'unió no permet la tautomerització a C de la 8-oxoG. A més, al lloc actiu de síntesi, DNA polt hi acomoda el nucleòtid correcte dCTP en detriment de dATP, evitant l'error d'incorporació del nucleòtid. D'aquesta manera es descriu la DNA polt com una potencial polimerasa de TLS de protecció contra l'estrès oxidatiu [226]. Malgrat tot, el

mecanisme d'acció i reclutament de DNA pol $\alpha$  als llocs de 8-oxoG *in vivo* resta per elucidar.

### **1.11.6. PCNA i dany oxidatiu**

PCNA és un cofactor de càrrega de polimerases, tant de replicatives com de TLS i com a tal és necessari en tots els processos de síntesi de DNA amb excepció de la síntesi d'un únic nucleòtid per part de la DNA pol $\beta$  en SP-BER. La majoria de lesions de bases oxidades tals com la 8-oxoG i l'U no generen distorsions a la cadena dúplex de DNA i per tant no bloquegen la progressió de les polimerases DNA pol $\delta/\epsilon$  ni de la forquilla de replicació. Malgrat aquest fet, són lesions potencialment perilloses per la alta probabilitat de fixar mutacions, ja que a canvi, s'introdueix una base errònia a la cadena de nova síntesi incrementant el risc de mutagenicitat si no són escindides correctament pels sistemes de reparació post-replicatius MMR i BER post-replicatiu comentats amb anterioritat. En ambdós sistemes de reparació es necessita PCNA per carregar les polimerases replicatives per a la síntesi del pedaç generat en el procés d'escissió. Per tant, PCNA tindria un paper d'acompanyant, i no de senyalització directe mitjançant modificacions de la pròpia PCNA, en la reparació d'aquest tipus de dany. S'hipotetitzen possibles funcions de PCNA monoubiquitinat en la síntesi sobre alguns tipus de bases oxidades que permetria la introducció de la base correcte mitjançant polimerases de TLS concretes. La introducció de la base correcte seria un mecanisme de DDT i generaria substrats susceptibles de ser reparats a la següent fase G1 del cicle cel·lular pels mecanismes clàssics de BER. Aquesta hipòtesi ni el mecanisme d'acció no han estat demostrats. Així mateix, com es completen *in vivo* els mecanismes de reparació postreplicatius iniciats per les glicosilases MUTYH i UNG2 i com es completa la reparació pel sistema de MMR no és del tot conegut. Per a tots aquests processos i per solucionar lesions oxidatives en clústers al DNA es proposa una funció per PCNA monoubiquitinat. En el present treball estudiarem el paper de PCNA en la reparació del dany oxidatiu i explorarem la possible funció de PCNA monoubiquitinat en resposta a les bases oxidades al DNA i la seva capacitat de reclutar polimerases de TLS per circumval·lar el dany en fase replicativa.



## **2. Objectius**

---



## 2. Objectius

L'objectiu general de la present tesi doctoral és el de **caracteritzar el paper de la ruta FA i de PCNA en resposta a dany i més concretament, en l'estudi dels mecanismes de reparació del dany oxidatiu en fase replicativa del cicle cel·lular.**

La relació entre la proteïna central de la ruta FA/BRCA, FANCD2 i PCNA és un tema candent actualment en estudi. Les dues proteïnes intervenen en rutes de reparació del dany al DNA en fase S del cicle cel·lular i són modificades post-traduccionalment per monoubiquitinació. A més, recentment s'ha descrit com ambdues proteïnes estant relacionades i regulades per la mateixa proteïna, la lligasa d'ubiquitina RAD18. La funció de RAD18 és doncs clau per entendre la correcte monoubiquitinació de FANCD2 i PCNA i la seva localització a cromatina [99]. L'enzim de deubiquitinació USP1 és també comú en les dues proteïnes i coopera en la regulació de l'equilibri dinàmic entre ubiquitinació i deubiquitinació de FANCD2 i PCNA [96, 97].

Totes aquestes dades i el fet que les dues proteïnes puguin estar potencialment involucrades en la reparació del dany oxidatiu ens va portar a plantejar l'objectiu descrit que pot ser subdividit en:

- Estudi de la ruta FA en resposta a baixes dosis de IR
  
- Estudi del paper de la ruta FA en resposta a dany oxidatiu
  
- Estudi del paper de PCNA en resposta a dany oxidatiu







### **3. Materials i mètodes**

---



### 3. Materials i mètodes

#### 3.1. Línies cel·lulars i cultius

Es van utilitzar les següents línies cel·lulars en l'estudi: línies transformades de fibroblasts humans procedents del bancs de cèl·lules de Coriell immortalitzades amb el virus SV40 i deficients pel gen de *FANCD2* (*FANCD2*<sup>-/-</sup>) GM16633 (PD20), la seva corresponent línia corregida GM16634 (3.15) i les línies cel·lulars salvatges AG10076 (MRC5) i U2OS. A més, es van emprar la línia cel·lular PD20 que expressa la forma no ubiquitinable de *FANCD2* (PD20-K561R) i la línia PD20 que expressa la forma no fosforilable a la serina 222 (PD20-S222A). Ambdues línies cel·lulars van ser generosament cedides per la Dra. Irene Garcia-Higuera i pel Dr. Toshiyasu Taniguchi respectivament. Les línies cel·lulars embrioniques de fibroblast de ratolí (MEF) salvatges i deficients per *Ogg1* (MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup>) van ser compartides gràcies a la col·laboració de la Dra. Deborah Barnes i la línia MEF *ATM*<sup>-/-</sup> i la línia de fibroblasts humana *ATM*<sup>-/-</sup>, AT-7 van ser facilitades per la Dra. Elsa Callén. Una línia cel·lular de fibroblast primari procedent d'un pacient amb fimosi de 5 anys d'edat també va ser utilitzada en l'estudi gràcies a l'amabilitat i cortesia del departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona.

Pel cultiu de les línies cel·lulars de MEF salvatges es va utilitzar medi E4/F12 en proporció 1:1 complementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) i un 1% d'aminoàcids no essencials mentre que per la línia cel·lular MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup> es va utilitzar medi E4/F12 en proporció 3:1 complementada amb un 15% de FBS. Totes les altres línies cel·lulars transformades es van cultivar amb medi E4 complementat amb 10% de FBS. La línia de fibroblast primaris utilitzada a l'estudi es va cultivar amb el mateix medi E4 però complementat amb un 15% de FBS. Es va complementar el medi de totes les línies emprades amb una barreja d'antibiòtics comercial (plasmocin-Invivogen) en proporció 1/10000 per minimitzar el risc de contaminacions. Totes les línies cel·lulars es van cultivar a temperatura controlada de 37 °C i en atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Anàlisi per *western blot*

Les cèl·lules es van recol·lectar per raspai i es van lisar durant 10 minuts a 4 °C en solució de lisi comercial RIPA (Millipore: 0,5 M de Tris-HCl a pH 7,4, 1,5 M de NaCl, àcid desoxicòlic al 2,5%, detergent NP-40 al 10% i concentracions de EDTA de

10mM) complementat amb la nucleasa benzonasa (Novagen) a una concentració final de 8 unitats per mL. La benzonasa és capaç de digerir el DNA i alliberar-ne les proteïnes fortament unides de manera que aquestes seran presents a l'extracte proteic generat. La concentració total de proteïna dels extractes es va mesurar mitjançant espectrofotometria seguint el protocol de l'assaig de quantificació de proteïna de Bio-rad (BioRad). Es van separar un total de 40 µg de proteïna del extractes en gel SDS/PAGE al 6% de poliacrilamida per a FANCD2, vinculina i ATM, al 9% per a PCNA, RAD18 i Chk2 (T68) i al 15% per a γH2AX i actina. Posteriorment es van transferir les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa (Biorad). La membrana es va incubar durant tota la nit amb el corresponent anticòs primari a 4°C i en suau agitació per assegurar una incubació uniforme de tota la membrana amb l'anticòs. Els següents anticossos primaris van ser utilitzats en solució de TTBS amb llet no greixosa al 5%: anticòs de conill contra FANCD2 (abcam, ref. ab2187) diluït 1/2500, anticòs de ratolí contra vinculina (abcam, ref. ab18058) diluït 1/5000, anticòs de conill contra actina (abcam, ref. ab1801) diluït 1/1000, anticòs de ratolí contra ATM (abcam, ref. ab78) diluït 1/500, anticòs de ratolí contra PCNA (abcam, ref. ab29) diluït 1/2000, anticòs de ratolí contra RAD18 (abcam, ref. ab57447) diluït 1/1000, anticòs de ratolí contra l'etiqueta de sis histidines (His) consecutives (abcam, ref. ab18184) diluït 1/2500 i l'anticòs de ratolí contra l'etiqueta FLAG (Sigma, ref. F3165) diluït 1/5000. Els anticossos de ratolí contra γH2AX (ref. Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139), clone JBW301, Upstate) i contra la forma fosforilada de Chk2 al residu treonina 68 (T68) (abcam, ref. ab38461) es van dissoldre 1/5000 i 1/750 respectivament en solució de TTBS al 5% d'albumina de sèrum boví (BSA) (Sigma).

El dia següent es van rentar les membranes tres vegades durant 5 minuts en solució de TTBS i Tween (Sigma) al 0,05%. Posteriorment, es van incubar durant una hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari corresponent lligat a proteïna peroxidasa de cavall. Es van utilitzar els següents anticossos secundaris: anticòs de cabra contra ratolí (Santa Cruz, ref. sc-2005) i anticòs de cabra contra conill (Santa Cruz, ref. sc-2004). Finalment es van rentar les membranes tres vegades en solució de TTBS i Tween al 0,05% i es van revelar gràcies a l'aparell de revelatge sensible a luminescència GeneGnome (Syngene Bio imaging). El revelatge es realitza evidenciant l'activitat peroxidasa de l'anticòs secundari mitjançant les solucions de peroxidasa i de luminol (Thermo Scientific) en proporció 1 a 1.

### 3.3. Anàlisi d'immunofluorescència

El procediment per a realitzar l'assaig d'immunofluorescència (IF) es va realitzar seguint les directrius marcades en treballs anteriors [123] amb lleus modificacions. Es van preincubar les cèl·lules amb bromodesoxiuridina (BrdU) a concentracions de 1mM durant 30 minuts en medi complet just abans de procedir al tractament amb els agents inductors de dany  $H_2O_2$ , bromat de potassi ( $KBrO_3$ ), IR, UV segons correspongui. Seguidament es van rentar les cèl·lules amb PBS i es van fixar amb una solució de PBS amb formaldehid (Merck) al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es va aturar la fixació mitjançant dos rentats consecutius amb PBS. Les cèl·lules es van permeabilitzar amb incubació durant 10 minuts a temperatura ambient i en suau agitació amb solució de tritó composta per tritó x-100 al 0,5%, 20mM de Hepes-KOH, 50nM de NaCl, 3mM de  $MgCl_2$  i 300 mM de sucrosa. Com a preservant es va afegir azida sòdica a la solució de tritó a una concentració final de 1mM. En les IF en que es va visualitzar el marcatge en fase S mitjançant la preincubació amb BrdU, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS i van ser tractades durant 10 minuts a temperatura ambient amb concentracions 2N de HCl (Sigma). L'àcid es va rentar dues vegades amb PBS. D'aquesta manera el DNA és desnaturalitzat de forma que és accessible a anticossos per a la posterior detecció de la BrdU incorporada. Seguidament, es van bloquejar les cèl·lules en suau agitació, durant 15 minuts i a temperatura ambient per incubació amb una solució de bloqueig formada per PBS al 3% de BSA i al 0,05% de Tween. En aquest cas, també va ser afegida a la solució de bloqueig l'àcid sòdica a una concentració final de 1mM. Seguidament, es va realitzar la incubació amb anticossos primaris per a la detecció de les proteïnes d'interès. Els anticossos es van dissoldre en solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C en cambres humides per evitar l'evaporació de la solució. Es van utilitzar els següents anticossos primaris: anticòs de rata contra BrdU (abcam, ref. ab6326) diluït 1/400 i anticòs de conill contra l'epítot FLAG conjugat al cromòfor vermell Alexa 568 (Cell Signalling, ref. 3768) diluït 1/100. Els anticossos de ratolí contra l'epítot His, de conill contra FANCD2 i de ratolí contra  $\gamma H2AX$  emprats van ser els mateixos que els utilitzats per *western blot* a dilucions de 1/5000, 1/2500 i 1/10000 respectivament.

En els experiments de IF en que va ser necessari un marcatge amb anticossos secundaris fluorescents, les cèl·lules van ser rentades el dia següent durant 10 minuts a temperatura ambient amb solució de bloqueig. El rentat es va repetir una vegada més

abans de la incubació durant una hora a temperatura ambient i a les fosques amb l'anticòs secundari corresponent marcat amb un cromòfor blau (350), verd (488) o vermell (568) a dilucions 1/1000 en solució de bloqueig. Es van utilitzar els següents anticossos secundaris, tots ells d'Invitrogen i produïts en cabra: anticòs contra conill Alexa Fluor 488 (ref. A11034), anticòs contra conill Alexa Fluor 568 (ref. A11036), anticòs contra ratolí Alexa Fluor 488 (ref. A11029), anticòs contra ratolí Alexa Fluor 568 (ref. A11031) i anticòs contra rata Alexa Fluor 350 (ref. A21093). Finalment, l'excés d'anticòs secundari no unit específicament es va rentar dues vegades durant 10 minuts a temperatura ambient amb solució de bloqueig i a les fosques. Abans del muntatge de les preparacions, es van rentar les cèl·lules amb PBS i finalment amb H<sub>2</sub>O. El medi de muntatge que es va emprar va ser el medi específic per IF (Vector Laboratories, Inc ref. H-1000) o el medi de muntatge per IF complementat amb DAPI per a la tinció del nucli en blau (Vector Laboratories, Inc ref. H-1200). El DAPI s'uneix de manera específica a regions de DNA riques en la parella A:T i ens permet visualitzar fàcilment el nucli de les cèl·lules..

### **3.4. Assaig de supervivència**

Es van cultivar 100.000 cèl·lules per duplicat en plaques de petri de 6cm. El dia següent es van irradiar en un irradiador gamma (IBL437C) a les dosis indicades. En els tractaments amb KBrO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma), les cèl·lules es van exposar als agents oxidants i a les dosis indicades durant 60 i 30 minuts respectivament en medi RPMI sense sèrum a 37 °C i en atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Seguidament es va eliminar el medi, es van rentar les cèl·lules amb PBS i es va afegir nou medi complet. 72 hores després del tractament es va descartar el medi, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS i es van recollir per tripsinització. El número de cèl·lules resultant a la suspensió es va comptar utilitzant el comptador Beckman-Coulter. Els resultats són expressats com a disminució de supervivència respecte els controls no tractats per a cada línia cel·lular analitzada.

### **3.5. Assaig d'interferència per RNA**

Es van disminuir els nivells de proteïna amb les seqüència de siRNA següent: per a ATM es va utilitzar una única seqüència, 5' AACAUACUACUCAAGACAUAU 3' (Ambion) i per a RAD18 una combinació de tres seqüències diferents: RAD18-1 5'

GCUCUCUGAUCGUGAUUU 3', RAD18-2 5' GCAGUUUGCUUUAGAGUCA 3' i RAD18-3 5' CCAAGAAACAAGCGUAAUA 3' (Sigma). Com a control es va utilitzar el siRNA contra luciferasa: 5' CGUACGCGGAAUACUUCGA 3' (Ambion). Les cèl·lules es van transfectar dues vegades amb les seqüències de siRNA indicades a una concentració final de 25nM mitjançant Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) seguint el protocol del fabricant. De manera breu, es van cultivar 150.000 cèl·lules en plaques de 6 pous que contien la barreja de transfecció (siRNA més lipofectamina) en una primera transfecció en revers. Al cap de 24 hores, es va eliminar el medi i es van rentar les cèl·lules amb PBS abans de la segona transfecció. Aquesta segona transfecció es va realitzar de manera directe afegint la barreja de transfecció a les cèl·lules en cultiu. Finalment, les cèl·lules es van tractar, lisar o processar per citometria 72 hores després de la segona transfecció.

### **3.6. Assaig de quantificació de la 8-oxoG**

Es va tractar la línia cel·lular 3.15 en cultiu amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub>, IR o no es va tractar. Una hora, 30 minuts i just immediatament després del tractament per IR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KBrO<sub>3</sub> respectivament es va extreure el DNA de les línies cel·lulars en cultiu utilitzant el kit PerfectPure DNA Cultured cell kit (5 Prime) seguint el protocol del fabricant. Posteriorment el DNA extret es va digerir amb la nucleasa micrococcal (New England Biolabs) i processat amb el kit de BIOXYTECH 8-OhdG-ELISA (Oxis International) seguint les directrius de la companyia.

### **3.7. Assaig *in vitro* per testar el sistema de reparació per escissió de bases**

El procediment per la preparació dels plasmidis que porten una única base danyada es van dur a terme seguint els protocols descrits anteriorment en altres treballs [48, 227]. Breument, el plasmidi de cadena senzilla pGEM3Zf(+) es va hibridar amb un oligonucleòtid de 22 parells de bases que conté a la posició dotzena una base 8-oxoG danyada (GATCCTCTAA8-oxoGTCGACCTGCA) o amb un oligonucleòtid que conté a la tretzena posició un U (GATCCTCTAAUGTCGACCTGCA). Així doncs es genera una única parella 8-oxoG:C o U:A respectivament. Es va generar un plasmidi de control utilitzant el mateix oligonucleòtid però sense cap base modificada. El plasmidi final tancat i de doble cadena es va generar incubant el plasmidi de cadena senzilla amb el

corresponent oligonucleòtid hibridat amb la polimerasa de DNA T4, proteïna d'unió a DNA de cadena senzilla i lligasa T4 de DNA (Roche). El plasmidi que porta un únic lloc AP (pGEM X) es va generar de manera natural incubant el plasmidi pGEM U, preparat com s'ha descrit amb anterioritat, amb la glicosilasa d'U d'*Escherichia coli* en proporció 1 ng de glicosilasa per 50 ng de DNA a 37 °C durant 45 minuts (Roche).

Els extractes cel·lulars es van preparar mitjançant el mètode desenvolupat per Tanaka i col·laboradors [228] amb petites modificacions. Es van recollir les cèl·lules, es van rentar tres vegades amb PBS i posteriorment es van dissoldre amb solució de 10mM de Tris-HCl a pH 7,8 i 200mM de KCl a una concentració de cèl·lules de  $1 \cdot 10^6$  per cada 10µL. Després d'afegir una quantitat equivalent en quan a volum d'una segona solució (10mM Tris-HCl a pH 7,8, 200mM de KCl, 2mM EDTA, 40% de glicerol, 0,2% de Nonidet P-40, 2mM de ditiotretitol i una pastilla d'inhibidors de proteases lliures de EDTA de Roche), la suspensió cel·lular es va agitar durant una hora a 4°C i posteriorment es va centrifugar a 13000 rpm durant 15 minuts. La concentració total de proteïnes del sobrenedant es va mesurar mitjançant l'assaig de quantificació de Bio-Rad seguint les instruccions del fabricant. El sobrenedant es va dividir en alíquotes i es va emmagatzemar en nitrogen líquid.

L'assaig *in vitro* per testar la funcionalitat de la reparació BER es va realitzar seguint els protocols descrits amb anterioritat [227, 229]: es van incubar 300ng de substrat plasmidi amb 40µg d'extracte proteic durant els temps indicats a 30°C en presència de  $^{32}\text{PdGTP}$  o  $^{32}\text{PdTTP}$  segons correspongui. Un cop es va completar la reacció de reparació, es va purificar el producte de DNA resultant mitjançant el kit comercial de NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) i es va digerir amb 20 unitats de les endonucleases de restricció XbaI-PstI (Roche). Els fragments de 16 parells de bases resultants es van separar en gel PAGE en presència d'urea (7M) i a un amperatge constant de 30mA de corrent. Finalment, es van analitzar els nivells d'incorporació de la base marcada amb radioactivitat. Si té lloc la reparació correcte del substrat s'observa un increment del fragment de 16 parells de bases marcat, mentre que si no té lloc la reparació, aquest no es detecta. La reparació del substrat és proporcional a la intensitat de la senyal radioactiva observada.



### 3.8. Assaig de síntesi de DNA per citometria de flux

L'assaig de síntesi de DNA es va dur a terme de manera semblant a com s'ha fet amb anterioritat en d'altres publicacions [230] modificant lleugerament el protocol. Primerament, es van tractar les cèl·lules amb  $H_2O_2$ ,  $KBrO_3$  i IR a les dosis indicades. Al cap de 3 hores, es van marcar amb un pols de 10 minuts amb concentracions de  $10\mu M$  de 5-etilnil-2-desoxiuridina (EdU) diluït en el medi en que creixen habitualment les cèl·lules. L'EdU és un anàleg de la BrdU i és incorporat al DNA durant la fase de síntesi. Les cèl·lules es van fixar immediatament després de la incubació i van ser processades seguint el protocol de l'assaig de citometria del kit comercial Click-it EdU Alexa Fluor 488 (Invitrogen). L'anàlisi de la fluorescència per FACS es va realitzar al citòmetre FACSCanto (BD bioscience). Les dades obtingudes es van processar mitjançant el programa de FlowJo (Tree Star, Inc) per a l'anàlisi de citometria.

### 3.9. Assaig de sincronització de cèl·lules primàries

Per a sincronitzar cèl·lules de fibroblasts primaris en fase estacionària del cicle cel·lular o  $G_0$  es va emprar el sistema de sincronització per privació de sèrum. Per fer-ho es va seguir el següent protocol: les cèl·lules es van deixar créixer en medi complet fins a confluència en plaques. Un cop les cèl·lules van arribar a confluència, es va substituir el medi, ric en FBS, per medi E4 complementat únicament amb un 5% de FBS. Es van deixar créixer les cèl·lules durant una setmana a la mateixa placa i posteriorment es van fixar per l'anàlisi per citometria o es van tractar amb els agent corresponents i es van lissar per generar extractes per a l'anàlisi per *western blot* segons s'indica. Les cèl·lules del cultiu primari asincrònic es van aconseguir mitjançant un procediment semblant: un dia abans del tractament les cèl·lules es van dividir en tres parts i es van cultivar en medi E4 al 15% de FBS després d'haver estat una setmana a confluència com en el cas anterior.

### 3.10. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux

Per identificar les diferents fases del cicle cel·lular de cèl·lules en cultiu es va utilitzar el mètode clàssic de detecció del cicle emprant tinció del DNA amb PI. Per fer-ho es va seguir el següent protocol: es van tripsinitzar i dissoldre en 1mL de solució de PBS que contenia PI a  $50\mu g/mL$  (Invitrogen) i RNasa A a  $200\mu g/mL$  (PureLink™ Rnase

A, Invitrogen) de 300.000 a  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules. Posteriorment, les cèl·lules es van incubar 20 minuts a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  i es van analitzar al citòmetre de flux per fluorescència (FACSCanto). Les diferents fases del cicle cel·lular de la població es van distingir segons la quantitat de DNA tenyit de la mostra:  $G_1$  per a cèl·lules amb quantitat  $n$  de DNA,  $G_2$  per cèl·lules amb quantitat  $2n$  de DNA i S per cèl·lules que contenen quantitats intermèdies.

### **3.11. Assaig de transfecció de DNA**

L'assaig de transfecció de DNA es va dur a terme seguint les instruccions del kit per a transfecció de DNA *Fugene 6 Transfection reagent* (Roche). Breument, es van cultivar les cèl·lules al 50-60% de confluència en plaques en cultiu i posteriorment es van transfectar mitjançant les quantitats de plasmidis d'expressió de proteïna recomanats pel fabricant. 48 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van tractar i lissar segons s'indica i els extractes cel·lulars generats es van carregar en *western blot* per comprovar l'expressió de les proteïnes sobreexpresades ectòpicament.



## **4. Resultats**

---



## 4. Resultats

### 4.1. Resposta de la ruta FA a baixes dosis de IR

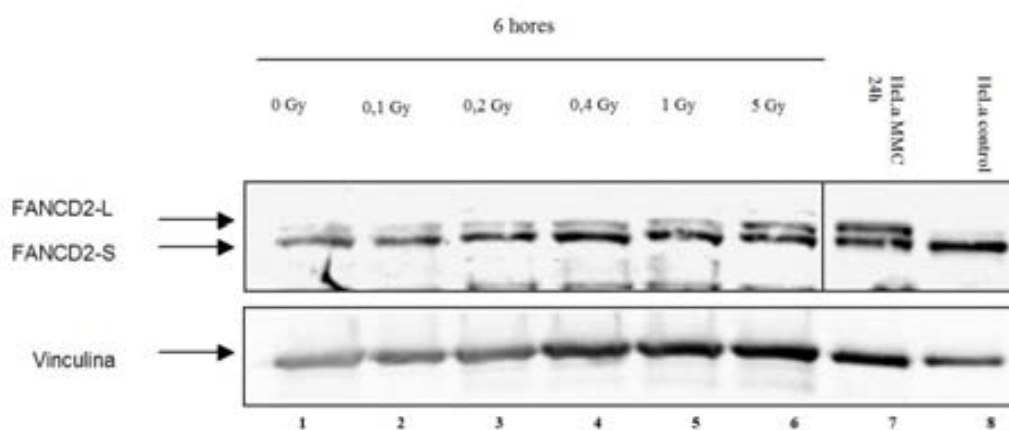
#### 4.1.1. FANCD2 es monoubiquitina en resposta a baixes dosis de IR

En el present estudi, es va utilitzar una línia cel·lular de fibroblasts humans d'un infant de 5 anys d'edat per avaluar, en les condicions més realistes fisiològicament possibles, l'impacte del dany al DNA en resposta a baixes dosis de IR i la seva resposta cel·lular depenent de la ruta FA/BRCA. L'objectiu d'aquesta part del treball és esbrinar si existeix una dosi de IR suficientment baixa capaç de generar dany al DNA però incapaç d'activar una resposta cel·lular coordinada en resposta al dany induït. Es va utilitzar com a control de la resposta cel·lular al dany l'activació de la ruta FA/BRCA i, més concretament, l'activació per monoubiquitinació de la proteïna central de la ruta, FANCD2, avaluada mitjançant l'anàlisi per *western blot*. També es va comprovar la capacitat de migració de FANCD2 i la seva localització al lloc del dany, avaluada mitjançant l'anàlisi per IF.

En el *western blot* de la fig.14 es presenta l'anàlisi per monoubiquitinació de FANCD2; FANCD2-L representa la forma llarga, monoubiquitinada i de major pes molecular mentre que FANCD2-S la forma curta, de menor pes molecular, no modificada post-traduccionament i amb major mobilitat electroforètica en gel. Es considera que es produeix la monoubiquitinació de FANCD2 en resposta a tractament quan la intensitat de la banda monoubiquitinada, FANCD2-L, incrementa respecte la intensitat de la banda no monoubiquitinada, FANCD2-S. A tall d'exemple explicatiu, es van incloure al gel de la fig.14 extractes cel·lulars procedents d'una línia cel·lular transformada de cèl·lules HeLa tractades amb MMC. Al carril setè de la figura s'observa com les cèl·lules van monoubiquitar clarament FANCD2 en resposta a MMC respecte les mateixes cèl·lules no tractades (carril vuitè).

Per centrar-nos en el nostre objectiu, es van tractar les cèl·lules primàries cultivades de manera asincrònica a dosis creixents de IR i es van lisar 6 hores després del tractament per visualitzar la monoubiquitinació de FANCD2 per *western blot* tal i com es realitza de manera rutinària en altres estudis previs [123]. Després de

tractaments amb altes dosis de IR (>1Gy), es va induir la monoubiquitinació de FANCD2 (fig.14 carrils 5-6) amb concordança amb resultats d'altres treballs [128]. Tot i que és més difícil d'observar, es visualitza una tendència creixent a l'activació per monoubiquitinació de FANCD2 en resposta a dosis creixents de IR des de 0,1 a 0,4 Gy (fig.14 carrils 2-4).



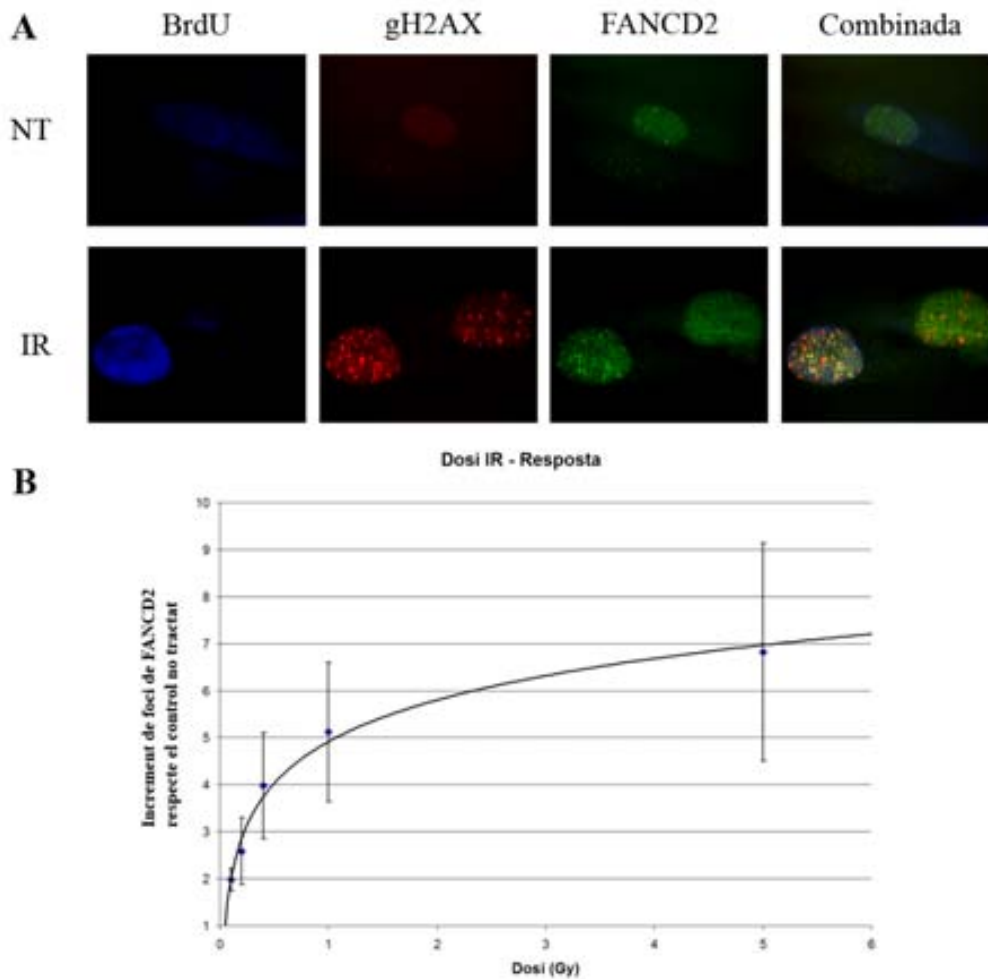
**Figura 14. La ruta FA/BRCA és activada en resposta a dosis creixents de IR en cèl·lules primàries salvatges.** Es van carregar en gel d'electroforesi extractes cel·lulars totals procedents de cèl·lules primàries tractades a les dosis indicades de IR. Els cultius cel·lulars es van lisar i recollir 6 hores després del tractament. La membrana es va revelar amb anticòs contra FANCD2 i anticòs contra vinculina, que es va utilitzar com a control de càrrega. Es van incloure com a control positiu de monoubiquitinació de FANCD2 extractes cel·lulars de cèl·lules HeLa immortalitzades tractades amb MMC durant 24 hores.

La imatge presentada està modificada de manera que els carrils que corresponen a extractes cel·lulars procedents de la línia primària (carrils 1-6) estant sobreexposats per igual respecte els carrils corresponents a extractes de les cèl·lules transformades (carrils 7-8). La monoubiquitinació basal de FANCD2 depèn de fase del cicle cel·lular, de manera que es troba més forma monoubiquitinada respecte no modificada en fase S del cicle cel·lular [231]. Per aquest motiu, la imatge corresponent als carrils pertanyents a les cèl·lules primàries i de progressió més lenta es va sobreexposar respecte els carrils de les cèl·lules transformades HeLa altament proliferatives.

#### **4.1.2. FANCD2 colocalitza amb $\gamma$ H2AX als llocs de dany després de baixes dosis de IR en fase replicativa del cicle cel·lular**

Per aprofundir en l'estudi de la monoubiquitinació de FANCD2 a baixes dosis de IR, es va procedir a l'estudi de les cèl·lules primàries del mateix individu mitjançant la tècnica de IF. La IF és una tècnica de biologia molecular rutinària que ens permet la visualització de manera individualitzada de les cèl·lules a més de brindar-nos la oportunitat de realitzar marcatges específics per les diferents fases del cicle cel·lular. En el nostre cas, es va realitzar el marcatge de fase replicativa mitjançant la incubació dels cultius amb BrdU, anàleg de la T, just abans de la irradiació. D'aquesta manera es van identificar fàcilment les cèl·lules irradiades en fase S del cicle cel·lular en les preparacions amb la posterior incubació amb anticòs específic contra BrdU. Les cèl·lules es van tractar a les dosis de IR indicades i posteriorment es van fixar i processar 6 hores després del tractament seguint el protocol estàndard d'IF descrit a l'apartat de materials i mètodes.

És abundantment coneguda que la fosforilació de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) és una de les respostes cel·lulars al dany al DNA més ràpides de les que disposa la cèl·lula per iniciar la senyalització i reparació dels DSBs. H2AX és fosforilada per ATM, DNA-PK i, en menor mesura, per ATR de manera redundant per senyalitzar el dany generat per IR i reclutar noves proteïnes de reparació [232]; entre elles FANCD2. La colocalització de FANCD2 amb  $\gamma$ H2AX es va confirmar en resposta a altes dosis de IR i sempre dependent de fase replicativa de DNA com s'exemplifica a la fig.15A confirmant resultats previs del grup [123]. Es suggereix que els foci de  $\gamma$ H2AX observats en fase replicativa són DSBs susceptibles a ser reparats pel sistema de reparació de NHEJ mentre que els observats en fase replicativa són susceptibles a ser reparats per HR. En fase S del cicle cel·lular, tots els foci de FANCD2 observats colocalitzen amb els de  $\gamma$ H2AX però no tots els de  $\gamma$ H2AX amb els de FANCD2. Es postula que aquests últims DSBs senyalitzats per la fosforilació de H2AX són trencaments als quals encara no ha arribat la maquinària de replicació del DNA. Com s'ha comentat amb anterioritat, la monoubiquitinació de FANCD2 i l'activació de la ruta FA/BRCA depenen de fase S del cicle cel·lular de manera que no es van visualitzar foci de FANCD2 en cèl·lules tractades no marcades amb BrdU.



**Figura 15. FANCD2 i  $\gamma$ H2AX colocalitzen en resposta a IR i la resposta de formació de foci de FANCD2 a dosis creixents de IR és logarítmica sense un llindar mínim d'activació.** (A) Es van incubar cèl·lules primàries durant 30 minuts amb BrdU, posteriorment es van irradiar i al cap de 6 hores es van fixar i processar per IF. Es van utilitzar anticossos anti-BrdU, anti- $\gamma$ H2AX i anti-FANCD2 i els seus corresponents anticossos secundaris colorimètrics blau, vermell i verd per a la visualització de les proteïnes. (B) El recompte de foci de FANCD2 en cèl·lules en fase S del cicle cel·lular dut a terme de manera codificada s'expressa en gràfic a dosis creixents de IR respecte els foci de FANCD2 observats en cèl·lules no tractades. Els resultats corresponen a 5 experiments independents on es mostra la funció logarítmica resultant ( $R^2 > 0,95$ ). L'error representa la desviació estàndard dels 5 experiments per a cada dosi analitzada.

Es van comptabilitzar els foci de FANCD2 en cèl·lules positives pel marcatge amb BrdU en mostres procedents de 5 experiments independents. Es van considerar cèl·lules positives per a la formació de foci de FANCD2 les que presentaven més de 5 foci per cèl·lula, mentre que es van considerar negatives les que presentaven 5 o menys foci per cèl·lula. Les preparacions es van codificar de manera que l'investigador va realitzar el recompte sense saber si estava comptant les mostres irradiades o no irradiades. El resultat s'expressa a la fig.15B en increment de foci respecte la formació de foci basal per cada experiment i per a totes les dosis de IR analitzades. S'observa una resposta logarítmica d'activació de foci de FANCD2 després del tractament amb IR



sense un llindar mínim d'activació per la formació de foci per a les dosis emprades de 0,1 Gy a 5 Gy. La funció logarítmica resultant entre les dosis i l'increment de foci mostra una elevada fiabilitat i consistència ( $R^2 > 0,95$ ). Així doncs, la resposta obtinguda és lineal a baixes dosis ( $< 0,4$  Gy) sense un llindar d'activació i se satura a dosis altes ( $> 1$  Gy). Si existeix un llindar d'activació aquest és  $< 0,1$  Gy i caldrien estudis més detallats a molt baixes dosis de IR per comprovar si existeix una dosi suficientment baixa en la qual no hi hagi resposta al dany al DNA. Es considera la formació de foci de FANCD2 com a marca de forquilles de replicació bloquejades al DNA. El treball presentat demostra doncs com dosis molt baixes de IR (de fins a 0,1 Gy) són capaces de bloquejar les forquilles de replicació.

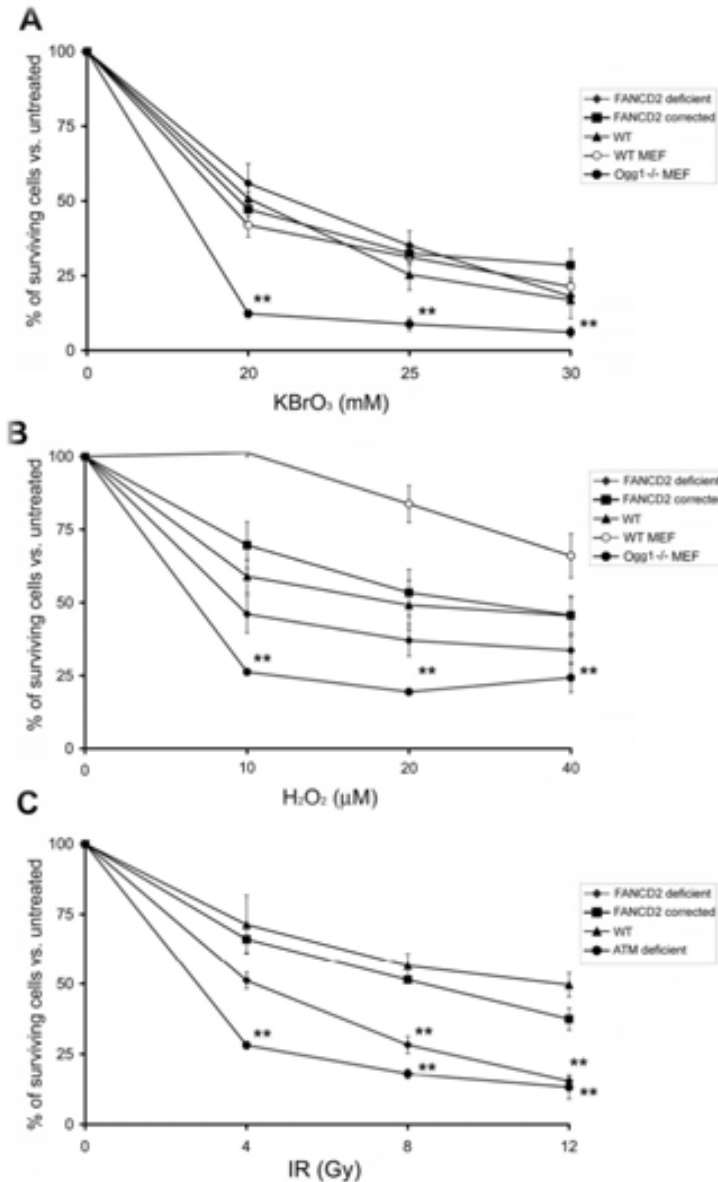
## **4.2. Acció coordinada de FA i ATM en resposta a dany oxidatiu**

La controvèrsia que genera el dany oxidatiu en FA és un tema extensament debatut [151]. En el present estudi es vol estudiar i clarificar l'efecte del dany oxidatiu en l'activació de la ruta FA a més d'intentar provar una relació amb ATM, proteïna de control de la resposta a dany al DNA i coneguda per la seva capacitat de fosforilació de FANCD2 després d'exposició a IR [128]. A més, es busca comprendre i cercar la possible relació entre el fenotip observat en pacients FA i l'estrès oxidatiu endogen. Aquest apartat que es detalla i es discuteix a continuació, va ser publicat recentment en un article científic [233] adjuntat a l'annex d'aquesta tesi doctoral.

### **4.2.1. Les cèl·lules FA no són sensibles a $H_2O_2$ ni a $KBrO_3$**

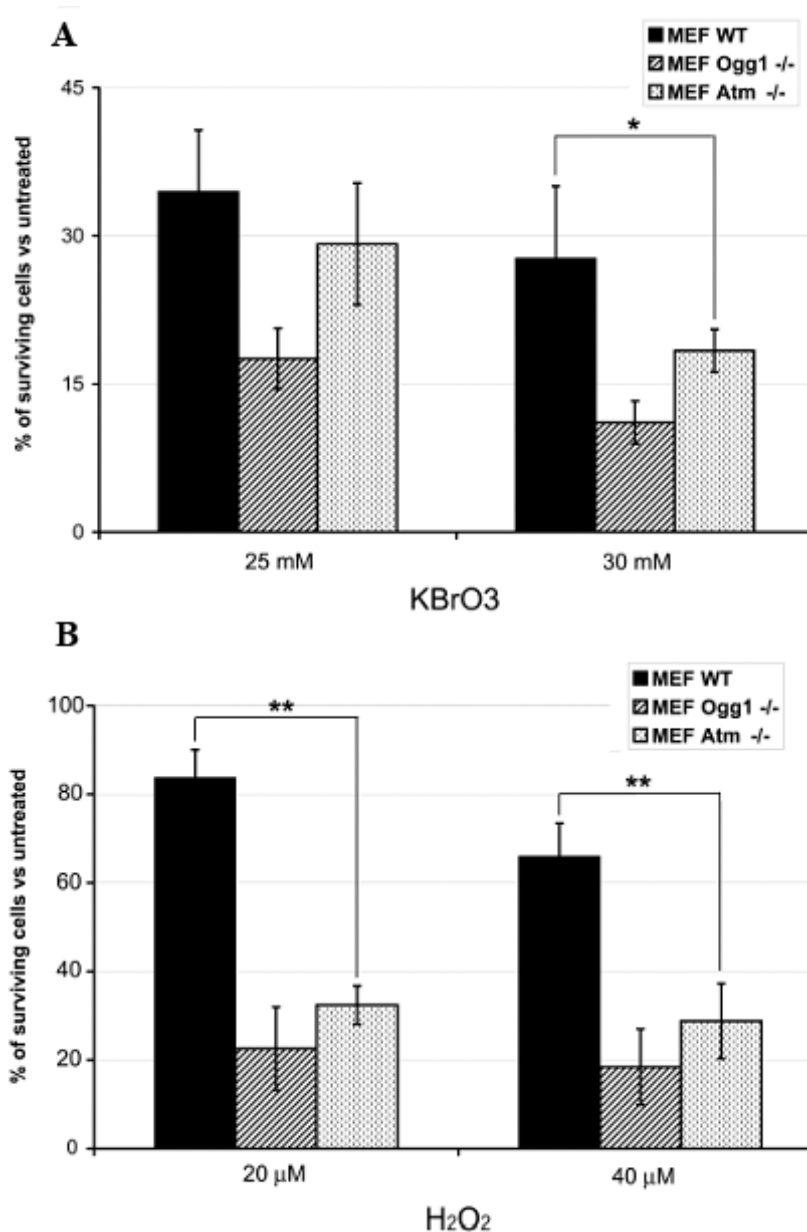
En primer lloc, es va testar la sensibilitat de la línia de fibroblast deficient per FANCD2 (PD20) immortalitzada pel virus SV40 i la seva respectiva línia corregida (3.15) a 3 agents capaços d'induir dany oxidatiu:  $H_2O_2$ ,  $KBrO_3$  i IR. Es van tractar les cèl·lules a les dosis indicades de cada agent i es van comptabilitzar les vives 72 hores després del tractament. A la fig.16 es mostra el percentatge de cèl·lules vives respecte el control no tractat per a cada dosi i tractament. Després del tractament amb  $KBrO_3$  i  $H_2O_2$  no es van observar diferències en quan a supervivència entre la línia PD20 i la seva corregida 3.15. La línia de control sensible a dany oxidatiu MEF  $Ogg1^{-/-}$  mostra per contra una clara sensibilitat a ambdós agents comparada a la seva línia salvatge

MEF salvatge confirmant la fiabilitat de l'experiment de supervivència utilitzat en aquest estudi per a testar la sensibilitat de diferents línies cel·lulars als tractaments. La línia FANCD2 deficient mostra una sensibilitat intermèdia però significativa a IR respecte la coneguda sensibilitat de la línia ATM deficient. Aquestes dades de sensibilitat intermèdia a IR obtinguts al present estudi estant en línia amb resultats ja publicats prèviament [128].



**Figura 16.** Les línies deficientes per a FANCD2 mostren una sensibilitat incrementada a IR però normal a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i a KBrO<sub>3</sub>. (A) i (B) Sensibilitat de les línies cel·lulars deficientes per FANCD2 (PD20), deficientes corregides per FANCD2 (3.15), salvatges (línia de fibroblast humana MRC5), línia de fibroblast embrionica de ratolí (MEF) salvatge i MEF Ogg1<sup>-/-</sup> a KBrO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivament. (C) Sensibilitat a IR de les línies cel·lulars indicades anteriorment i de cèl·lules humanes deficientes per ATM (AT-7). Els gràfics representen la mitjana de 5 experiments independents i les barres d'error, l'error estàndard de la mitjana. Doble asterisc \*\* indica un P valor inferior a 0,01 en el test de T-student.

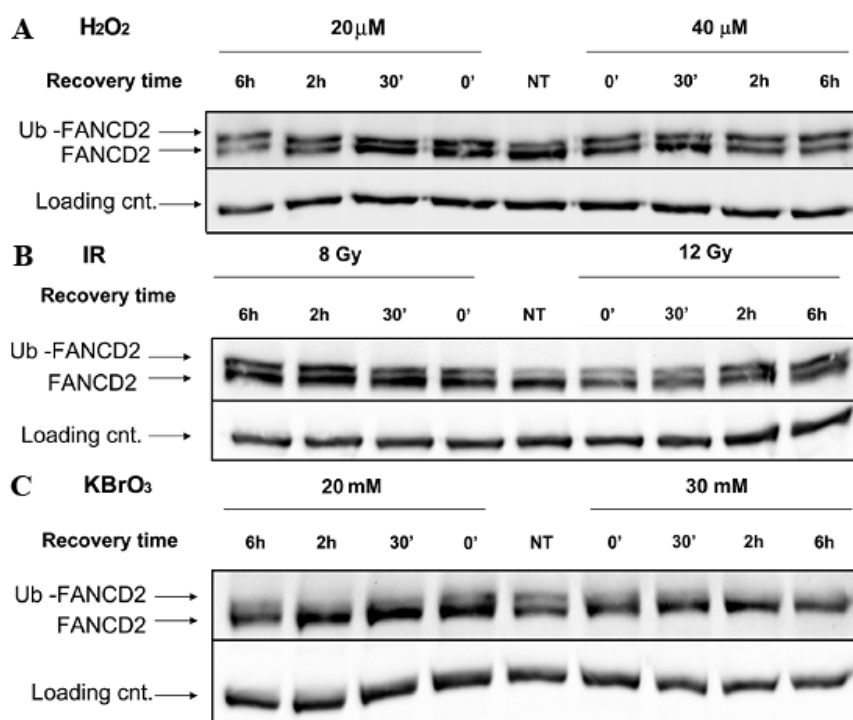
En concordança amb la sensibilitat de la línia ATM deficient a trencaments de DNA i a agressions oxidatives, aquesta va mostrar una sensibilitat moderada a dany oxidatiu induït per  $\text{KBrO}_3$  i una clara sensibilitat al dany induït per  $\text{H}_2\text{O}_2$  (fig.17). Aquestes dades reforcen les teories que suggereixen per la proteïna ATM un paper clau en el control del dany generat per estrès oxidatiu.



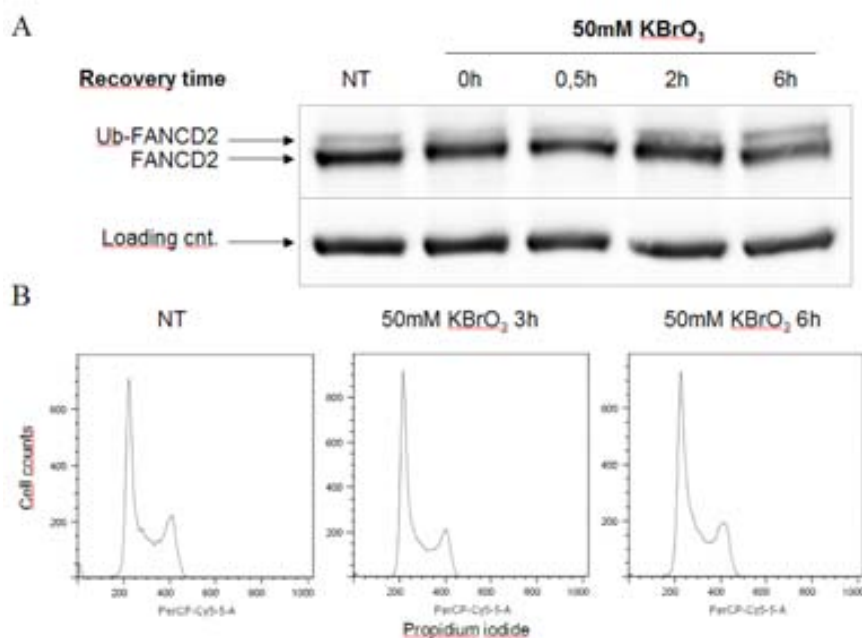
**Figura 17.** Cèl·lules deficientes per ATM mostren una marcada sensibilitat a  $\text{H}_2\text{O}_2$  i una intermèdia però notable sensibilitat a  $\text{KBrO}_3$ . (A) i (B) Sensibilitat de les línies MEF ATM  $^{-/-}$ , MEF salvatges i MEF Ogg1  $^{-/-}$  a  $\text{KBrO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivament. Els gràfics representen la mitjana de 3 experiments i les barres d'error l'error estàndard de la mitjana. Doble asterisc \*\* indica un valor de P menor de 0,01 i un únic asterisc \* un valor P menor de 0,05 en el test de T-student.

#### **4.2.2. El dany induït per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desencadena la monoubiquitinació de FANCD2 mentre que el dany induït per KBrO<sub>3</sub> és incapaç de fer-ho**

Per comparar la resposta cel·lular induïda pels diferents tractaments i per mantenir els nostres estudis dins de límits de la rellevància fisiològica, es van utilitzar dosis de concentració equivalents pels diferents agents. Es van considerar dosis equivalents aquelles que produeixen un descens semblant de la supervivència de la línia cel·lular salvatge seguint els resultats presentats a la fig.16. D'aquesta manera es consideren equivalents i comparables en quan a toxicitat les dosis de 20mM de KBrO<sub>3</sub>, 20µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 8Gy de IR ja que en els tres casos la línia cel·lular salvatge utilitzada mostra una supervivència d'aproximadament el 50% en l'assaig de viabilitat. Així doncs, emprant dosis equivalents per analitzar l'activitat de la ruta FA/BRCA es va observar una clara activació de la ruta en resposta a exposicions a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aquesta activació va ser especialment notable a temps llargs, com s'evidencia en l'anàlisi per *western blot* de monoubiquitinació de FANCD2 en cèl·lules salvatges transformades MRC5 presentat a la fig.18A. En resposta a tractaments amb IR es va induir una activació semblant de la ruta i de monoubiquitinació de FANCD2 (fig.18B). La resposta a ambdós tractaments és ràpida i dura com a mínim fins a 6 hores després del tractament. No obstant, no es va activar la ruta FA/BRCA després de tractament amb 20, 30mM de KBrO<sub>3</sub> (fig.18C) i fins a dosis altament tòxiques de fins a 50mM de KBrO<sub>3</sub> (fig.19A). L'anàlisi del cicle cel·lular per citometria mitjançant tinció de DNA va descartar modificacions del cicle com a possible causa de la manca d'activació per monoubiquitinació de FANCD2 després del tractament per KBrO<sub>3</sub> (fig.19B).



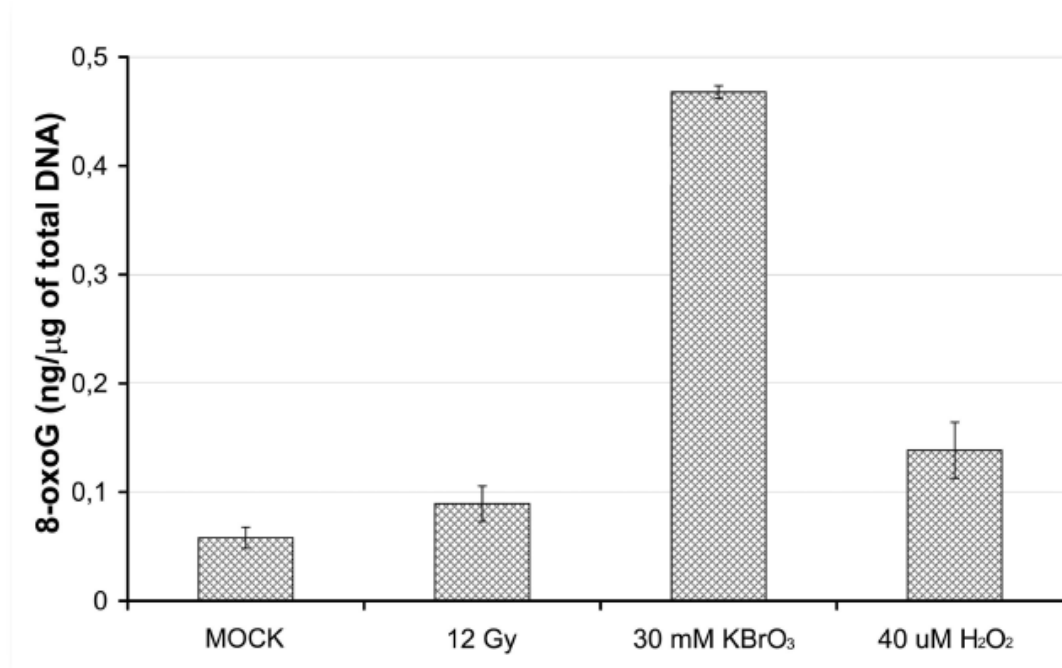
**Figura 18.** La ruta FA/BRCA és activada mitjançant monoubiquitinació de FANCD2 en resposta a tractaments amb IR i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> però no per KBrO<sub>3</sub>. Extractes cel·lulars totals de cèl·lules MRC5 prèviament tractades amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), IR (B) i KBrO<sub>3</sub> (C) es van revelar amb anticòs contra FANCD2. Les cèl·lules es van tractar a les dosis especificades i es va permetre que es recuperessin pels temps indicats abans de ser lisades. El revelatge amb anticòs contra vinculina permet assegurar una càrrega equivalent en tots els carrils.



**Figura 19.** La manca d'ubiquitinació de FANCD2 després de tractaments amb altes dosis de KBrO<sub>3</sub> no es deguda a un canvi del cycle cel·lular induït pel tractament. Es van tractar cèl·lules salvatges a dosis de 50mM de KBrO<sub>3</sub> durant una hora i posteriorment es van lisar als temps indicats post-tractament. Els extractes cel·lulars es van carregar en gel d'electroforesi i es va revelar la membrana amb anticòs contra FANCD2 i contra vinculina per assegurar una càrrega uniforme. Paral·lelament, es van fixar i tenyir amb Iodur de propidi les cèl·lules tractades al cap de 3 i 6 hores respectivament per a l'anàlisi del cycle cel·lular. NT indica cèl·lules no tractades.

### 4.2.3. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i el KBrO<sub>3</sub> generen diferents nivells de 8-oxoG al DNA

Per caracteritzar els diferents tractaments utilitzats es va decidir quantificar el dany oxidatiu induït just després d'exposar cèl·lules salvatges a dosis equivalents de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub> i IR. Per realitzar-ho, es van seleccionar dosis que produeixen aproximadament un 70% de mortalitat en l'assaig de supervivència presentat prèviament i es van mesurar els nivells de 8-oxoG induïts al DNA pels diferents agents utilitzats. La base modificada per oxidació 8-oxoG es considera una de les més freqüents en condicions d'estrès oxidatiu, i és per aquest motiu, que es va decidir estudiar-la i considerar-la com una bona marcadora de dany oxidatiu induït pels tractaments.



**Figura 20. El KBrO<sub>3</sub> és un potent inductor de 8-oxoG al DNA.** Es van exposar cèl·lules MRC5 salvatges als agents indicats i es van lisar immediatament després del tractament. Posteriorment, es va purificar i digerir amb la nucleasa micrococcal el DNA genòmic per finalment ser analitzat per ELISA. Els gràfics representen la mitjana de 3 experiments independents i les barres d'error la desviació estàndard.

L'experiment es va dur a terme purificant el DNA de cèl·lules salvatges tractades i sense tractar. Posteriorment, el DNA es va digerir amb la nucleasa micrococcal i finalment es va quantificar pel total de 8-oxoG present al DNA mitjançant un assaig ELISA. L'assaig ELISA utilitzat es basa en la identificació de la base oxidada per antigenicitat, de manera que detecta la quantitat de 8-oxoG present a la mostra de

DNA per mitjà de la identificació per anticossos contra 8-oxoG. Com es mostra a la fig.20, el tractament per  $\text{KBrO}_3$  va ser l'inductor més potent de 8-oxoG a dosis equitòxiques respecte la inducció de 8-oxoG al DNA en resposta als tractaments de IR i de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquest experiment comparatiu de tres agents inductors de dany oxidatiu presentat en aquest estudi confirma les hipòtesis prèvies que sustenten que el  $\text{KBrO}_3$  és un molt bon inductor de 8-oxoG al DNA [234]. Comparativament, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  indueix més quantitat de 8-oxoG al DNA després de tractament que no pas la IR. Aquest resultat, situa el tractament amb  $\text{H}_2\text{O}_2$  realitzat a l'estudi com a millor inductor de dany oxidatiu respecte el de IR.

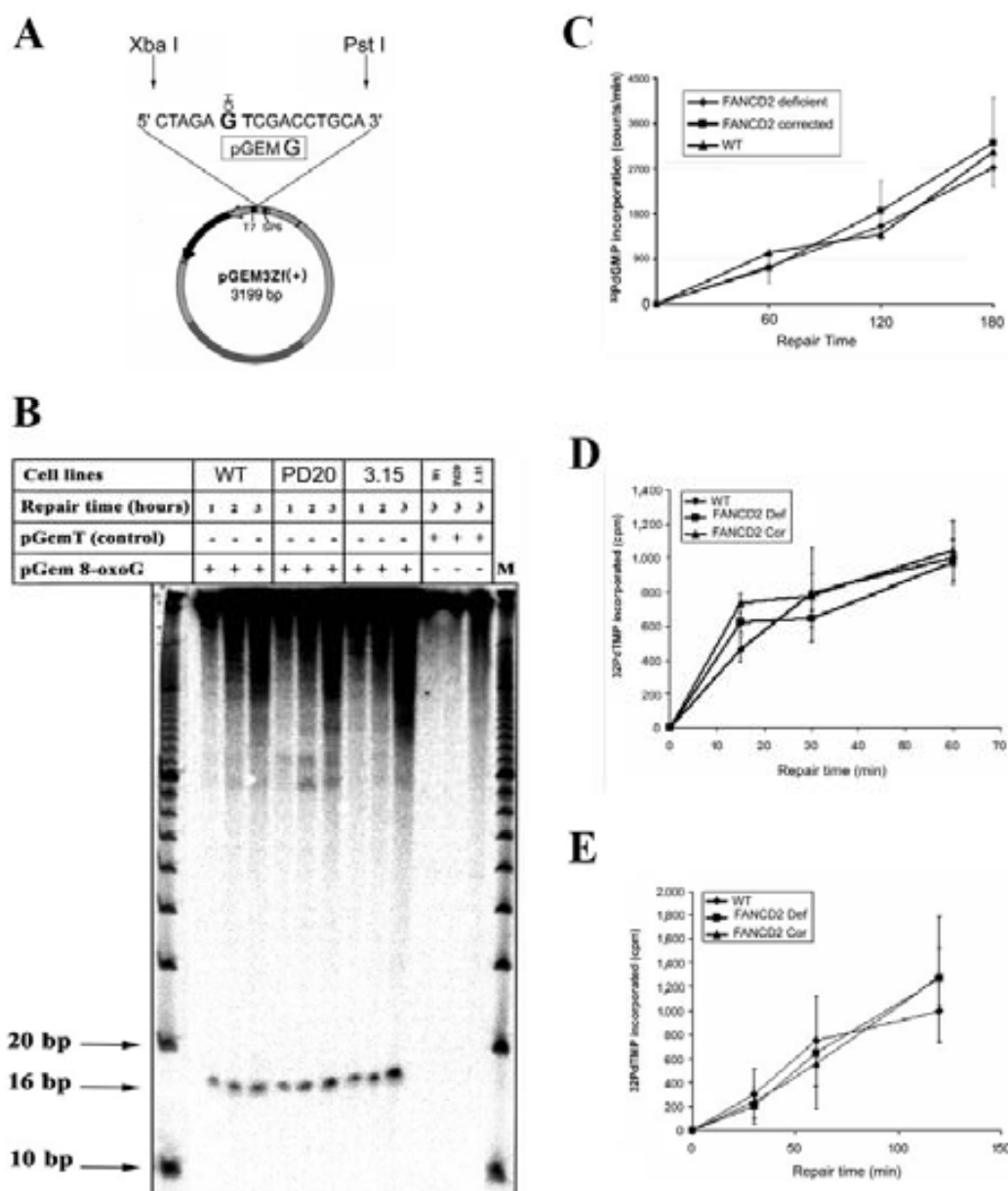
La monoubiquitinació de FANCD2 es va fer evident únicament en resposta als tractaments que indueixen menys 8-oxoG al DNA, els de IR i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Com que la monoubiquitinació de FANCD2 no es va veure afectada després del tractament amb  $\text{KBrO}_3$  (fig.18C), és improbable que la 8-oxoG tingui un paper rellevant en l'activació de la ruta FA/BRCA, coneguda per ser activada per lesions que dificulten la progressió de la forquilla de replicació [93]. Aquests resultats, estant en concordança amb d'altres publicacions que indiquen que la 8-oxoG no dificulta la progressió de les polimerases replicatives de DNA [235].

#### **4.2.4. El sistema de reparació BER és funcionalment eficient en absència de FANCD2 per a la reparació de 8-oxoG**

Per explorar en profunditat el paper de la ruta FA/BRCA en resposta a atacs oxidatius al DNA, es va mesurar la funcionalitat del sistema de reparació BER en cèl·lules FA mitjançant un assaig de BER *in vitro* consolidat i utilitzat en altres publicacions [229]. Es van preparar extractes cel·lulars totals procedents de línies cel·lulars deficientes per FANCD2, corregides i salvatges. Es van incubar quantitats equivalents d'extracte proteic per a cada línia cel·lular analitzada amb quantitats iguals d'un substrat de DNA generat artificialment portador d'una única base 8-oxoG en una posició coneguda i concreta (fig.21A). D'igual manera, els extractes cel·lulars també es van incubar amb un substrat de DNA que contenia una única base d'U o un lloc AP per testar també la capacitat de reparació BER *in vitro* d'aquests dos substrats en la línia deficient per a FANCD2. Es va permetre la reparació del substrat realitzant la incubació durant 1-3 hores en presència del nucleòtid marcat amb fòsfor  $^{32}\text{PdGTP}$  o  $^{32}\text{PdTTP}$ .

Aquest assaig mesura l'activitat del sistema de reparació per BER o el que seria amb altres paraules, la quantitat total de reparació produïda per les rutes de SP-BER i LP-BER [229]. Com a control, es va utilitzar el mateix plasmidi amb la seva seqüència original i per tant, sense cap base danyada. Un cop es va dur a terme la reacció, es van digerir per restricció, purificar i analitzar en gel PAGE desnaturalitzant els productes de reparació obtinguts (fig.21B) seguint el protocol descrit a materials i mètodes. La quantitat de radioactivitat incorporada pels fragments de 16 parells de bases generats per restricció mitjançant els enzims XbaI i PstI, és directament proporcional a l'activitat de reparació dels extractes cel·lulars i és mostrat a la fig.21C. Els extractes de cèl·lules deficientes en FANCD2 són normals en la seva capacitat de reparació del substrat portador d'una única base 8-oxoG així com també en la reparació d'altres bases productes del dany oxidatiu, com l'U (fig.21D) o els llocs AP (fig.21E). Aquestes dades indiquen que la línia cel·lular deficient per FANCD2 és totalment competent en la reparació d'aquestes lesions per BER. En conclusió, la ruta FA/BRCA no és activada per la presència de 8-oxoG al DNA, i tant cèl·lules FA (en dades presentades aquí) com ATM [236] mostren reparació BER normal *in vitro* sent ambdues rutes prescindibles per a la total funcionalitat de la reparació BER.

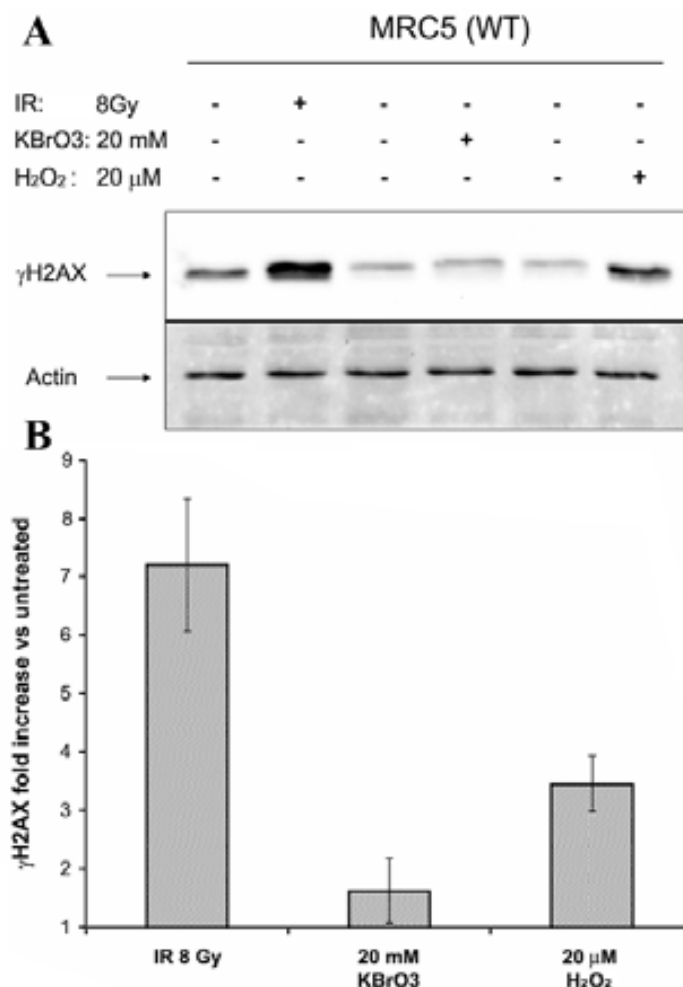




**Figura 21. Les bases oxidatives 8-oxoG, U i llocs AP són reparades eficientment per BER en absència de proteïna FANCD2.** (A) Esquema del plasmidi pGEM utilitzat per testar la funcionalitat de reparació BER que conté un únic lloc danyat i dos llocs de tall pels enzims de restricció XbaI i PstI. En l'esquema es mostra el plasmidi que conté una única base 8-oxoG. (B) Reparació d'un únic lloc 8-oxoG en extractes de línies cel·lulars corresponents a MRC5 (salvatge), PD20 (deficients per FANCD2) i 3.15 (corregides). Es van incubar 300 ng de pGEM contenint 8-oxoG o control amb 40 µg d'extractes cel·lulars als temps indicats. Posteriorment, els plasmidis es van tractar amb les endonucleases de restricció XbaI i PstI per l'anàlisi d'una única inserció nucleotídica i de la ruta de més d'un nucleòtid. Es mostra la quantificació de la incorporació de reparació dels diferents extractes cel·lulars (expressat com a recomptes per minut d'incorporació de  $^{32}\text{PdGMP}/^{32}\text{PdTMP}$ ) a (C) per a 8-oxoG i a (D) i (E) per a U i llocs AP respectivament.

#### **4.2.5. El tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indueix fosforilació de la histona H2AX mentre que el tractament de KBrO<sub>3</sub> és incapaç de fer-ho**

Amb l'objectiu de comprovar la capacitat dels tractaments utilitzats de produir dany al DNA per inducció de DSBs es van realitzar estudis de fosforilació de la histona H2AX.  $\gamma$ H2AX es considera un bon marcador de DSBs com s'ha comentat amb anterioritat. Es va comprovar doncs, la inducció de la fosforilació de la histona H2AX en cèl·lules salvatges tractades amb els tres agents inductors de dany a dosis equitòxiques que, en aquest cas, produeixen una mortalitat del 50% en el nostre assaig de supervivència en cèl·lules salvatges. La resposta cel·lular de fosforilació de H2AX més pronunciada en els tres tractaments utilitzats es va observar després de sotmetre les cèl·lules a 8 Gy de IR (fig.22). Es van observar nivells intermedis de  $\gamma$ H2AX després del tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mentre que pràcticament no es va percebre formació de  $\gamma$ H2AX després de tractament amb KBrO<sub>3</sub> (fig.22). Per tant, a diferència del KBrO<sub>3</sub>, es van visualitzar efectes semblants en resposta a l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i a IR en quan a monoubiquitinació de FANCD2, fosforilació de la histona H2AX i baixa inducció de 8-oxoG al DNA. Aquests resultats suggereixen que els DSBs i no la 8-oxoG són els responsables de l'activació de la ruta FA/BRCA després de tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 22.** La IR i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> però no el KBrO<sub>3</sub> és capaç d'activar la fosforilació de la histona H2AX. (A) Es van revelar amb anticòs contra γH2AX extractes cel·lulars de cèl·lules salvatges MRC5. Les cèl·lules es van tractar a les dosis especificades i es va permetre que es recuperessin durant 1 hora abans de ser lisades. El revelatge amb anticòs contra actina assegura una càrrega equivalent per a tots els carrils. Es van quantificar els nivells de γH2AX per densitometria com es mostra a (B). El gràfic s'expressa en increment de γH2AX respecte els controls no tractats. Es representa la quantificació de les intensitats del *western* com a mitjana de tres experiments independents i la desviació estàndard de la mitjana a les barres d'error.

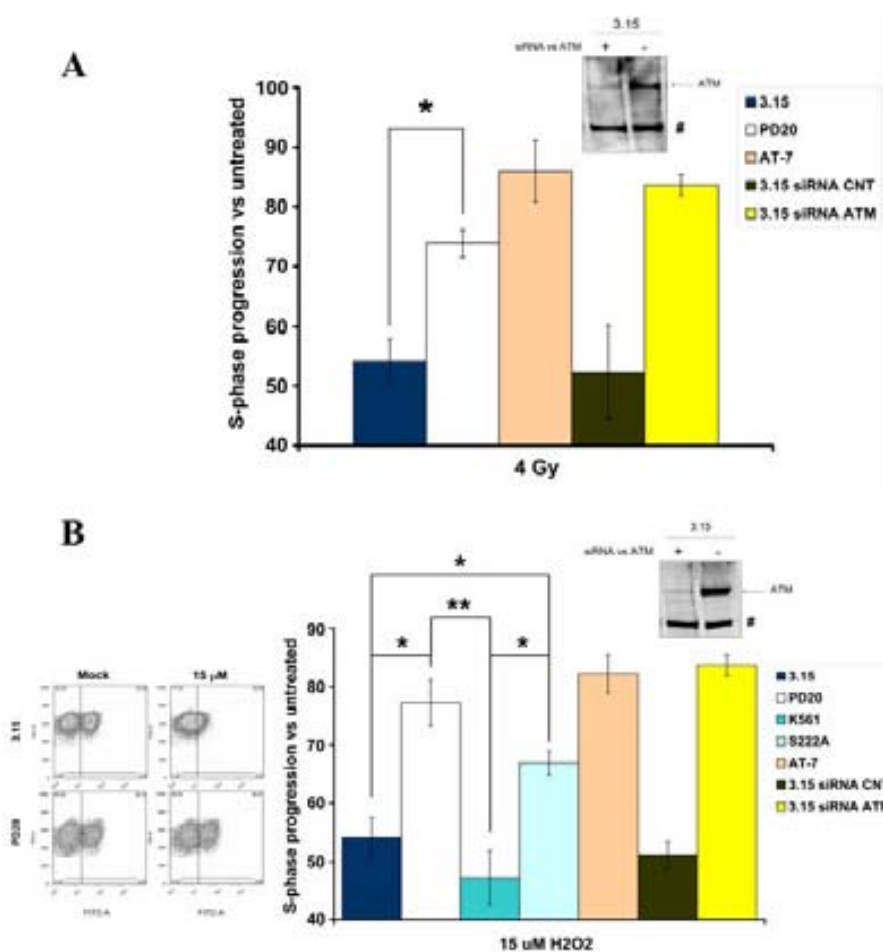
#### 4.2.6. Les línies cel·lulars deficientes per FANCD2 i per ATM tenen afectat el punt de control del cycle cel·lular després de tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En resposta a IR, es requereix que ATM fosforili FANCD2 al residu Ser222 per establir correctament el punt de control del cycle cel·lular en fase S [128]. Com que FANCD2 es va activar per monoubiquitinació al residu K561 en resposta a l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i a IR i ambdós tractaments van induir la fosforilació de H2AX, es va decidir comprovar si el punt de control de fase S del cycle cel·lular després de dany oxidatiu era normal o no.

Per fer-ho es van utilitzar cèl·lules deficientes per FANCD2 (PD20), cèl·lules deficientes per FANCD2 però que expressen la forma mutada al residu 561 de manera que la proteïna és incapaç de ser monoubiquitinada (K561R) i cèl·lules deficientes per FANCD2 que expressen una proteïna FANCD2 mutada al residu 222 de manera que no és fosforilable per ATM (S222A).

Per realitzar l'experiment per comprovar la capacitat de parada del cicle cel·lular de cèl·lules en fase S del cicle en resposta a  $H_2O_2$  es va utilitzar el mètode de progressió de cèl·lules mitjançant marcatge amb EdU. Aquest assaig mesura la capacitat d'incorporació d'EdU, i per tant, de síntesi de DNA en fase S i progressió del cicle cel·lular. Les cèl·lules en cultiu es van tractar amb els diferents agents a analitzar per posteriorment marcar-les durant un període de temps controlat de 10 minuts amb EdU. Les molècules d'EdU estan conjugades a un fluorocrom de manera que un cop es marquen les cèl·lules tractades i no tractades amb un pols d'EdU aquestes són fàcilment analitzades per citometria de flux. Les cèl·lules salvatges no tractades, al no rebre cap estímul de dany al DNA, progressen normalment el seu cicle cel·lular i incorporen EdU en major proporció resultant en una població de cèl·lules amb major fluorescència que les mateixes cèl·lules tractades, que responen al dany induït aturant o disminuint la velocitat del cicle cel·lular (fig.23B panell esquerra). Com és previsible, tant les cèl·lules FA com AT van mostrar una clara síntesi de DNA radioresistent en resposta a 4 Gy de IR (fig.23A i [128]). Aquest fet, confirma que la metodologia emprada en aquest estudi és vàlida per testar l'establiment del punt de control de fase S del cicle cel·lular. Les cèl·lules deficientes per ATM o inhibides per siRNA amb ATM i les deficientes per FANCD2 van mostrar una clara síntesi de DNA resistent després de tractament amb dosis, relativament baixes, de  $15\mu M$  de  $H_2O_2$  (fig.23B). A més, les cèl·lules que expressen la forma mutant K561R de FANCD2 van ser capaces de corregir la deficiència en l'establiment del punt de control del cicle cel·lular de la línia FANCD2 deficient després de tractament amb  $H_2O_2$  (fig.23B). Aquests resultats confirmen que la sola presència de FANCD2 susceptible de ser fosforilable per ATM a la Ser222 és capaç de corregir el defecte en l'establiment del punt de control present en cèl·lules deficientes per FANCD2 després de tractament amb  $H_2O_2$ . Aquest fet es va veure confirmat al tractar cèl·lules deficientes per FANCD2 que expressen la proteïna FANCD2 mutant per la fosforilació al residu Ser222 i es va observar que aquestes van ser incapaces de corregir el defecte en l'establiment del punt de control de fase S. Convé remarcar que aquesta línia cel·lular expressa una proteïna FANCD2 que si que és

monoubiquitable però no fosforilable. Per tant, aquests resultats confirmen amb contundència que la fosforilació de FANCD2 en aquesta posició concreta és crítica en el control del cicle cel·lular en fase S per la correcta resposta cel·lular després del dany oxidatiu induït per  $H_2O_2$ . A més, mostren que la monoubiquitinació de FANCD2 és prescindible per al correcte establiment del punt de control de fase S després en condicions d'estrès oxidatiu induïdes per  $H_2O_2$ . Es demostra també que ATM és imprescindible per al correcte establiment del punt de control de fase S del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de FANCD2 al residu Ser222.



**Figura 23. Anàlisi de síntesi de DNA per citometria de flux després de  $H_2O_2$  i IR.** Es van marcar les cèl·lules amb un pols de 10 minuts amb concentracions de  $10 \mu M$  de 5-Edu al cap de 6 hores de ser tractades amb 4 Gy de IR (A) o  $15 \mu M$  de  $H_2O_2$  (B) respectivament i posteriorment van ser processades amb el kit per assaig de citometria Clic-it Edu Alexa Fluor 488. Es va avaluar la incorporació d'Edu i expressar com a mitjana de fluorescència en línies 3.15 (FANCD2 corregida), PD20 (FANCD2 deficient), AT-7 (deficient per ATM), K561R (PD20 expressant la forma mutant de FANCD2, K561R), S222A (PD20 expressant el mutant de FANCD2 S222A), 3.15 tractada amb siRNA control (3.15 siRNA CNT) i 3.15 tractada amb siRNA contra ATM (3.15 siRNA ATM) i expressat en gràfic com a percentatge de la mitjana de fluorescència respecte a la seva pròpia línia no tractada. Les dades són representatives de 5 experiments independents. Un asterisc \* indica un valor P menor de 0,05 en test T-student i doble asterisc \*\* un valor P inferior a 0,01. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana. Es van examinar els extractes cel·lulars de la línia 3.15 per expressió de proteïna ATM mitjançant anticòs després del tractament de les cèl·lules amb siRNA. (#) indica banda inespecífica utilitzada com a control de càrrega.

### **4.3. PCNA respon a dany oxidatiu monoubiquitinant-se i reclutant DNA polu**

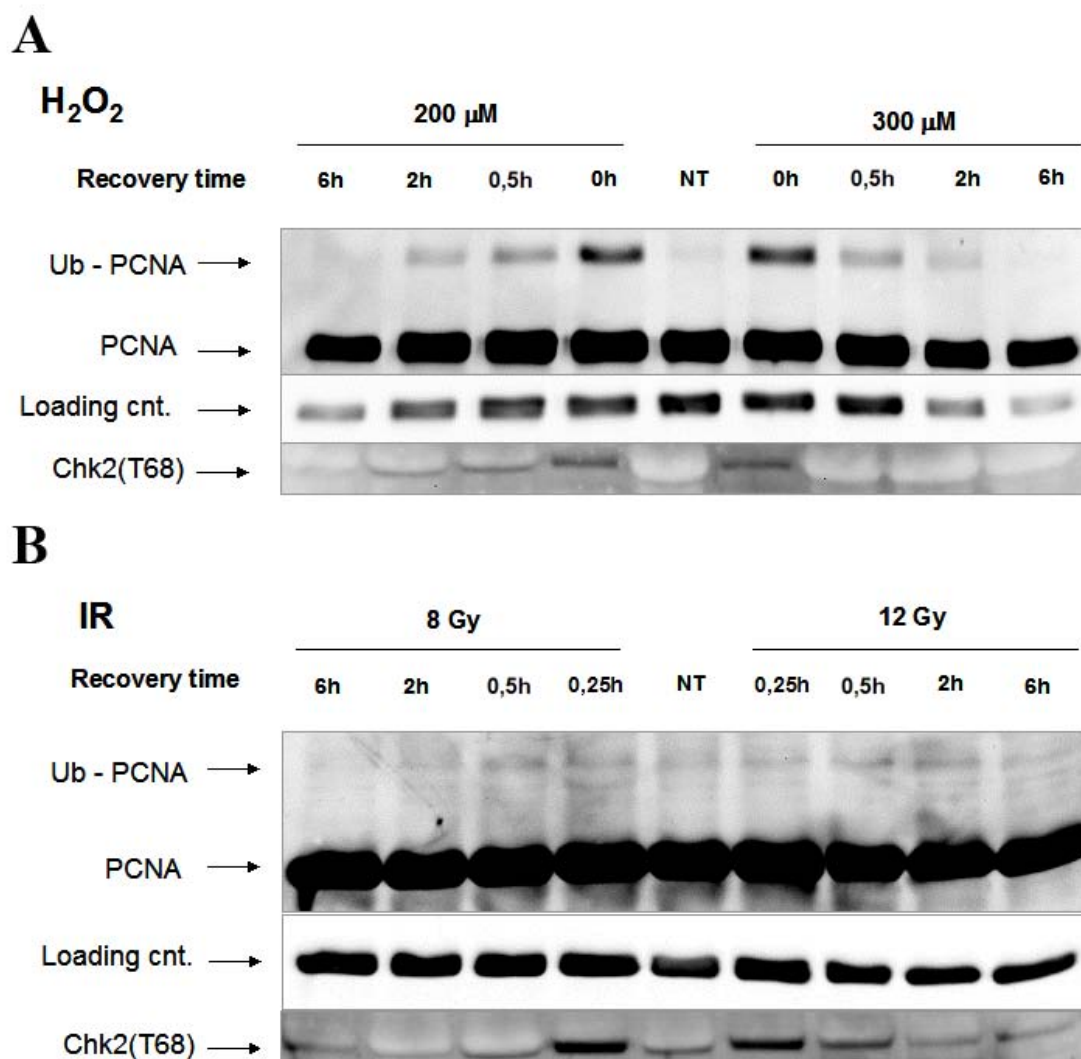
Les proteïnes FANCD2 i PCNA realitzen funcions de reparació en fase replicativa de DNA, són regulades post-traduccionament per monoubiquitinació i comparteixen el mateix enzim de deubiquitinació USP1 [96, 97]. A més, recentment s'ha descrit una funció clau per a la lligasa d'ubiquitina de PCNA, RAD18 en la localització a cromatina de FANCD2 i FANCI [99]. Totes aquestes dades prèvies relacionen clarament les dues proteïnes en la reparació de lesions bloquejants del DNA. D'aquesta manera, ens varem plantejar en el nostre estudi explorar una ruta de reparació comuna entre les dues vies de reparació. Inicialment, es va buscar una resposta comuna a agents inductors de dany oxidatiu. Les lesions de bases oxidades són reparades principalment pels mecanismes de reparació de SP i LP-BER, BER post-replicatiu i MMR. En pràcticament tots els casos intervén la proteïna PCNA per a la correcta reparació del dany. El paper de les proteïnes FA en la resposta al dany oxidatiu però resta inexplorat tot i que es coneix que d'alguna manera o altre estant relacionades amb l'estrès oxidatiu ja que les cèl·lules de FA presenten nivells elevats de 8-oxoG al DNA [151].

Les dades obtingudes al nostre treball van descartar una ruta comuna de resposta a dany oxidatiu de les dues proteïnes. Mentre que FANCD2 respon principalment a DSBs induïts per tractaments oxidatius i intervén en el control del cicle cel·lular com s'ha mostrat en aquest primer apartat de resultats, PCNA es va veure involucrat en la reparació del dany oxidatiu *per se*. Aquestes noves dades de l'estudi de PCNA en resposta a dany oxidatiu es presenten en aquest segon apartat del treball i descriuen una nova ruta de reparació del dany independent de la funcionalitat de la ruta FA/BRCA.

#### **4.3.1. PCNA és monoubiquitinat després de tractaments inductors de dany oxidatiu**

Per valorar la resposta de PCNA en condicions d'estrès oxidatiu es va utilitzar una metodologia semblant a la usada prèviament per testar la resposta de FANCD2. Primerament, i com en el cas anterior, es va explorar si PCNA es modificava post-traduccionament en resposta als tractaments amb els agents inductors de dany oxidatiu

utilitzats prèviament: el  $H_2O_2$  i l'efecte de la IR. Per fer-ho, es va utilitzar l'anàlisi per *western blot* com a estratègia d'aproximació. Es van tractar cèl·lules de fibroblast transformades MRC5 a dosis elevades de  $H_2O_2$  i IR. Com en el cas anterior, es va permetre que les cèl·lules es recuperessin durant els temps indicats després del tractament amb medi fresc abans de ser lisades. Finalment, els extractes cel·lulars es van carregar en gel d'electroforesi per a l'anàlisi. L'exposició a IR no va ser capaç d'activar a cap dels temps indicats la monoubiquitinació de PCNA (fig.24B). Aquests resultats estant en concordança amb d'altres ja descrits prèviament que indiquen que PCNA no es monoubiquitina en resposta a agents inductors de DSBs tals com la bleomicina [187]. Sorprenentment però, es va induir la monoubiquitinació de PCNA a l'exposar les cèl·lules a  $H_2O_2$  (fig.24A). A més, es van observar els nivells màxims d'activació per monoubiquitinació just immediatament després del tractament. La monoubiquitinació de PCNA va ser ràpidament reduïda a partir de les 2 hores post-tractament a nivells basals. Així doncs, l'activació de PCNA és independent dels DSBs generats per l' $H_2O_2$  i més plausiblement depèn del propi dany oxidatiu. D'aquesta manera el present treball presentat aquí descriu per primera vegada l'activació de PCNA per monoubiquitinació en resposta a dany oxidatiu amb una cinètica d'activació molt ràpida just després del tractament i una recuperació dels nivells basals poques hores després. Per tal de d'assegurar que els tractaments de  $H_2O_2$  i IR utilitzats són capaços de generar una resposta cel·lular al dany induït es van revelar els *westerns blot* de la fig.24 per la fosforilació de la proteïna de control del cicle cel·lular Chk2. Chk2 és una cinasa que es fosforila en resposta a DSBs al residu T68 per la cinasa de control de cicle cel·lular i resposta al dany ATM. La fosforilació de Chk2 és doncs un control positiu de resposta cel·lular al dany induït per ambdós tractaments. Aquesta proteïna ha estat àmpliament estudiada i usada prèviament en d'altres estudis [237] amb la mateixa finalitat amb que s'utilitza a l'estudi presentat aquí.



**Figura 24. PCNA és activat ràpidament per monoubiquitinació en resposta a tractaments oxidatius induïts per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mentre que no ho fa després de IR.** Es van tractar cèl·lules MRC5 salvatges amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) i IR (B) a les dosis especificades i es va permetre que es recuperessin amb medi fresc durant els temps indicats abans de procedir a la lisi. Els extractes es van carregar en gel d'electroforesi i es van revelar amb anticòs contra PCNA. Es va utilitzar el revelatge de PCNA a poca exposició com a control de càrrega (loading cnt.). Es va revelar la membrana amb anticòs contra la forma fosforilada de Chk2 a T68 com a control de dany i resposta cel·lular per a cada tractament.

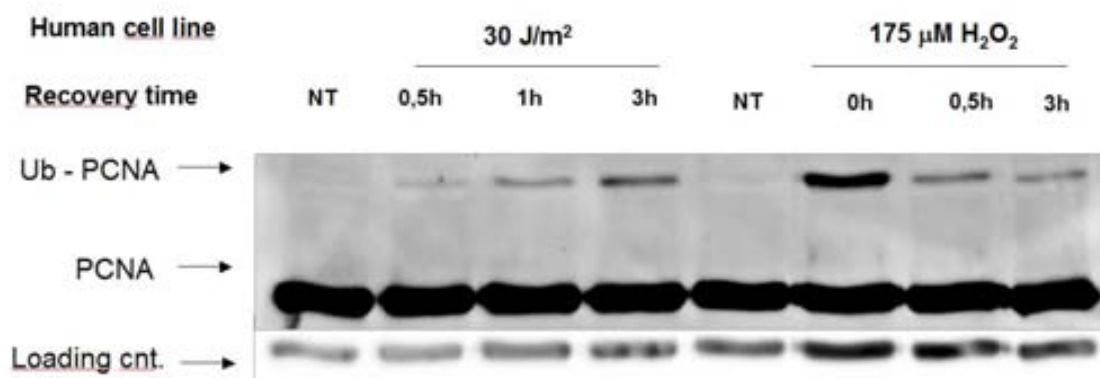
#### 4.3.2. La cinètica d'activació de PCNA per monoubiquitinació després de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és diferent a la coneguda activació després de radiació UV

Per caracteritzar la cinètica de monoubiquitinació de PCNA observada després de tractaments amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es va comparar la seva activació amb la cinètica d'activació coneguda després de tractament amb radiació UV. Altres estudis previs han demostrat que la radiació UV genera lesions bloquejants al DNA tals com els CPDs i els 6,4-PP [187] i que aquest tipus de lesions són les que provoquen la monoubiquitinació de PCNA. Com s'observa a la fig.25, l'activació de PCNA per monoubiquitinació després



de tractament amb  $H_2O_2$  segueix una cinètica totalment diferent a la observada després de UV. PCNA es monoubiquitina després del tractament amb UV assolint els nivells màxims d'activació entre les 6 i les 24 hores post-tractament [97]. En l'experiment de la fig.25, ens hem centrat en l'activació a temps curts i s'observa com la monoubiquitinació de PCNA després de UV es va fent progressivament més evident a mesura que el temps post-tractament incrementa. La resposta de monoubiquitinació de PCNA a  $H_2O_2$  és, per contra, ràpida i curta assolint els nivells màxims just després del tractament i tendint a disminuir a temps llargs post-tractament a mesura que les cèl·lules es recuperen amb medi fresc.

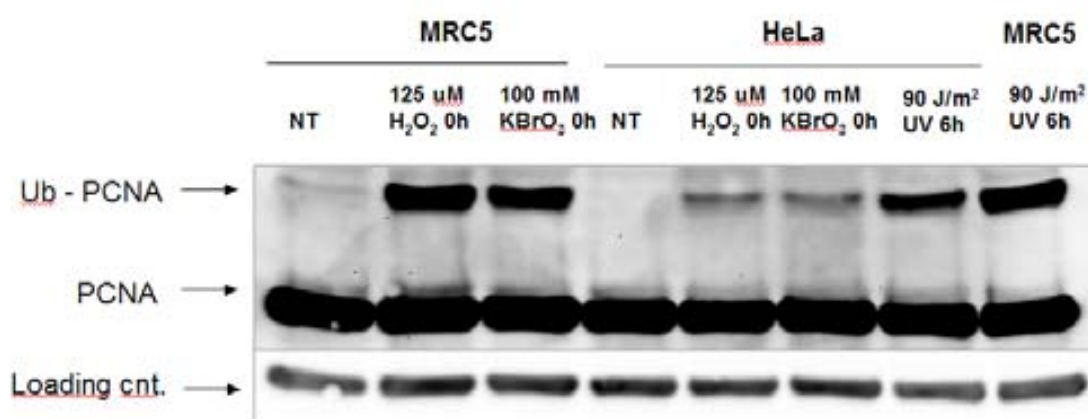
Així doncs, després de tractament amb UV, PCNA s'activa per monoubiquitinació quan les forquilles de replicació troben el dany, la maquinària de replicació es bloqueja i es realitza el canvi de la polimerasa replicativa per polimerases específiques de dany per realitzar TLS lliure d'errors [213]. La resposta observada després de  $H_2O_2$ , per contra, sembla afectar únicament les cèl·lules tractades en fase replicativa sense prolongar-se en el temps amb l'acumulació de forquilles bloquejades per les lesions induïdes per ROS.



**Figura 25. PCNA s'activa per monoubiquitinació després de dany oxidatiu amb una cinètica ràpida a diferència de la coneguda activació de PCNA després de radiació UV.** Es van tractar cèl·lules MRC5 salvatges a les dosis indicades amb UV i  $H_2O_2$  i es va permetre que es recuperessin pels temps indicats. Els extractes cel·lulars totals generats es van córrer en gel d'electroforesi i es van revelar amb anticòs contra PCNA. Es van utilitzar baixes exposicions de PCNA per assegurar una càrrega semblant per a cada carril (loading cnt.). Els carrils NT corresponen a extractes procedents de cèl·lules MRC5 no tractades.

### 4.3.3. PCNA s'activa per monoubiquitinació després de tractament amb $\text{KBrO}_3$

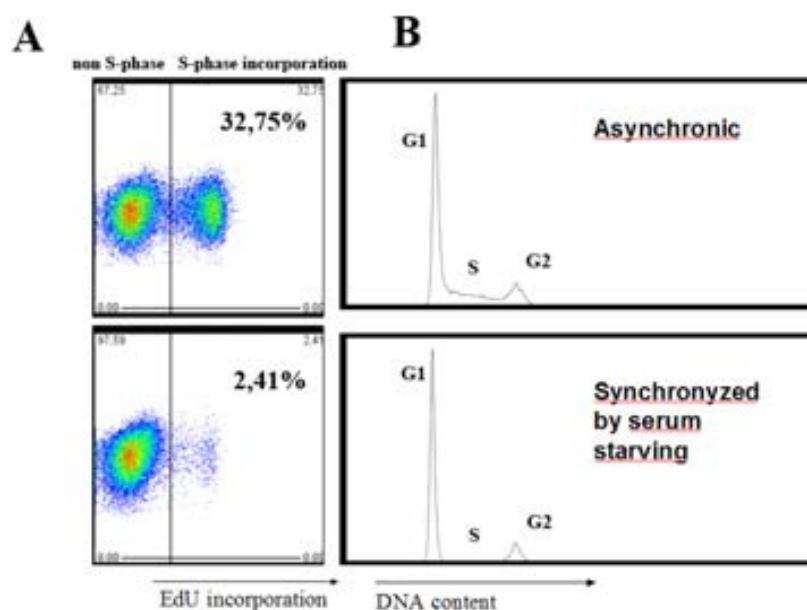
Per confirmar els resultats de monoubiquitinació de PCNA després del tractament per  $\text{H}_2\text{O}_2$  es van tractar les cèl·lules MRC5 amb un altre agent inductor de dany oxidatiu, el  $\text{KBrO}_3$ . A més, es va decidir utilitzar una nova línia cel·lular immortal humana d'ús habitual al laboratori, la HeLa, per confirmar els resultats obtinguts en quant a activació de PCNA en MRC5 i evitar fluctuacions degudes a la línia cel·lular utilitzada. Es van reproduir els resultats observats d'activació de PCNA per monoubiquitinació a temps curts després del tractament amb ambdós agents i ambdues línies cel·lulars com es mostra a la fig.26. Aquest fet ens permet descartar una activació inespecífica de PCNA degut a defectes de la línia cel·lular emprada inicialment per a l'estudi. A més, la monoubiquitinació de PCNA en ambdues línies cel·lulars es va observar després del tractament amb  $\text{KBrO}_3$  amb una cinètica semblant a la observada per  $\text{H}_2\text{O}_2$  descartant un efecte no específic del tractament per  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquestes dades suggereixen clarament que l'activació de PCNA per monoubiquitinació està regulada i es produeix de manera ràpida en resposta a dany oxidatiu. Els resultats mostrats a la fig.26, mostren una activació diferencial de PCNA d'una línia respecte l'altre en resposta als tractaments. Aquest fet pot ser explicat degut a diferències en el ritme de proliferació entre les línies o diferències intrínseques de les línies.



**Figura 26. PCNA es monoubiquitina en resposta a tractaments amb  $\text{KBrO}_3$  i a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Es van carregar en gel d'electroforesi extractes cel·lulars totals procedents de les línies cel·lulars salvatges MRC5 i HeLa tractades a les dosis indicades de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{KBrO}_3$  i UV. La membrana es va revelar amb anticòs contra PCNA. Es van utilitzar baixes exposicions de PCNA per assegurar una càrrega semblant per a cada carril (loading cnt.). NT representa el conjunt de cèl·lules no tractades per a cap agent inductor de dany.

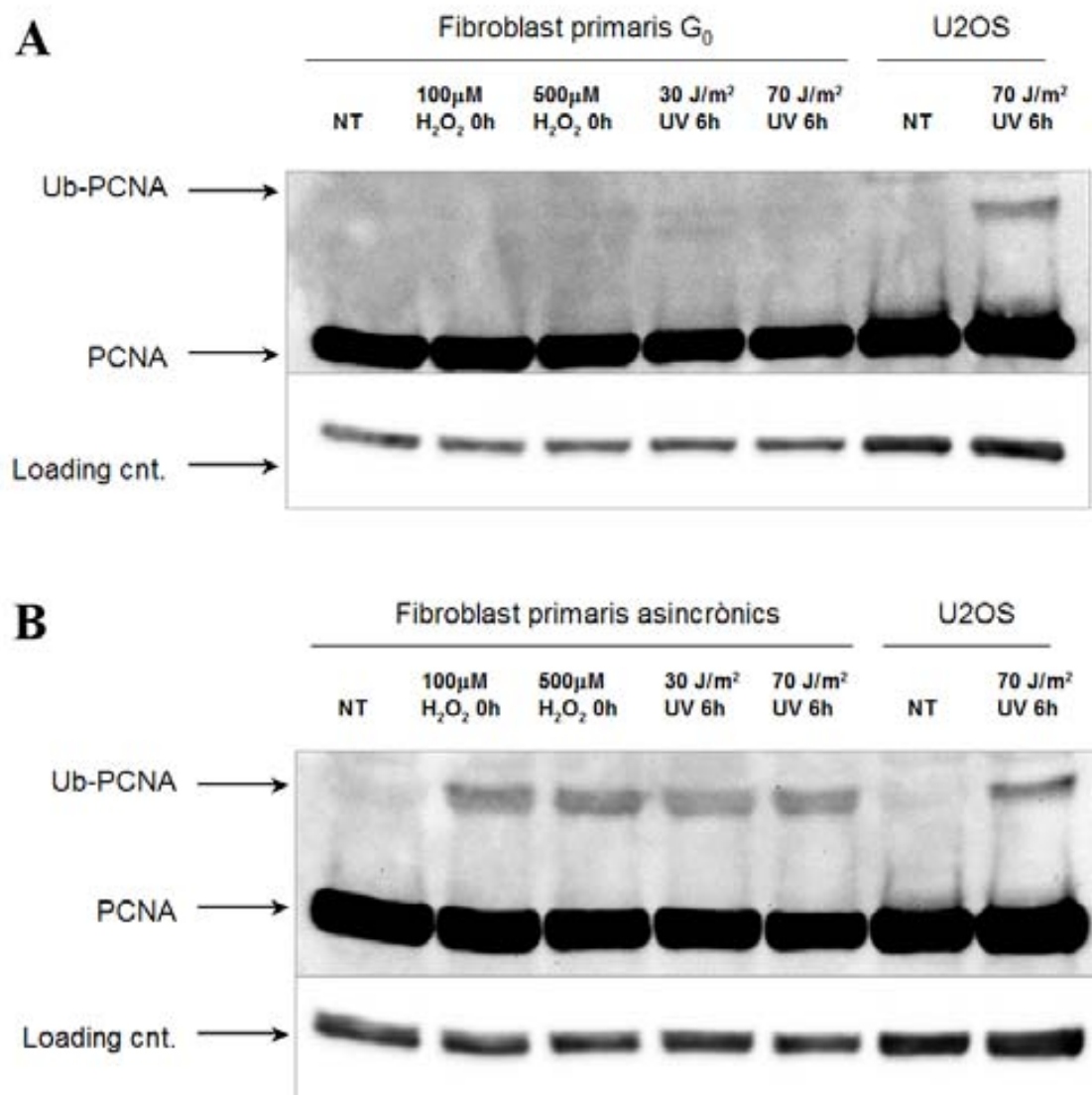
#### 4.3.4. La monoubiquitinació de PCNA després de dany oxidatiu depèn de replicació del DNA

PCNA és essencial en els processos de replicació i reparació en fase S del cicle cel·lular. Es pretén doncs, elucidar si després del tractament amb dany oxidatiu segueix realitzant funcions lligades a replicació o si, per contra, la seva funció està desvinculada i és independent de la fase S del cicle cel·lular. Per comprovar-ho es van sincronitzar cèl·lules primàries en fase G<sub>0</sub> o no replicativa del cicle cel·lular mitjançant privació de sèrum i es van tractar amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La línia cel·lular de fibroblasts primaris utilitzada en l'estudi procedeix d'un donant humà de 5 anys d'edat i la sincronització es va realitzar cultivant les cèl·lules a confluència com s'indica a l'apartat de materials i mètodes. La sincronització es va comprovar a través de dos mètodes d'anàlisi diferents mitjançant citometria de flux. Primerament es va tindre el DNA de les cèl·lules sincronitzades amb PI i es va analitzar per citometria la quantitat de fluorescència observada (fig.27A). Paral·lelament, una part de la població es va incubar amb un pols de EdU per valorar la capacitat de síntesi de DNA de les cèl·lules en cultiu (fig.27B). D'aquesta manera i utilitzant dos mètodes diferents d'anàlisi de la progressió cel·lular s'assegura la fiabilitat de la sincronització duta a terme en cèl·lules primàries. S'inclou també una població control de cèl·lules primàries asincròniques.



**Figura 27.** Es van cultivar a confluència durant una setmana o al 50% de confluència cèl·lules primàries de fibroblast humà. Posteriorment es van marcar amb un pols de 30 minuts a concentracions de 10 $\mu$ M de 5-EdU i es van processar per citometria de flux mitjançant el kit Click-it EdU Alexa Fluor 488 (A) o per tinció amb PI per anàlisi del cicle cel·lular (B).

El tractament amb  $H_2O_2$  indueix monoubiquitinació de PCNA en cèl·lules procedents de cultius asincrònics mentre que és incapaç de induir cap tipus de resposta d'activació de PCNA en cèl·lules en fase no replicativa de DNA (fig.28). Es va incloure per cada *western blot* presentat un control positiu d'activació de PCNA, en aquest cas, es van tractar cèl·lules transformades de la línia salvatge U2OS sense sincronitzar amb radiació UV i es van lisar 6 hores després del tractament per assegurar que durant l'experiment som capaços d'identificar la banda corresponent a PCNA monoubiquitinat. Els resultats mostrats suggereixen doncs una acció de reparació semblant a TLS per a PCNA monoubiquitinat dependent de síntesi de DNA en resposta a dany oxidatiu. Les cèl·lules primàries sincronitzades i sense sincronitzar també es van tractar amb radiació UV a mode de control de sincronització. És conegut que PCNA es monoubiquitina en resposta a radiació UV únicament en fase S o replicativa del cicle cel·lular. D'aquesta manera, es confirma per un tercer mètode la fiabilitat de la sincronització al observar com PCNA es monoubiquitina en resposta a radiació UV únicament en cèl·lules procedents de cultius asincrònics però no en cultius sincronitzats en  $G_0$  (comparar carrils 4-5 de la fig.28A i B). Aquest resultat mostra també la capacitat de resposta a dany oxidatiu, mitjançant la monoubiquitinació de PCNA, d'una línia cel·lular humana primària amb cinètiques molt semblants respecte les observades en les dues línies anteriors immortalitzades. En conjunt, el resultat presentat a la fig.28 confirma l'activació de PCNA per monoubiquitinació en resposta a dany oxidatiu en fase S del cicle cel·lular en una nova línia cel·lular humana, amb el valor afegit de ser una línia primària i fisiològicament més semblant a les cèl·lules de l'organisme.

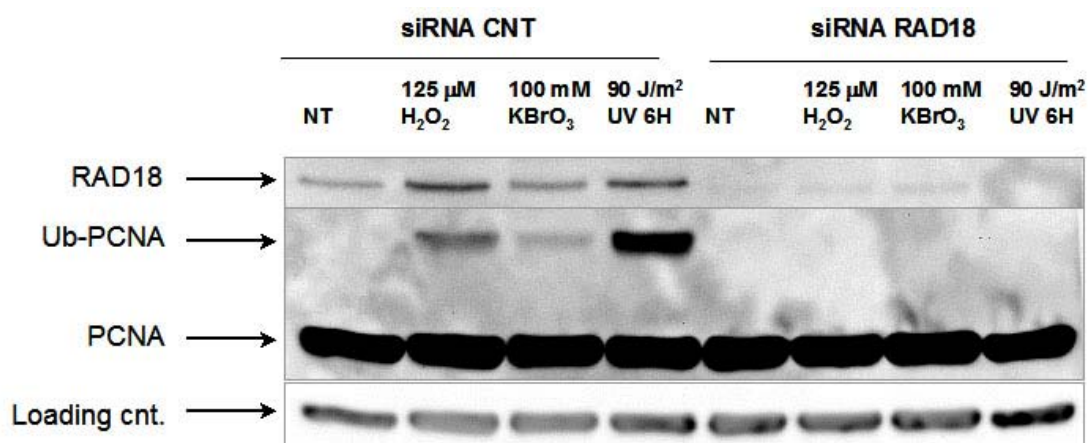


**Figura 28. La monoubiquitinació de PCNA en resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és depenent de replicació.** Cèl·lules primàries sincronitzades en fase S (A) i asincròniques (B) es van tractar a les dosis indicades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i UV i es van lisar als temps indicats. Els extractes cel·lulars generats es van carregar posteriorment en gel i la membrana es va revelar amb anticòs contra PCNA. Es van utilitzar baixes exposicions de PCNA com a control de càrrega.

#### 4.3.5. La monoubiquitinació de PCNA després de dany oxidatiu depèn de RAD18

Després de tractament amb radiació UV, la monoubiquitinació de PCNA depèn del complex de conjugació - lligació d'ubiquitina E2-E3, RAD6 - RAD18 [180]. Amb l'objectiu de caracteritzar la monoubiquitinació de PCNA després de dany oxidatiu es va investigar la responsabilitat del complex E2-E3 en la ubiquitinació de PCNA. Per

fer-ho, es va interferir de manera específica l'expressió de la proteïna RAD18 en cèl·lules MRC5 salvatges mitjançant la tècnica d'interferència per petits RNA (siRNA). Així doncs, es van tractar cèl·lules MRC5 interferides amb siRNA contra la lligasa E3 RAD18 a les dosis indicades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KBrO<sub>3</sub>. A més, les cèl·lules inhibides també es van tractar amb radiació UV a mode de control positiu de l'experiment per assegurar que la interferència per siRNA de RAD18 és capaç d'inhibir la monoubiquitinació de PCNA com ha estat descrit en altres treballs. Els resultats presentats a la fig.29 indiquen que la inhibició de RAD18 és capaç de revocar l'activació de PCNA per monoubiquitinació després de tractaments oxidatius induïts per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KBrO<sub>3</sub>. Aquests resultats suggereixen doncs que l'activació per monoubiquitinació depèn del complex d'ubiquitinació RAD6-RAD18 en resposta a dany oxidatiu.

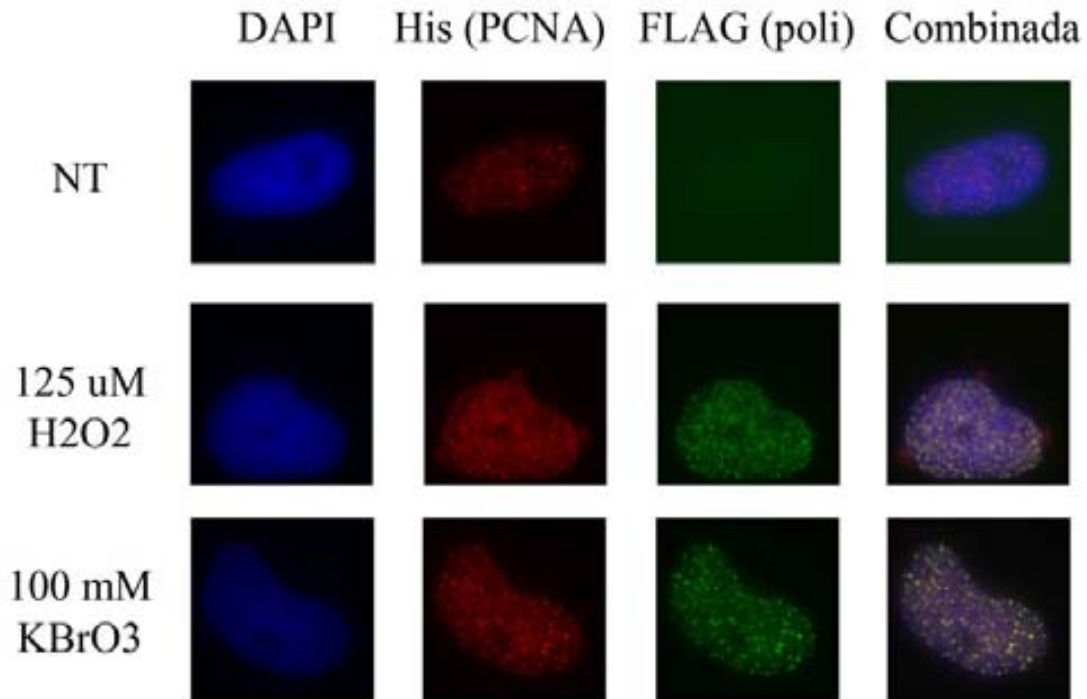


**Figura 29. La monoubiquitinació de PCNA després de dany oxidatiu depèn de la lligasa d'ubiquitina RAD18.** Es van inhibir cèl·lules MRC5 amb siRNA de RAD18 i control (CNT). 72 hores després de la segona inhibició, es van tractar les cèl·lules amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub> i UV als temps indicats. Els extractes cel·lulars generats es van carregar en gel d'electroforesi i la membrana es va revelar amb anticòs contra RAD18 i amb anticòs contra PCNA. Es van utilitzar baixes exposicions de PCNA per assegurar una càrrega homogènia en tots els carrils. NT indica cèl·lules no tractades per cap dels agents inductors de dany.

#### 4.3.6. La polimerasa de TLS polt colocalitza i forma foci amb PCNA després de tractaments inductors de dany oxidatiu

Tal i com s'ha estat caracteritzant fins ara, hem observat que el tractament per dany oxidatiu dóna lloc a una resposta de PCNA d'activació per TLS dependent de RAD18 i de fase S del cicle cel·lular. Amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi de la funció de PCNA en resposta a dany oxidatiu, es va reconèixer quina o quines polimerases estant involucrades en TLS en condicions d'estrès oxidatiu. Dades prèvies

postulen que la polimerasa de TLS DNA polt és una bona candidata a desenvolupar TLS després dels tractaments amb  $H_2O_2$  i  $KBrO_3$  emprats en aquest estudi: les línies deficientes per DNA polt són sensibles a  $H_2O_2$  [219] i DNA polt és capaç de sintetitzar sobre lesions oxidatives incloent U [225] i els llocs AP [238]. A més, com totes les polimerases de TLS de la família Y, DNA polt interacciona amb PCNA monoubiquitinat [239]. S'explora doncs la capacitat de PCNA de formar foci conjuntament amb DNA polt després de tractament amb els agents inductors de dany oxidatiu utilitzats. Per fer-ho es va utilitzar la tècnica de IF que ens permet visualitzar la localització de les proteïnes *in vivo* mitjançant anticossos. Com que els anticossos de DNA polt comercials utilitzats són incapaços de reconèixer la localització de la proteïna endògena mitjançant la tècnica de IF, es van utilitzar plasmidis de sobreexpressió de DNA polt i PCNA lligats a una etiqueta FLAG i His respectivament. L'etiqueta és un epítop de reconeixement per anticossos específics que ens permet identificar fàcilment per IF la localització de les proteïnes sobreexpressades. Així doncs, els constructes plasmidis FLAG-DNA polt i His-PCNA es van coexpressar en cèl·lules MRC5 per facilitar la visualització de les proteïnes per IF. Per millorar la qualitat de la IF i facilitar la observació dels foci es van eliminar totes les proteïnes no unides a DNA modificant lleugerament el protocol de IF. Abans de la fixació, es va realitzar un pas de pre-extracció mitjançant incubació amb solució de tritó per retirar totes les proteïnes solubles de la mostra. Per a la quantificació de l'eficiència de la transfecció dels plasmidis utilitzats dins les cèl·lules, no es va realitzar el pas de pre-extracció per un parell de preparacions per a cada experiment. D'aquesta manera es va permetre valorar el tant per cent de cèl·lules transfectades respecte el total i estandarditzar-lo amb el de cèl·lules en foci. Com s'observa a la fig.30, es visualitzen foci de PCNA tant després de tractaments amb agents inductors de dany oxidatiu com en cèl·lules no tractades, tot i que clarament els primers són més intensos. Per contra, els foci de DNA polt només es visualitzen després de tractaments amb agents inductors de dany oxidatiu colocalitzant amb els de PCNA. Aquest resultat indica que DNA polt es soluble a la mostra en condicions basals i no s'uneix a DNA mentre que si que ho fa en resposta a tractaments amb agents inductors de dany oxidatiu.

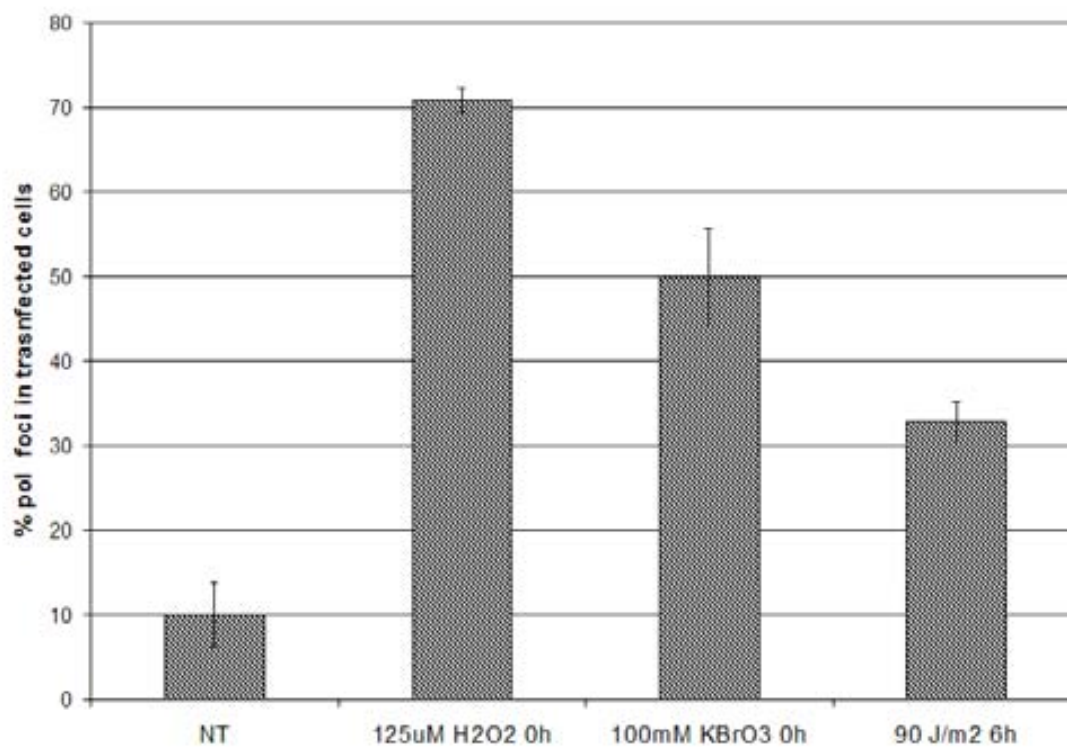


**Figura 30. PCNA i DNA polt colocalitzen en foci després de tractaments amb agents inductors de dany oxidatiu.** Es van transfectar cèl·lules MRC5 amb els plasmidis His-PCNA i FLAG-DNApoli. 48 hores després, es van tractar amb agents inductors de dany oxidatiu i es van processar per IF amb pre-extracció just després dels tractaments indicats.

En el recompte, es van comptabilitzar els foci de DNA polt per a cada preparació. Es van prendre com a positives cèl·lules amb més de 5 foci de DNA polt, mentre que les negatives representen cèl·lules amb menys de 5 foci. El recompte es va realitzar codificant les mostres per a cada experiment de manera que l'experimentador desconexia les mostres que estava comptant. Com s'observa al gràfic de la fig.31, la unió de DNA polt al DNA depèn de la presència de dany sent, en condicions basals o d'absència de tractament, pràcticament inexistent. En resposta a tractaments amb agents inductors de dany oxidatiu es va observar un clar increment en la formació de foci de DNA polt. Els foci observats són considerats possibles punts de reparació per TLS en llocs on les forquilles de replicació han estat bloquejades per les lesions oxidatives induïdes. La formació de foci de DNA polt en resposta a tractaments inductors de dany oxidatiu, tant de KBrO<sub>3</sub> com sobretot de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, és molt evident mentre que la formació de foci 6 hores post-tractament després de dosis de 90 J/m<sup>2</sup> de radiació UV es va induir en menor mesura. Aquest fet ens porta a concloure que el reclutament de DNA polt al DNA és específicament induït per lesions oxidatives amb l'objectiu de realitzar TLS.



Així doncs, el nostre treball porta a concloure una funció clau i coordinada amb la monoubiquitinació de PCNA per a la fins ara força desconeguda polimerasa de TLS DNA polt en resposta a lesions oxidatives.



**Figura 31. Quantificació dels foci de DNA polt després dels tractaments amb els agents inductors de dany indicats.** Es van transfectar cèl·lules MRC5 amb els plasmidis His-PCNA i FLAG-DNA<sub>polt</sub>. Posteriorment es van tractar amb agents inductors de dany oxidatiu, es van fixar i es van processar per IF als temps indicats. Es va expressar la quantificació de foci de DNA polt al gràfic en que es van comptabilitzar de manera codificada com a cèl·lules positives les que presentaven més de 5 foci. Es representen tres experiments independents i les barres d'error representen la desviació estàndard.





## **5. Discussió**

---



## 5. Discussió

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  és el producte secundari més abundant del mecanisme de fosforilació oxidativa que les cèl·lules eucariotes utilitzen per produir l'energia necessària per viure en forma d'ATP. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  genera formes actives de radicals hidroxils a través de les reaccions Fenton i és el responsable principal de la majoria de dany oxidatiu que pateixen els sistemes biològics al llarg de la seva vida [240]. La seva capacitat de difusió a través de les membranes cel·lulars el fa potencialment perillós a malmetre la informació genètica embolcallada al nucli i imprescindible pel correcte funcionament de la cèl·lula [15]. Els radicals d'oxigen poden atacar el DNA, tant a les bases nitrogenades com als sucres, donant lloc a una amplitud de productes danyints tals com les bases oxidades, la pèrdua de bases i els trencaments de cadena [240]. En el present estudi s'ha estudiat amb profunditat l'efecte del principal ROS endogen, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en cultius biològics eucariotes en placa intentant emprar dosis subtòxiques de l'agent. Es focalitza l'interès en els mecanismes i sistemes de reparació del dany generat en fase replicativa del cicle cel·lular. En fase replicativa, el DNA és especialment sensible a agressions ja que ha de replicar-se correctament i transmetre la informació genètica a la descendència. Per tant, estudiar els mecanismes de reparació del dany en fase S del cicle cel·lular és clau per entendre nombrosos processos biològics, entre ells el càncer o la mort de cèl·lules mare, com ara les hematopoètiques.

El present estudi es divideix en tres parts sent la primera de totes una aproximació a les tècniques de biologia molecular necessàries pel posterior anàlisi de FA a baixes dosis de IR. La segona part està centrada en l'estudi de la ruta FA/BRCA i la seva relació amb ATM en resposta a reparació de bases oxidades, de control del cicle cel·lular i de sensibilitat a dany oxidatiu. La tercera i última part, centra el seu interès en el paper que desenvolupa PCNA en resposta a dany oxidatiu i com aquesta proteïna s'activa i recluta les polimerases específiques de tolerància al dany per descriure una nova ruta activada en condicions d'estrès oxidatiu i desconeguda fins l'actualitat.

La correcte reparació del dany induït per IR, bàsicament DSBs, és un component crític per assegurar la supervivència cel·lular i evitar processos de tumorigènesi. Es coneguda l'alta perillositat de la IR en individus exposats a altes dosis, el que no és tant conegut és si l'efecte prolongat a petites dosis de IR pot arribar a ser perjudicial per la salut humana. En el present treball s'explora si molt baixes dosis de IR són capaces

d'activar resposta cel·lular al dany. Certs col·lectius de treballadors poden estar potencialment exposats a baixes dosis de IR; entre ells destaquen els pilots d'avions i els assistents de vol que estant sotmesos a exposicions baixes però cròniques procedents de fonts naturals com ara els raigs còsmics. Un altre col·lectiu potencialment exposat a baixes dosis de IR són els treballadors de les centrals nuclears entre molts d'altres. Per tots aquests individus exposats és molt important reconèixer si existeix o no una dosi segura a la qual no s'indueix dany genètic al DNA i, per tant, puguin ser exposats sense cap perill per a les dosis exposades.

Per comprovar l'existència d'una dosi llindar per sota de la qual no s'indueixi dany genètic es va utilitzar una línia cel·lular d'un donant infantil i es va tractar a molt baixes dosis de IR. El nostre estudi, se centra en l'activació de la ruta de reparació en fase S del cicle cel·lular, FA/BRCA. Es considera que la ruta s'activa quan la proteïna central, FANCD2, és capaç de monoubiquitinar-se i acumular-se en foci de reparació juntament amb altres proteïnes involucrades en la senyalització i reparació del dany. Es pren com a marcador de dany la forma fosforilada de H2AX. L'estudi valora la capacitat de resposta de cèl·lules primàries a baixes dosis de IR en fase S del cicle cel·lular. Les cèl·lules primàries són capaces d'activar tots els punts de control del cicle i, per tant, són més fidedignes en la seva capacitat de resposta al dany que cèl·lules transformades que poden acumular fàcilment mutacions i descontrolar la regulació del cicle cel·lular. En fase replicativa, el DNA es troba en constitució més laxa per permetre la còpia i és més accessible de manera que s'incrementa la probabilitat de fixar mutacions al DNA. L'estudi de la resposta a IR basat en la ruta FA/BRCA ens permet doncs testar de manera específica la capacitat de resposta al dany en cèl·lules on és potencialment més perillosa la fixació de mutacions. A més l'estudi, procura mantenir les condicions experimentals en cultiu tant semblants com és possible amb l'exposició d'un organisme *in vivo* amb la utilització de cèl·lules primàries. Les dades presentades en el nostre estudi indiquen que a dosis de 0,1 Gy de IR existeix resposta cel·lular al dany. D'aquesta manera, exposicions a molt baixes dosis són potencialment capaces d'induir dany que, si no és reparat correctament, pot provocar la fixació de mutacions i iniciar processos de tumorigènesi. Si existeix una dosi de IR incapaç d'induir dany genètic aquesta és inferior a 0,1 Gy.

Les proteïnes biomarcadores de dany genètic són proteïnes capaces d'indicar la presència de dany al DNA de cèl·lules exposades. En resposta a IR, s'han proposat i són àmpliament estudiades algunes proteïnes biomarcadores. Entre elles destaquen les

proteïnes de resposta a dany al DNA  $\gamma$ H2AX, ATM i la proteïna tumoral 53 (TP53) [241]. La utilització de biomarcadors és especialment important per monitoritzar individus o poblacions exposades a IR de manera sobtada, com és en el cas d'accidents en centrals nuclears que sotmeten de cop a un nombre elevat d'individus a IR. Per aquesta raó, és imprescindible desenvolupar mètodes fiables per avaluar el dany genètic provocat per la IR en individus exposats i, en cas que sigui necessari, oferir-los tractaments mèdics adequats per minimitzar-lo. Del treball presentat aquí es proposa la utilització dels foci de FANCD2 com una nova manera de biomonitoritzar, i per tant detectar, dany genètic en cèl·lules exposades a IR. El fet d'utilitzar FANCD2 com a proteïna biomarcadora té un avantatge respecte les altres proteïnes proposades pel fet que FANCD2 és capaç de detectar dany genètic en cèl·lules en fase replicativa del DNA. En fase replicativa és potencialment més perillosa la fixació de mutacions, que poden causar desregulacions en la funcionalitat de la cèl·lula. Els resultats presentats mostren que FANCD2 forma foci de reparació juntament amb  $\gamma$ H2AX únicament en cèl·lules marcades per BrdU postulant FANCD2 com un bon biomarcador de dany genètic en fase S del cicle cel·lular. Per valorar la potencialitat de la fixació de mutacions en fase replicativa, es proposa l'estudi coordinat dels foci de  $\gamma$ H2AX i de FANCD2. Mentre que  $\gamma$ H2AX és un molt bon sensor de dany i és indicatiu principalment de DSBs generats linealment a dosis creixents de IR [242], FANCD2 és capaç de valorar la potencialitat de fixació de mutacions i la capacitat reparadora de les cèl·lules exposades segons el rerefons genètic individual de cada individu. D'aquesta manera, i visualitzant l'activació en foci de FANCD2 en cèl·lules marcades per fase S del cicle cel·lular en individus exposats, podem ràpidament valorar si les cèl·lules responen de manera adequada o no en relació a la quantitat de dany rebuda mitjançant la fosforilació de la histona H2AX. La relació entre les dosis de IR i la resposta de formació de foci de FANCD2 que s'observa a l'estudi és logarítmica amb una molt bona fiabilitat ( $R^2 > 0,95$ ). La funció logarítmica observada és una lineal a baixes dosis de IR ( $< 0,4$  Gy) i posteriorment se satura a dosis elevades ( $> 1$  Gy). La funció observada ens permet hipotetitzar que les dosis que són capaces d'induir mort cel·lular ( $D_{10}$  de 3,3 Gy per cèl·lules primàries [243]) són les que mostren saturació en la formació de foci de FANCD2 i, per tant, del sistema de reparació associat a fase S del cicle cel·lular. Així doncs, la ruta de reparació FA/BRCA, juntament amb d'altres, és essencial per assegurar una bona supervivència de les cèl·lules sotmeses a IR. La saturació del

sistema de reparació, amb la consegüent acumulació de dany no reparat, pot ser un dels possibles motius pels quals la cèl·lula desencadena mort cel·lular. Es calcula que aproximadament es produeixen 35 DSBs per cada Gy de IR [242], així doncs, i segons els nostres estudis, per a l'activació de la ruta FA/BRCA són necessaris únicament 3,5 DSBs per cèl·lula. No es descarta però que menys DSBs siguin capaços d'activar la ruta FA/BRCA ja que no s'han aconseguit dosis de IR suficientment baixes incapaces d'activar la ruta.

L'aplicació de FANCD2 com a biomarcador de dany genètic al DNA i com a marcador de reparació en fase S del cicle cel·lular és possible no només a moderades dosis de IR sinó que també ho és, i és realment on té més potencialitat, a baixes dosis de IR quan la supervivència cel·lular i la probabilitat de fixar mutacions és més elevada. La cinètica d'activació de la ruta FA/BRCA en resposta a IR és un bon marcador de dany en fase S del cicle cel·lular per a dosis majors de 100 mGy sent indubtablement l'aproximació per IF molt més detallada i específica que la de *western blot*. D'aquest treball es proposa la visualització de foci de FANCD2 en preparacions per IF com a marcador de resposta a DSBs induïts per baixes dosis de IR en fase replicativa del cicle cel·lular. Alhora el treball presentat mostra la perillositat de sotmetre's a dosis tant baixes com 0,1 Gy per la seva capacitat d'activar resposta cel·lular al dany i per tant, d'induir potencialment mutacions genètiques.

La part central del treball busca una explicació a la llarga controvèrsia del camp de FA i el dany oxidatiu. Dades prèvies indiquen que les cèl·lules FA tenen una sensibilitat anòmala a oxigen i que els fibroblasts de FA creixen millor i presenten menys trencaments cromosòmics en condicions de baixes tensions d'oxigen [244]. A més, l'edat d'aparició dels tumors epitelials en ratolins deficients per *Fancd2* pot ser endarrerida mitjançant dietes complementades amb antioxidants [154]. Tots aquests resultats suggereixen que el processament inadequat de les lesions oxidatives al DNA podria estar involucrat en l'explicació del fenotip clínic i cel·lular de FA. Malgrat tot, no s'han descrit estudis mecanístics que expliquin i clarifiquin la funció de les proteïnes FA en resposta a estrès oxidatiu. En el present treball s'investiga la funció de la ruta FA/BRCA i la seva relació amb ATM en la reparació de bases oxidades al DNA, la regulació del punt de control de fase S del cicle cel·lular després de dany i la sensibilitat de les cèl·lules FA en resposta a estrès oxidatiu. Els resultats d'aquesta tesi indiquen que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és capaç d'induir la fosforilació de la histona H2AX i la monoubiquitinació de



FANCD2 mentre que el  $\text{KBrO}_3$ , un agent que indueix pràcticament en exclusiva 8-oxoG, és incapaç de fer-ho. Aquest fet, juntament amb els resultats d'activació de la ruta FA/BRCA a baixes dosis de IR, indica clarament que els trencaments al DNA i no la presència de 8-oxoG són la principal causa d'activació de la ruta després de tractaments amb inductors de ROS. El nivell de formació de DSBs mesurat per la formació de  $\gamma\text{H2AX}$  després de  $\text{H}_2\text{O}_2$  és relativament baix comparat amb l'observat després de IR. Així doncs, els resultats mostren consistència amb l'efecte observat en l'assaig de supervivència de la línia deficient per FANCD2 en que es va observar una lleugera deficiència en la supervivència després de  $\text{H}_2\text{O}_2$  i una moderada, però significativa deficiència després de tractament amb IR, resultats, per altra banda coincidents amb els d'altres estudis previs [128].

Per primera vegada, es mostra en el nostre estudi que ni la incisió de la base ni els següents passos del sistema de reparació de BER són afectats com a resultat de mutacions en el gen de *FANCD2*. No és totalment descartable que l'assaig *in vitro* utilitzat ocultï possibles defectes de reparació BER en FA ja que els assaigs *in vitro* mai són un reflex cent per cent fidel de les complexes relacions entre sensibilització del dany, regulació del cicle cel·lular i reparació existent *in vivo*. El nostre assaig, però, és capaç de detectar acuradament defectes en la reparació per BER en diferents mutants de mamífer donant fiabilitat al resultat obtingut [54]. Aquests resultats, conjuntament amb la manca de sensibilitat a  $\text{KBrO}_3$  de la línia deficient per FANCD2 i la manca d'activació de la ruta FA/BRCA després de tractament amb  $\text{KBrO}_3$ , ens porten a la conclusió que la ruta FA és prescindible per a la reparació de la 8-oxoG al DNA. Així doncs i més plausiblement, l'acumulació de 8-oxoG observat en pacients i cèl·lules de FA és reflex d'una sobreproducció de ROS i no és degut a un defecte en el processament i reparació de les bases oxidades. Un treball molt recent i en línia amb la hipòtesi formulada, suggereix que l'estat proinflamatori de les cèl·lules FA és degut a un defecte en la regulació del  $\text{TNF}\alpha$ , de manera que la sobreproducció de ROS es podria explicar per aquest desajust [166].

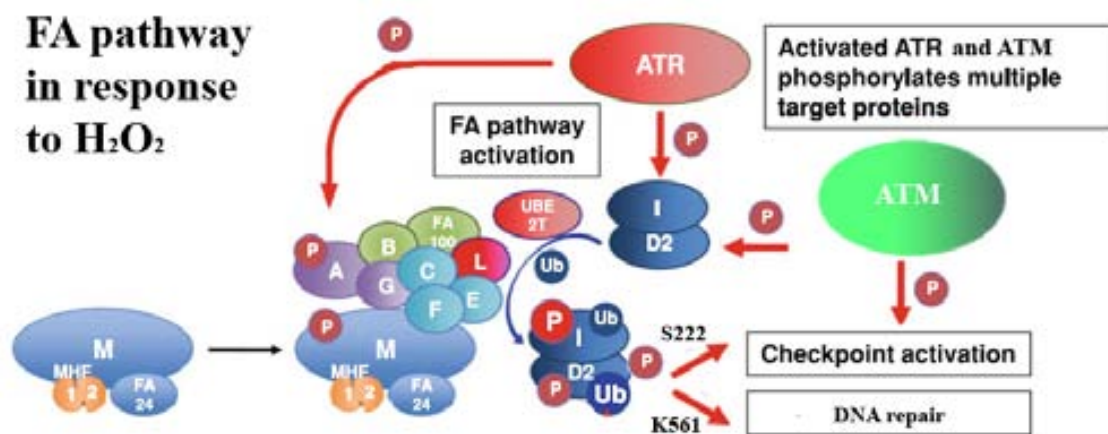
El nostre treball relaciona també molecularment dues malalties, FA i A-T en resposta a dany oxidatiu. La relació entre FA i A-T es va descriure en un treball previ en que es va observar que la proteïna cinasa ATM fosforila FANCD2 al residu S222 en resposta a IR per establir correctament el punt de control de fase S del cicle cel·lular [128]. Aquí, es descriuen defectes de la línia FANCD2 deficient en l'establiment del punt de control de fase S en resposta a dosis fisiològicament rellevants de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquest

defecte també s'observa en la línia deficient ATM. El defecte en el punt de control del cicle en cèl·lules FANCD2 deficientes es va corregir notablement mitjançant l'expressió de la forma no ubiquitinable de FANCD2 però no amb l'expressió del mutant de FANCD2 no fosforilable per ATM (S222A). Aquestes dades confirmen i donen credibilitat al resultat obtingut involucrant les dues proteïnes en la resposta cel·lular al dany oxidatiu. A més, la línia deficient per ATM i les inhibides per RNA d'interferència van mostrar síntesi de DNA resistent en resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> confirmant la fiabilitat de l'assaig utilitzat. Així doncs, el nostre treball mostra un paper conjunt de ATM i FANCD2 en el control de fase S del cicle cel·lular al tractar amb dosis relativament baixes d'un dels principals ROS endogen. A mode de confirmació, el defecte en l'establiment del punt de control de fase S es va corregir en la línia PD20 mitjançant l'expressió de la forma no monoubiquitinable de FANCD2 però si fosforilable (K561R); aquest fet suggereix que els pacients FA deficientes en proteïnes del complex de FA (A, B, C, E, F, G i L) no pateixen aquest defecte en el punt de control del cicle cel·lular després de tractaments amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aquest defecte en el punt de control de fase S observat en les cèl·lules deficientes per FANCD2 podria explicar el perquè els pacients amb mutació al gen de *FANCD2* presenten un fenotip més sever. Aquestes dades suggereixen una funció crítica i fisiològicament rellevant per la proteïna FANCD2 independentment de la ruta FA tal i com ha estat suggerit en revisions recents sobre el tema [125].

El fenotip clínic dels pacients A-T pot ser també explicat per deficiències en la reparació del dany oxidatiu. Les cèl·lules ATM deficientes presenten un defecte en l'establiment del punt de control de fase S a més de la sensibilitat observada a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KBrO<sub>3</sub>, d'aquesta manera, el nostre treball confirma les hipòtesis formulades en que la proteïna ATM tindria un paper important en la resposta a estrès oxidatiu i que dietes riques en antioxidants millorarien la simptomologia de la malaltia [170].

En resposta a dany oxidatiu, el defecte en el punt de control del cicle en fase S podria ser especialment rellevant per a cèl·lules activament replicatives com ara les cèl·lules mare epitelials i hematopoètiques. En aquest context, les nostres troballes sobre l'acció coordinada de FANCD2 i ATM en el control de fase S del cicle en resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poden explicar la susceptibilitat de FA a l'estrès oxidatiu i la reducció de la fragilitat cromosòmica quan les cèl·lules FA creixen a baixes tensions d'oxigen, com a mínim pel grup de complementació FANCD2. El fenotip clínic dels pacients del grup FA-D2 presenten una prognosi pitjor i major severitat de la malaltia respecte d'altres

pacients FA amb mutacions en el complex central, fet que podria ser explicat amb aquesta manca de parada de cicle cel·lular per reparar el dany oxidatiu descrita aquí. A més, estudis recents amb ratolins deficientes per FANCD2 demostren que es pot allargar l'edat d'aparició del tumor amb tractaments amb antioxidants com el tempol [154] i que es pot millorar el fenotip hematopoètic de disfunció al moll de l'os amb altres antioxidants com el resveratrol [245]. Donat doncs que els nivells d'estrès oxidatiu en FA són elevats, probablement per sobreexpressió de factors proinflamatoris, aquest tipus d'estudis utilitzant antioxidants poden ser clínicament rellevants en un futur per intentar trobar alguna manera eficient per alleugerir la severitat de la malaltia de FA. Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral respecte la resposta de FANCD2 a dany oxidatiu induït per  $H_2O_2$  s'esquematitzen a la fig.32.



**Figura 32. Esquema de l'activació de FANCD2 en resposta a  $H_2O_2$  per ATM i ATR.** ATR és necessària per a la correcta ubiquitinació de FANCD2 al residu K561 mitjançada pel grup de proteïnes del complex central en resposta a  $H_2O_2$  mentre que ATM és necessària pel correcte establiment del punt de control del cicle cel·lular en fosforilar directament FANCD2 al residu S222. Imatge extreta de [139] i modificada.

En la tercera i última part del treball es va identificar i caracteritzar una nova ruta de resposta cel·lular a dany oxidatiu en cèl·lules humanes i de ratolí independent del clàssic i conegut sistema de reparació BER. En aquesta nova ruta proposada en el present treball intervenen la monoubiquitinació de PCNA i l'acció de la polimerasa de TLS DNA polt per a la reparació del dany en fase replicativa del cicle cel·lular. Els resultats de la tesi mostren que PCNA s'activa per monoubiquitinació sota certes circumstàncies de dany oxidatiu induït amb una cinètica i comportament diferent al de la fins ara coneguda activació de PCNA per monoubiquitinació després d'exposició a radiació UV. La radiació UV indueix lesions distorsives, com ara 6-4,PP i CPDs, capaces de

bloquejar les forquilles de replicació en progressió per la incapacitat de les polimerases replicatives de sintetitzar per sobre de la lesió. Per seguir amb la síntesi de DNA, la cèl·lula desencadena mecanismes de resposta o de DDT que consisteixen en el canvi de polimerasa seguint el model descrit amb anterioritat: PCNA es monoubiquitina i recluta les polimerases de TLS, i principalment la DNA pol $\eta$ , per sintetitzar per sobre la lesió [94]. La monoubiquitinació de PCNA en resposta a agents inductors de lesions distorsives és lenta i progressiva, de manera que s'assoleixen els nivells màxims de monoubiquitinació a les 6 hores post-tractament. En el cas del dany oxidatiu, el nostre treball demostra que la monoubiquitinació és ràpida i transitòria just immediatament després del tractament, tant per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com per KBrO<sub>3</sub>, en cèl·lules humanes en cultiu. En ambdós casos es tendeixen a recuperar els nivells d'activació basals 2 hores després del tractament. El fet que PCNA s'activi per monoubiquitinació després de dos agents inductors de dany oxidatiu diferents en diferents línies cel·lulars suggereix clarament una funció de PCNA monoubiquitinat en la reparació del dany oxidatiu *per se*. A més, es descarta l'activació de PCNA com a resposta a possibles lesions secundàries induïdes pel dany oxidatiu, com ara els DSBs, ja que després de tractament amb altes dosis de IR no s'observa monoubiquitinació de PCNA.

La cinètica d'activació per monoubiquitinació de PCNA a diferents estímuls contrasta amb la cinètica d'activació observada per FANCD2. PCNA s'activa de manera ràpida i transitòria en resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KBrO<sub>3</sub>, mentre que FANCD2 ho fa després de IR i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i en cinètiques d'activació molt més lentes i progressives. Així doncs, les dues proteïnes responen a lesions diferents al DNA: FANCD2 respon a trencaments de cadena del DNA mentre que PCNA respon a lesions oxidatives. Les seves funcions en la reparació del dany oxidatiu es poden separar en rutes independents tot i compartir la característica comuna de ser activades en fase replicativa del DNA i per mitjà de la modificació post-traducciona de la inclusió d'un residu ubiquitina. FANCD2 i PCNA però són activats per diferents lligases d'ubiquitina en resposta a dany oxidatiu; en el primer cas l'activació depèn del complex central de FA que conté la lligasa d'ubiquitina E3 mentre que en el segon cas depèn de la lligasa E3 RAD18. Resta per elucidar en el treball presentat aquí el possible paper de la deubiquitinasa comuna de FANCD2 i PCNA USP1 en resposta a dany oxidatiu. Al tenir cinètiques d'activació per monoubiquitinació tant diferents, és previsible que una nova o noves deubiquitinases estarien involucrades en el balanç entre monoubiquitinació i deubiquitinació de les dues proteïnes de manera independent en resposta a estrès oxidatiu. La hipòtesi d'una nova

deubiquitinasa capaç de regular PCNA després d'estrès oxidatiu està reforçada en la observació realitzada en d'altres treballs que indiquen que després de tractament amb hidroxiurea els nivells de USP1 es mantenen inalterats mentre els nivells de monoubiquitinació de PCNA es modifiquen en resposta al dany induït [187] suggerint clarament un paper en el control de la ubiquitinació per part de noves DUBs. La identificació d'aquesta nova o noves deubiquitinases pot ser clau per entendre els mecanismes de reparació en que intervenen PCNA i FANCD2 després de dany oxidatiu. Per esbrinar-ho, es proposa visualitzar els nivells de monoubiquitinació de PCNA en resposta a dany oxidatiu en el mutant USP1<sup>-/-</sup>. Totes les dades presentades en aquest tercer apartat, ens porten doncs a concloure que la resposta de FANCD2 i PCNA a l'estrès oxidatiu i al principal agent de ROS endogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és independent malgrat compartir la mateixa DUB i actuar en la mateixa fase del cycle com discutirem més endavant. FANCD2 respon principalment a DSBs i PCNA ho fa a bases oxidades al DNA.

Amb l'objectiu de caracteritzar en profunditat la resposta de PCNA a estrès oxidatiu es va identificar la fase del cycle cel·lular en que es produeix la monoubiquitinació de PCNA. Per fer-ho es van tractar amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cèl·lules primàries sincronitzades en fase no replicativa i asincròniques. L'experiment demostra que l'activació de PCNA depèn de síntesi replicatiu de DNA i suggereix una funció per PCNA monoubiquitinat en fase S/G<sub>2</sub> del cycle cel·lular en el processament del dany induït per estrès oxidatiu. L'experiment de sincronització és molt consistent ja que no s'activa la monoubiquitinació de PCNA en resposta a radiació UV en cèl·lules sincronitzades en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Els resultats de l'experiment suggereixen que PCNA podria ser bloquejat en fase replicativa de DNA a les forquilles en progressió per la presència d'alguna base aberrant, induïda amb celeritat just immediatament després del tractament oxidatiu. Llavors, PCNA podria reclutar una polimerasa específica capaç de realitzar síntesi dependent de TLS mitjançant el model d'intercanvi de polimerases descrit amb anterioritat en resposta a UV [187]. Així doncs, l'activació de PCNA per monoubiquitinació seria un mecanisme d'emergència per a sobrepassar la lesió i evitar o minimitzar trencaments cromatídics més greus en cèl·lules replicatives en circumstàncies d'estrès oxidatiu.

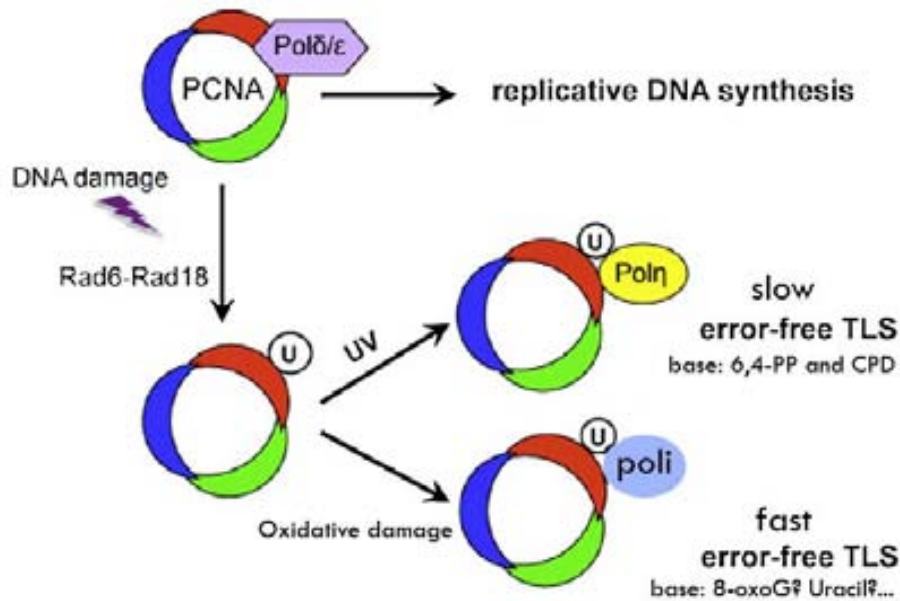
La manca d'activació per monoubiquitinació de PCNA a temps llargs post-tractament oxidatiu pot ser explicat perquè el tipus de lesió oxidativa induïda pel tractament és susceptible de ser reparada per altres mecanismes o sistemes de reparació

molt eficients. La reparació de les bases danyades induïdes pel dany oxidatiu en fases no replicativa, o fins i tot en fase S del cicle cel·lular, és duta a terme pel sistema de reparació evolutivament molt conservat de BER [22]. D'aquesta manera, a temps llargs post-tractament, la lesió oxidativa induïda seria reparada abans que les forquilles de replicació trobin la base danyada i, per tant, no s'observa la monoubiquitinació de PCNA a temps llargs post-tractament en resposta a agents inductors de dany oxidatiu. Una altra possibilitat existent és que la lesió oxidativa capaç d'activar la monoubiquitinació de PCNA s'indueixi únicament en cèl·lules en fase S del cicle cel·lular. Segons aquesta segona hipòtesi, aquest tipus de dany capaç d'activar PCNA per monoubiquitinació només afectaria cèl·lules en fase replicativa. Aquesta possibilitat sembla a priori més improbable ja que es preveu un efecte global del dany oxidatiu en totes les fases del cicle cel·lular.

L'activació de PCNA per monoubiquitinació en cèl·lules de mamífer té, molt probablement, una funció rellevant en la reparació del dany oxidatiu i no és una mera activació per oxidació proteica. Estudis previs en *S.cerevisiae* van mostrar un increment sinèrgic en la freqüència de mutació de la soca de llevat mutant per la glicosilasa de reparació BER *ogg1* i per *PCNAK164R*, mutant de PCNA no ubiquitinable, respecte les soques de mutants senzills *ogg1* i *PCNA164R*. Aquest resultat, suggereix que la monoubiquitinació de PCNA i la ruta de reparació BER formen part de rutes independents en la reparació del dany oxidatiu. De manera semblant, el doble mutant en llevat *Rad18 ogg1* mostra un efecte sinèrgic semblant suggerint una funció primordial per a la lligasa d'ubiquitina en l'activació de PCNA per monoubiquitinació en resposta a dany oxidatiu [246]. El nostre treball dóna lloc a un resultat semblant en cèl·lules de mamífer. Suggerim que en resposta a lesions induïdes pel dany oxidatiu, PCNA s'activa per monoubiquitinació de manera independent al sistema de reparació BER. Així doncs, ambdós sistemes de reparació cooperen per assegurar la supervivència cel·lular en condicions d'estrès oxidatiu. Del treball se'n deriven potencials experiments per confirmar les hipòtesis suggerides tant pel nostre treball com pel treball previ esmentat. Es proposa la construcció d'una línia cel·lular mutant per la monoubiquitinació de PCNA de manera que aquesta sigui capaç de realitzar les funcions associades a replicació però no a reparació en cèl·lules de mamífer. Aquesta línia cel·lular seria previsiblement sensible a dany oxidatiu induït tant per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com per KBrO<sub>3</sub>. La sensibilitat de la línia seria incrementada en el doble mutant deficient per la

monoubiquitinació de PCNA i per qualsevol dels gens claus del sistema de reparació BER com ara OGG1 o PARP1.

Finalment, i amb l'objectiu de caracteritzar el funcionament de la reparació per PCNA monoubiquitinat en resposta a dany oxidatiu, es va valorar la capacitat de formació de foci de PCNA i la seva colocalització amb polimerases de TLS. Recentment, un dels membres de les polimerases de TLS, DNA polt, s'ha vist involucrat en la resposta contra l'estrès oxidatiu: la línia humana deficient en DNA polt és sensible a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> però el mecanisme d'acció en la reparació del dany resta desconegut [219]. El nostre treball, descriu per primera vegada la colocalització de DNA polt amb PCNA en cèl·lules humanes tractades amb diferents agents inductors de dany oxidatiu. A més, DNA polt és reclutat específicament en foci després de tractaments amb KBrO<sub>3</sub> i sobretot H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i, en menor mesura, en resposta a radiació UV. S'utilitzen dosis equivalents en quan a activació de PCNA per monoubiquitinació de manera que s'observa un reclutament específic de DNA polt en la reparació del dany oxidatiu. Així doncs, els resultats presentats aquí suggereixen que DNA polt està involucrat directament i de manera específica en la reparació del dany oxidatiu en coordinació amb la monoubiquitinació de PCNA. D'aquesta manera el present treball descriu per primera vegada una nova ruta de reparació en resposta al dany oxidatiu en que intervé la monoubiquitinació de PCNA i la fins ara força desconeguda polimerasa de TLS DNA polt. Aquest mecanisme de reparació, descrit en cèl·lules humanes i de mamífer, es dona en condicions d'estrès oxidatiu i en cèl·lules replicatives i depèn de la funcionalitat de la lligasa RAD18. El mecanisme ens permet dibuixar un nou model de reparació del dany oxidatiu esquematitzat a la fig.33. Aquest nou mecanisme de reparació descrit en aquest treball pot ser d'importància cabdal per a la comprensió de càncers associats a estrès oxidatiu, de manera que defectes en aquesta ruta de reparació poden estar associats a un increment en el risc d'acumular mutacions i, per tant, de desregulacions de la cèl·lula. A més, defectes en aquest sistema de reparació podrien estar associats també a la virulència del tumor, de manera que la pèrdua de control del mecanisme de reparació pugui suposar un potencial increment de la capacitat d'adquirir noves mutacions en cèl·lules no invasives i reconvertir-les en invasives. Com que el mecanisme de reparació descrit és bàsicament present en fase replicativa, pot arribar a ser molt important en cèl·lules altament replicatives com ara les pròpies cèl·lules tumorals o els progenitors hematopoètics.



**Figura 33. Model de TLS lliure d'error en la reparació del dany induït pel dany oxidatiu i per radiació UV.** El model exemplificat aquí es centra en les funcions de replicació de PCNA (part superior) i de resposta al dany (part inferior). PCNA és monoubiquitina per Rad6-Rad18 en resposta a dany al DNA i és capaç de reclutar específicament les polimerases de TLS DNA pol $\eta$  o DNA pol $\iota$  en resposta a radiació UV o dany oxidatiu respectivament per realitzar síntesi per TLS lliure d'errors. Mentre que la polimerasa DNA pol $\eta$  és coneguda per sobrepassar les bases aberrants de dímers de timina de manera lenta en resposta a UV [187], DNA pol $\iota$  és capaç de sobrepassar les bases aberrants induïdes per tractaments oxidatius (el treball presentat aquí). Resta per elucidar quin o quins tipus de bases danyades són les causants de la monoubiquitinació de PCNA i de la síntesi per DNA pol $\iota$ . Esquema extret de [183] modificat per incloure les troballes del present treball referents a les modificacions de PCNA induïdes per dany oxidatiu.

Del treball aquí presentat, resta per elucidar el tipus de lesió induïda al DNA després de tractaments amb KBrO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que causa l'activació directe de PCNA per monoubiquitinació i desencadena el reclutament de DNA pol $\iota$ . Es descarten els trencaments de cadena i es postulen com a possibles causants les bases oxidades 8-oxoG o l'U sense descartar altres bases oxidades. Són necessaris doncs nous estudis i en major profunditat per acabar d'interpretar aquest nou mecanisme de reparació en fase replicativa del cicle cel·lular. Una possible estratègia per investigar les bases mutades que causen l'activació de PCNA per monoubiquitinació i el posterior reclutament de DNA pol $\iota$  seria utilitzar línies cel·lulars deficientes per DNA pol $\iota$  i les seves corresponents corregides per valorar la capacitat de síntesi *in vitro* de substrats amb diferents bases danyades per oxidació. De manera semblant es podria realitzar el mateix per a la línia mutant en PCNA incapaç de ser monoubiquitinada al residu K164.



En conclusió, els nostres resultats ajuden a comprendre els complexos mecanismes cel·lulars de resposta a dany oxidatiu i més concretament al ROS endogen  $H_2O_2$  en fase replicativa del cicle cel·lular. Es descriu un paper fonamental per les proteïnes FANCD2 i ATM en la senyalització del dany oxidatiu i en el correcte establiment del punt de control del cicle cel·lular en fase S a dosis sub tòxiques de  $H_2O_2$ . Aquest paper, pot explicar, si més no parcialment, el fenotip observat en pacients A-T i FA en resposta a estrès oxidatiu i aporta noves dades en el discutit tema de la FA i el dany oxidatiu. A més, es descriu una nova ruta de reparació del dany en resposta a estrès oxidatiu on participen de manera coordinada DNA pol $\eta$  i PCNA monoubiquitinat en fase replicativa del DNA. D'aquesta manera es dóna sentit i funció a la fins ara desconeguda polimerasa de TLS DNA pol $\eta$  a més de descriure noves funcions per a PCNA monoubiquitinat. L'estudi més detallat d'aquesta prometedora i nova ruta pot ser de cabdal importància per a la possible comprensió de malalties associades a desregulacions en l'estrès oxidatiu en humans i potencialment del càncer.





## **6. Conclusions**

---



## 6. Conclusions

Les conclusions de la present tesi doctoral són:

- La ruta FA/BRCA s'activa a molt baixes dosis de IR en fibroblasts primaris salvatges i és capaç de generar forquilles de replicació bloquejades.
- FANCD2 és activat per monoubiquitinació en resposta a molt baixes dosis de IR i localitza als foci de dany juntament amb la forma fosforilada de la histona H2AX.
- La cinètica dosi-resposta de formació de foci de FANCD2 segueix una funció logarítmica, de manera que la resposta és lineal a baixes dosis i se satura a partir de 1 Gy de radiació. Si existeix una dosi mínima de IR per a la qual no hi hagi activació de la ruta FA aquesta és inferior a 0,1 Gy.
- Les línies deficientes per a FANCD2 són sensibles al dany induït per IR però no al dany induït per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KBrO<sub>3</sub>.
- FANCD2 es monoubiquitina en resposta a IR i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> però no en resposta a KBrO<sub>3</sub>. La ruta FA/BRCA s'activa en resposta a DSBs i no degut a les bases oxidades al DNA.
- El KBrO<sub>3</sub> és un molt bon inductor de 8-oxoG al DNA i, en menor mesura el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La IR pràcticament no indueix 8-oxoG al DNA.
- Les línies deficientes per a FANCD2 no tenen cap defecte de reparació en la ruta BER, tant per SP-BER com per LP-BER en el processament de les bases 8-oxoG i U i dels llocs AP.
- La IR i, en menor mesura, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> són bons inductors de DSBs al DNA mentre que el KBrO<sub>3</sub> és pràcticament incapaç de generar DSBs.

- ATM fosforila FANCD2 a la S222 en resposta a  $H_2O_2$  i conjuntament ambdues proteïnes desencadenen l'establiment del punt de control de fase S del cicle cel·lular.
- PCNA es monoubiquitina en diferents línies cel·lulars humanes i de ratolí, incloent línies primàries, en resposta a dany oxidatiu induït pel ROS endogen  $H_2O_2$  i pel  $KBrO_3$ , conegut inductor de 8-oxoG al DNA.
- La monoubiquitinació de PCNA després de tractaments amb inductors de dany oxidatiu depèn de la funcionalitat de la lligasa d'ubiquitina E3 RAD18.
- La monoubiquitinació de PCNA en resposta a dany oxidatiu depèn de fase S del cicle cel·lular suggerint una funció de reparació semblant a TLS però amb una cinètica molt més ràpida d'activació que no pas el TLS clàssic de resposta a radiació UV.
- PCNA i DNA pol $\eta$  colocalitzen després del tractament oxidatiu en foci nuclears de reparació. DNA pol $\eta$  és reclutat específicament a DNA després de tractaments inductors de dany oxidatiu.



## **7. Bibliografia**

---





## 7. Bibliografia

1. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
2. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
3. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
4. Lodish, H., et al., *Molecular Biology of the Cell 5th ed.* 2004.
5. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 739-45.
6. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
7. Durocher, D. and S.P. Jackson, *DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 225-31.
8. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
9. Mena, S., A. Ortega, and J.M. Estrela, *Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis*. Mutat Res, 2009. **674**(1-2): p. 36-44.
10. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
11. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
12. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
13. Kawanishi, S., et al., *Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis*. Biol Chem, 2006. **387**(4): p. 365-72.
14. Hansford, R.G., B.A. Hogue, and V. Mildaziene, *Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age*. J Bioenerg Biomembr, 1997. **29**(1): p. 89-95.
15. Boveris, A., et al., *Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 535-42.

16. Racila, D. and J.R. Bickenbach, *Are epidermal stem cells unique with respect to aging?* Aging (Albany NY), 2009. **1**(8): p. 746-50.
17. D'Errico, M., E. Parlanti, and E. Dogliotti, *Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology.* Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 4-14.
18. Neeley, W.L. and J.M. Essigmann, *Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products.* Chem Res Toxicol, 2006. **19**(4): p. 491-505.
19. Lindahl, T. and D.E. Barnes, *Repair of endogenous DNA damage.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2000. **65**: p. 127-33.
20. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 239-67.
21. Shibutani, S., M. Takeshita, and A.P. Grollman, *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG.* Nature, 1991. **349**(6308): p. 431-4.
22. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.
23. Nowsheen, S., et al., *Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues.* Mutat Res, 2009. **674**(1-2): p. 131-6.
24. Eot-Houllier, G., et al., *Processing of a complex multiply damaged DNA site by human cell extracts and purified repair proteins.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(1): p. 260-71.
25. Yang, N., H. Galick, and S.S. Wallace, *Attempted base excision repair of ionizing radiation damage in human lymphoblastoid cells produces lethal and mutagenic double strand breaks.* DNA Repair (Amst), 2004. **3**(10): p. 1323-34.
26. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.* Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 247-54.
27. Morris, S.M., Jr. and T.R. Billiar, *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.* Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 1): p. E829-39.
28. Slupphaug, G., B. Kavli, and H.E. Krokan, *The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage.* Mutat Res, 2003. **531**(1-2): p. 231-51.
29. Barnes, D.E. and T. Lindahl, *Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells.* Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 445-76.

30. Lari, S.U., et al., *Quantitative determination of uracil residues in Escherichia coli DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(12): p. 1407-20.
31. Shen, J.C., W.M. Rideout, 3rd, and P.A. Jones, *The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(6): p. 972-6.
32. Traut, T.W., *Physiological concentrations of purines and pyrimidines*. Mol Cell Biochem, 1994. **140**(1): p. 1-22.
33. Guillet, M. and S. Boiteux, *Origin of endogenous DNA abasic sites in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8386-94.
34. Tinkelenberg, B.A., M.J. Hansbury, and R.D. Ladner, *dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4909-15.
35. William, S.K. and C. Michael, eds. *Concepts of Genetics*. 7th ed. 1997, Pearson Education.
36. Neuberger, M.S., et al., *Immunity through DNA deamination*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 305-12.
37. Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris, *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 276-85.
38. Evans, M.D., M. Dizdaroglu, and M.S. Cooke, *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*. Mutat Res, 2004. **567**(1): p. 1-61.
39. Liang, Y., et al., *DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment*. World J Surg, 2009. **33**(4): p. 661-6.
40. Greenman, C., et al., *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 153-8.
41. Hecht, S.S., *Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 160-71.
42. Pleasance, E.D., et al., *A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 184-90.
43. Sedelnikova, O.A. and W.M. Bonner, *GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence*. Cell Cycle, 2006. **5**(24): p. 2909-13.
44. Trachootham, D., et al., *Redox regulation of cell survival*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(8): p. 1343-74.

45. Pallardo, F.V., et al., *Mitochondrial dysfunction in some oxidative stress-related genetic diseases: Ataxia-Telangiectasia, Down Syndrome, Fanconi Anaemia and Werner Syndrome*. Biogerontology, 2010. **11**(4): p. 401-19.
46. Wilson, D.M., 3rd, T.M. Sofinowski, and D.R. McNeill, *Repair mechanisms for oxidative DNA damage*. Front Biosci, 2003. **8**: p. d963-81.
47. Lindahl, T., *Uracil-DNA glycosylase from Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1980. **65**(1): p. 284-90.
48. Frosina, G., et al., *Two pathways for base excision repair in mammalian cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9573-8.
49. Kubota, Y., et al., *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein*. Embo J, 1996. **15**(23): p. 6662-70.
50. Jensen, A., et al., *Mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 incises 8-oxoadenine opposite cytosine in nuclei and mitochondria, while a different glycosylase incises 8-oxoadenine opposite guanine in nuclei*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19541-8.
51. Nilsen, H., et al., *Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase*. Embo J, 2001. **20**(15): p. 4278-86.
52. Demple, B., T. Herman, and D.S. Chen, *Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11450-4.
53. Matsumoto, Y. and K. Kim, *Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair*. Science, 1995. **269**(5224): p. 699-702.
54. Cappelli, E., et al., *Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23970-5.
55. Pascucci, B., et al., *Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33696-702.
56. Podlutzky, A.J., et al., *Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA*. Embo J, 2001. **20**(6): p. 1477-82.
57. Wu, X., et al., *Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(11): p. 2036-43.

58. Kim, K., S. Biade, and Y. Matsumoto, *Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 8842-8.
59. Hegde, M.L., T.K. Hazra, and S. Mitra, *Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 27-47.
60. Petermann, E., M. Ziegler, and S.L. Oei, *ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(10): p. 1101-14.
61. Guan, Y., et al., *MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(12): p. 1058-64.
62. Parker, A., et al., *Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5547-55.
63. Hayashi, H., et al., *Replication-associated repair of adenine:8-oxoguanine mispairs by MYH*. Curr Biol, 2002. **12**(4): p. 335-9.
64. Boldogh, I., et al., *hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(13): p. 2802-9.
65. Parker, A.R., et al., *Defective human MutY phosphorylation exists in colorectal cancer cell lines with wild-type MutY alleles*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47937-45.
66. Nilsen, H., et al., *Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication*. Mol Cell, 2000. **5**(6): p. 1059-65.
67. Haug, T., et al., *Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(6): p. 1449-57.
68. Otterlei, M., et al., *Post-replicative base excision repair in replication foci*. Embo J, 1999. **18**(13): p. 3834-44.
69. Akbari, M., et al., *Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(18): p. 5486-98.

70. Nagelhus, T.A., et al., *A sequence in the N-terminal region of human uracil-DNA glycosylase with homology to XPA interacts with the C-terminal part of the 34-kDa subunit of replication protein A*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6561-6.
71. Otterlei, M., et al., *Repair of chromosomal abasic sites in vivo involves at least three different repair pathways*. Embo J, 2000. **19**(20): p. 5542-51.
72. Pettersen, H.S., et al., *Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(12): p. 3879-92.
73. Lindahl, T. and R.D. Wood, *Quality control by DNA repair*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1897-905.
74. Kunkel, T.A. and D.A. Erie, *DNA mismatch repair*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 681-710.
75. Yang, H., et al., *Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) by apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(3): p. 743-52.
76. Russo, M.T., et al., *Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4372-9.
77. Dufner, P., et al., *Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutSalpha is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36550-5.
78. Kleczkowska, H.E., et al., *hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci*. Genes Dev, 2001. **15**(6): p. 724-36.
79. Lau, P.J. and R.D. Kolodner, *Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 14-7.
80. Kunz, C., Y. Saito, and P. Schar, *DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 1021-38.
81. Tran, P.T., et al., *EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(12): p. 1549-59.
82. Zhang, Y., et al., *Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system*. Cell, 2005. **122**(5): p. 693-705.
83. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.

84. Sowa, M.E., et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. Cell, 2009. **138**(2): p. 389-403.
85. Hochstrasser, M., *Ubiquitin-dependent protein degradation*. Annu Rev Genet, 1996. **30**: p. 405-39.
86. Haglund, K. and I. Dikic, *Ubiquitylation and cell signaling*. Embo J, 2005. **24**(19): p. 3353-9.
87. Huang, T.T. and A.D. D'Andrea, *Regulation of DNA repair by ubiquitylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 323-34.
88. Ikeda, F. and I. Dikic, *Atypical ubiquitin chains: new molecular signals*. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 536-42.
89. Panier, S. and D. Durocher, *Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(4): p. 436-43.
90. Huen, M.S., et al., *RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly*. Cell, 2007. **131**(5): p. 901-14.
91. Al-Hakim, A., et al., *The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(12): p. 1229-40.
92. Meetei, A.R., Z. Yan, and W. Wang, *FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination*. Cell Cycle, 2004. **3**(2): p. 179-81.
93. Wang, W., *Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(10): p. 735-48.
94. Hoege, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
95. Nijman, S.M., et al., *A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes*. Cell, 2005. **123**(5): p. 773-86.
96. Nijman, S.M., et al., *The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 331-9.
97. Huang, T.T., et al., *Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 339-47.
98. Kim, J.M., et al., *Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype*. Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 314-20.

99. Williams, S.A., et al., *The E3 ubiquitin ligase RAD18 regulates ubiquitylation and chromatin loading of FANCD2 and FANCI*. *Blood*, 2011. **117**(19): p. 5078-87.
100. Callen, E., et al., *A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain*. *Blood*, 2005. **105**(5): p. 1946-9.
101. Joenje, H. and K.J. Patel, *The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(6): p. 446-57.
102. Niedernhofer, L.J., A.S. Lalai, and J.H. Hoeijmakers, *Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair*. *Cell*, 2005. **123**(7): p. 1191-8.
103. Auerbach, A.D., *A test for Fanconi's anemia*. *Blood*, 1988. **72**(1): p. 366-7.
104. Castella, M., et al., *Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact*. *J Med Genet*, 2011. **48**(4): p. 242-50.
105. Heinrich, M.C., et al., *DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function*. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 275-87.
106. Deans, A.J. and S.C. West, *DNA interstrand crosslink repair and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(7): p. 467-80.
107. Singh, T.R., et al., *Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M*. *Blood*, 2009. **114**(1): p. 174-80.
108. Meetei, A.R., et al., *X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B*. *Nat Genet*, 2004. **36**(11): p. 1219-24.
109. Meetei, A.R., et al., *A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(10): p. 3417-26.
110. Meetei, A.R., et al., *A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia*. *Nat Genet*, 2003. **35**(2): p. 165-70.
111. Matsushita, N., et al., *A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair*. *Mol Cell*, 2005. **19**(6): p. 841-7.
112. Ciccia, A., et al., *Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM*. *Mol Cell*, 2007. **25**(3): p. 331-43.



113. Komori, K., et al., *Cooperation of the N-terminal Helicase and C-terminal endonuclease activities of Archaeal Hef protein in processing stalled replication forks*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53175-85.
114. Meetei, A.R., et al., *A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M*. Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 958-63.
115. Schwab, R.A., A.N. Blackford, and W. Niedzwiedz, *ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells*. Embo J, 2010. **29**(4): p. 806-18.
116. Collis, S.J., et al., *FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 313-24.
117. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
118. Wilson, J.B., et al., *FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3*. Oncogene, 2008. **27**(26): p. 3641-52.
119. Castillo, V., et al., *Molecular cloning of the Drosophila Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(6): p. 751-8.
120. Montes de Oca, R., et al., *Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1003-9.
121. Garcia-Higuera, I., et al., *Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 249-62.
122. Andreassen, P.R., A.D. D'Andrea, and T. Taniguchi, *ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1958-63.
123. Bogliolo, M., et al., *Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability*. Embo J, 2007. **26**(5): p. 1340-51.
124. Kinner, A., et al., *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(17): p. 5678-94.
125. Lyakhovich, A. and J. Surrallés, *New roads to FA/BRCA pathway: H2AX*. Cell Cycle, 2007. **6**(9): p. 1019-23.

126. Kalb, R., et al., *Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(5): p. 895-910.
127. Castella, M., et al., *Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3759-69.
128. Taniguchi, T., et al., *Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways*. Cell, 2002. **109**(4): p. 459-72.
129. Ishiai, M., et al., *FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(11): p. 1138-46.
130. Landwehr, R., et al., *Mutation analysis of the SLX4/FANCP gene in hereditary breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011.
131. Howlett, N.G., et al., *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. Science, 2002. **297**(5581): p. 606-9.
132. Somyajit, K., S. Subramanya, and G. Nagaraju, *RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(12): p. 2031-8.
133. Xia, B., et al., *Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 159-61.
134. Levitus, M., et al., *The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J*. Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 934-5.
135. Stoepker, C., et al., *SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype*. Nat Genet, 2011. **43**(2): p. 138-41.
136. Svendsen, J.M. and J.W. Harper, *GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution*. Genes Dev, 2010. **24**(6): p. 521-36.
137. Yamamoto, K.N., et al., *Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6492-6.
138. Fekairi, S., et al., *Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases*. Cell, 2009. **138**(1): p. 78-89.
139. Kitao, H. and M. Takata, *Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response*. Int J Hematol, 2011. **93**(4): p. 417-24.

140. Raschle, M., et al., *Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair*. Cell, 2008. **134**(6): p. 969-80.
141. Minko, I.G., et al., *Role for DNA polymerase kappa in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17075-82.
142. Knipscheer, P., et al., *The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair*. Science, 2009. **326**(5960): p. 1698-701.
143. Kratz, K., et al., *Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents*. Cell, 2010. **142**(1): p. 77-88.
144. Liu, T., et al., *FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair*. Science, 2011. **329**(5992): p. 693-6.
145. Yoshikiyo, K., et al., *KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21553-7.
146. Bunting, S.F. and A. Nussenzweig, *Dangerous liaisons: Fanconi anemia and toxic nonhomologous end joining in DNA crosslink repair*. Mol Cell, 2010. **39**(2): p. 164-6.
147. Adamo, A., et al., *Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia*. Mol Cell, 2010. **39**(1): p. 25-35.
148. Alter, B.P., *Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001*. Cancer, 2003. **97**(2): p. 425-40.
149. Daya-Grosjean, L. and A. Sarasin, *The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors*. Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 43-56.
150. Pang, Q. and P.R. Andreassen, *Fanconi anemia proteins and endogenous stresses*. Mutat Res, 2009. **668**(1-2): p. 42-53.
151. Pagano, G., et al., *Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype*. Eur J Haematol, 2005. **75**(2): p. 93-100.
152. Langevin, F., et al., *Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 53-8.
153. Joenje, H., et al., *Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia*. Nature, 1981. **290**(5802): p. 142-3.

154. Zhang, Q.S., et al., *Tempol protects against oxidative damage and delays epithelial tumor onset in Fanconi anemia mice*. *Cancer Res*, 2008. **68**(5): p. 1601-8.
155. Pagano, G., et al., *In vitro hypersensitivity to oxygen of Fanconi anemia (FA) cells is linked to ex vivo evidence for oxidative stress in FA homozygotes and heterozygotes*. *Blood*, 1997. **89**(3): p. 1111-2.
156. Degan, P., et al., *In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(4): p. 735-41.
157. Mace-Aime, G., et al., *The Fanconi anemia pathway promotes DNA glycosylase-dependent excision of interstrand DNA crosslinks*. *Environ Mol Mutagen*, 2010. **51**(6): p. 508-19.
158. Hazra, T.K., et al., *Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 30417-20.
159. Kutler, D.I., et al., *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1249-56.
160. Du, W., et al., *Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(11): p. 1909-21.
161. Haneline, L.S., et al., *Loss of FancC function results in decreased hematopoietic stem cell repopulating ability*. *Blood*, 1999. **94**(1): p. 1-8.
162. Haneline, L.S., et al., *Retroviral-mediated expression of recombinant FancC enhances the repopulating ability of FancC-/- hematopoietic stem cells and decreases the risk of clonal evolution*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1299-307.
163. Rio, P., et al., *In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1*. *Blood*, 2008. **112**(13): p. 4853-61.
164. Dufour, C., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro*. *Blood*, 2003. **102**(6): p. 2053-9.
165. Sejas, D.P., et al., *Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in FancC-deficient mice*. *J Immunol*, 2007. **178**(8): p. 5277-87.
166. Matsushita, N., et al., *Direct Inhibition of TNF-alpha Promoter Activity by Fanconi Anemia Protein FANCD2*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23324.

167. Pagano, G., et al., *Oxidative stress in Fanconi anaemia: from cells and molecules toward prospects in clinical management*. Biol Chem, 2011.
168. Lavin, M.F. and Y. Shiloh, *The genetic defect in ataxia-telangiectasia*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 177-202.
169. Bensimon, A., R. Aebbersold, and Y. Shiloh, *Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response*. FEBS Lett, 2011. **585**(11): p. 1625-39.
170. Barzilai, A., G. Rotman, and Y. Shiloh, *ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2002. **1**(1): p. 3-25.
171. Barlow, C., et al., *Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9915-9.
172. Chou, W.C., et al., *Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair*. Embo J, 2008. **27**(23): p. 3140-50.
173. Mathews, M.B., et al., *Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin*. Nature, 1984. **309**(5966): p. 374-6.
174. Krishna, T.S., et al., *Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1233-43.
175. Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch, *PCNA, the maestro of the replication fork*. Cell, 2007. **129**(4): p. 665-79.
176. Warbrick, E., et al., *PCNA binding proteins in Drosophila melanogaster : the analysis of a conserved PCNA binding domain*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(17): p. 3925-32.
177. Bowman, G.D., M. O'Donnell, and J. Kuriyan, *Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex*. Nature, 2004. **429**(6993): p. 724-30.
178. Prelich, G., et al., *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein*. Nature, 1987. **326**(6112): p. 517-20.
179. Xiao, W., et al., *The Saccharomyces cerevisiae RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways*. Genetics, 2000. **155**(4): p. 1633-41.

180. Andersen, P.L., F. Xu, and W. Xiao, *Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 162-73.
181. Parker, J.L. and H.D. Ulrich, *Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5*. Embo J, 2009. **28**(23): p. 3657-66.
182. Pfander, B., et al., *SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase*. Nature, 2005. **436**(7049): p. 428-33.
183. Zhang, W., et al., *Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance*. FEBS Lett, 2011.
184. Watanabe, K., et al., *Rad18 guides pol $\epsilon$  to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination*. Embo J, 2004. **23**(19): p. 3886-96.
185. Shiomi, N., et al., *Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(2): p. e9.
186. Bi, X., et al., *Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(9): p. 3527-40.
187. Niimi, A., et al., *Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16125-30.
188. Bailly, V., et al., *Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites*. Genes Dev, 1994. **8**(7): p. 811-20.
189. Yang, X.H. and L. Zou, *Dual functions of DNA replication forks in checkpoint signaling and PCNA ubiquitination*. Cell Cycle, 2009. **8**(2): p. 191-4.
190. Garg, P. and P.M. Burgers, *Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18361-6.
191. Yang, X.H., et al., *Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination*. Genes Dev, 2008. **22**(9): p. 1147-52.
192. Avkin, S., et al., *p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load*. Mol Cell, 2006. **22**(3): p. 407-13.

193. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 195-201.
194. Chiu, R.K., et al., *Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations*. PLoS Genet, 2006. **2**(7): p. e116.
195. Branzei, D. and M. Foiani, *Template switching: from replication fork repair to genome rearrangements*. Cell, 2007. **131**(7): p. 1228-30.
196. Prakash, S., R.E. Johnson, and L. Prakash, *Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 317-53.
197. Lange, S.S., K. Takata, and R.D. Wood, *DNA polymerases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 96-110.
198. Guo, C., et al., *Y-family DNA polymerases in mammalian cells*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(14): p. 2363-81.
199. Bienko, M., et al., *Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis*. Science, 2005. **310**(5755): p. 1821-4.
200. Guo, C., et al., *REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo*. Mol Cell, 2006. **23**(2): p. 265-71.
201. Ling, H., et al., *Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution*. Nature, 2003. **424**(6952): p. 1083-7.
202. Zhang, Y., et al., *Response of human DNA polymerase iota to DNA lesions*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(4): p. 928-35.
203. Masutani, C., et al., *The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta*. Nature, 1999. **399**(6737): p. 700-4.
204. Lichon, V. and A. Khachemoune, *Xeroderma pigmentosum: beyond skin cancer*. J Drugs Dermatol, 2007. **6**(3): p. 281-8.
205. Maga, G., et al., *8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 606-8.
206. Haracska, L., et al., *Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase eta*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6861-6.
207. Sherrer, S.M., et al., *Quantitative analysis of the efficiency and mutagenic spectra of abasic lesion bypass catalyzed by human Y-family DNA polymerases*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(2): p. 609-22.

208. Gibbs, P.E., et al., *The function of the human homolog of Saccharomyces cerevisiae REV1 is required for mutagenesis induced by UV light*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4186-91.
209. Lee, D.H. and G.P. Pfeifer, *Translesion synthesis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine by DNA polymerase eta in vivo*. Mutat Res, 2008. **641**(1-2): p. 19-26.
210. Choi, J.H. and G.P. Pfeifer, *The role of DNA polymerase eta in UV mutational spectra*. DNA Repair (Amst), 2005. **4**(2): p. 211-20.
211. King, N.M., et al., *Overproduction of DNA polymerase eta does not raise the spontaneous mutation rate in diploid human fibroblasts*. DNA Repair (Amst), 2005. **4**(6): p. 714-24.
212. Parker, J.L., et al., *Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(3): p. 881-9.
213. Kannouche, P.L., J. Wing, and A.R. Lehmann, *Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage*. Mol Cell, 2004. **14**(4): p. 491-500.
214. Vaisman, A., A.R. Lehmann, and R. Woodgate, *DNA polymerases eta and iota*. Adv Protein Chem, 2004. **69**: p. 205-28.
215. McDonald, J.P., et al., *Novel human and mouse homologs of Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase eta*. Genomics, 1999. **60**(1): p. 20-30.
216. Wang, Y., et al., *Evidence that in xeroderma pigmentosum variant cells, which lack DNA polymerase eta, DNA polymerase iota causes the very high frequency and unique spectrum of UV-induced mutations*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3018-26.
217. Lee, G.H. and H. Matsushita, *Genetic linkage between Pol iota deficiency and increased susceptibility to lung tumors in mice*. Cancer Sci, 2005. **96**(5): p. 256-9.
218. Yang, J., et al., *Altered DNA polymerase iota expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5597-607.
219. Petta, T.B., et al., *Human DNA polymerase iota protects cells against oxidative stress*. Embo J, 2008. **27**(21): p. 2883-95.



220. Frank, E.G. and R. Woodgate, *Increased catalytic activity and altered fidelity of human DNA polymerase iota in the presence of manganese*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24689-96.
221. Kannouche, P., et al., *Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells*. Embo J, 2003. **22**(5): p. 1223-33.
222. Bomar, M.G., et al., *Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases iota and Rev1*. Mol Cell, 2011. **37**(3): p. 408-17.
223. Kakar, S., N.B. Watson, and W.G. McGregor, *RAD18 signals DNA polymerase IOTA to stalled replication forks in cells entering S-phase with DNA damage*. Adv Exp Med Biol, 2008. **614**: p. 137-43.
224. McDonald, J.P., et al., *I29-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase iota and have normal immunoglobulin hypermutation*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 635-43.
225. Vaisman, A. and R. Woodgate, *Unique misinsertion specificity of poliota may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines*. Embo J, 2001. **20**(22): p. 6520-9.
226. Kirouac, K.N. and H. Ling, *Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxo-guanine lesion by human DNA polymerase iota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(8): p. 3210-5.
227. Cappelli, E., P. Degan, and G. Frosina, *Comparative repair of the endogenous lesions 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (8-oxoG), uracil and abasic site by mammalian cell extracts: 8-oxoG is poorly repaired by human cell extracts*. Carcinogenesis, 2000. **21**(6): p. 1135-41.
228. Tanaka, M., J.S. Lai, and W. Herr, *Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter*. Cell, 1992. **68**(4): p. 755-67.
229. Bogliolo, M., et al., *Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells*. Oncogene, 2000. **19**(50): p. 5781-7.
230. Xia, B., et al., *Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 719-29.
231. Hoskins, E.E., et al., *Coordinate regulation of Fanconi anemia gene expression occurs through the Rb/E2F pathway*. Oncogene, 2008. **27**(35): p. 4798-808.

232. Stiff, T., et al., *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation*. *Cancer Res*, 2004. **64**(7): p. 2390-6.
233. Castillo, P., M. Bogliolo, and J. Surrallés, *Coordinated action of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways in response to oxidative damage*. *DNA Repair (Amst)*, 2011. **10**(5): p. 518-25.
234. Ballmaier, D. and B. Epe, *DNA damage by bromate: mechanism and consequences*. *Toxicology*, 2006. **221**(2-3): p. 166-71.
235. Hsu, G.W., et al., *Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase*. *Nature*, 2004. **431**(7005): p. 217-21.
236. Cappelli, E., et al., *Efficient DNA base excision repair in ataxia telangiectasia cells*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(23): p. 6883-7.
237. Stracker, T.H., T. Usui, and J.H. Petrini, *Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response*. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(9): p. 1047-54.
238. Nair, D.T., et al., *DNA synthesis across an abasic lesion by human DNA polymerase iota*. *Structure*, 2009. **17**(4): p. 530-7.
239. Burschowsky, D., et al., *Structural analysis of the conserved ubiquitin-binding motifs (UBMs) of the translesion polymerase iota in complex with ubiquitin*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(2): p. 1364-73.
240. Imlay, J.A., S.M. Chin, and S. Linn, *Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro*. *Science*, 1988. **240**(4852): p. 640-2.
241. Marchetti, F., et al., *Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation*. *Int J Radiat Biol*, 2006. **82**(9): p. 605-39.
242. Rothkamm, K. and M. Lobrich, *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5057-62.
243. Arlett, C.F., et al., *Minimal ionizing radiation sensitivity in a large cohort of xeroderma pigmentosum fibroblasts*. *Br J Radiol*, 2008. **81**(961): p. 51-8.
244. Saito, H., A.T. Hammond, and R.E. Moses, *Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells*. *Mutat Res*, 1993. **294**(3): p. 255-62.
245. Zhang, Q.S., et al., *Fancd2<sup>-/-</sup> mice have hematopoietic defects that can be partially corrected by resveratrol*. *Blood*, 2010. **116**(24): p. 5140-8.

246. de Padula, M., et al., *The post-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(17): p. 5003-10.





## **8. Annex: Publicacions**

**“Coordinated action of the Fanconi Anemia and Ataxia telangectasia pathways in response to oxidative stress”**

**Pau Castillo, Massimo Bogliolo, Jordi Surrallés**

**DNA repair. 2011. May**

---





## Coordinated action of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways in response to oxidative damage

Pau Castillo<sup>a</sup>, Massimo Bogliolo<sup>a,b,\*,1</sup>, Jordi Surrallès<sup>a,b,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Genome Instability and DNA Repair Group, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 November 2010

Received in revised form 15 February 2011

Accepted 27 February 2011

Available online 5 April 2011

#### Keywords:

Fanconi anemia

ATM

DNA repair

Oxidative damage

### ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) and ataxia telangiectasia (AT) share common traits such chromosomal instability and proneness to hematological cancers. Both AT and FA cell lines, and patients, are characterized by abnormally high levels of oxidative stress markers. The key FA protein FANCD2 is phosphorylated on Ser 222 by ATM after ionizing radiation (IR), thus allowing normal activation of the S-phase checkpoint, and ATM cells are known to be hypersensitive to oxidative damage. In this work we show that FANCD2 deficient cells have a defective S-phase checkpoint after Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced oxidative damage. ATM dependent phosphorylation of FANCD2 at the S222 residue is necessary for normal S-phase checkpoint activation after oxidative stress, while FANCD2 monoubiquitination at K561 is dispensable. We also show that FANCD2 is not required for base excision repair of 8-oxoG and other DNA lesions (abasic sites, uracils), while treatments that exclusively induce 8-oxoG, but not DNA double strand breaks, fail to activate FANCD2 monoubiquitination, thus indicating that the known accumulation of 8-oxoG in FA cells reflects an overproduction of ROS rather than defective processing of oxidized bases.

We conclude that the handling of DNA damage after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress requires the coordinated action of FANCD2 and ATM.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease with a frequency of mutation carriers ranging from 1/65 to 1/300 [1]. FA is characterized by chromosome fragility, congenital malformations, bone marrow failure, and cancer susceptibility [2]. Until now 14 FA genes have been characterized and cloned (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N and O) [3–5] but the relevance of the FANCM gene in FA etiology is under discussion [6]. The FA proteins FANCA, B, C, E, F, G and L assemble in a nuclear complex (FA complex) required for activation through monoubiquitination of FANCD2 and FANCI (ID complex) in response to DNA damage [7,8]. FANCL provides the monoubiquitin E3 ligase function for both FANCI and FANCD2 [9,10]. FANCD2 gene has a key role in the FA/BRCA pathway [3] and it is one of the few FA genes with homologs in non-vertebrates [11,12]. After DNA damage, ATM [13] and ATR are required for FANCD2 phosphorylation, and ATR dependent phosphorylation is essential for the correct monoubiquitination of FANCD2 on Lysine 561 (K561)

[14,15]. ATM phosphorylates FANCD2 at least on Serine 222 (S222) following ionizing radiation (IR) and this phosphorylation event, even if is not required for FANCD2 monoubiquitination, is essential for proper establishment of the S phase checkpoint in response to IR. The ATM-dependent phosphorylation of FANCD2 on S222 and the FA pathway-dependent monoubiquitination of FANCD2 on K561 are independent post-translational modifications regulating different signaling pathways and the loss of FANCD2 results in both Mitomycin C (MMC) and, to a lesser extent, IR hypersensitivity [13]. Upon DNA damage, monoubiquitinated FANCD2 can be found in nuclear foci where it co-localizes with several other proteins involved in homologous recombination repair (HRR) and S-phase checkpoint control [16]. FANCD2 has been found to directly interact with BRCA2/FANCD1 and the phosphorylated form of histone H2AX at stalled replication forks [17–19]. The fact that monoubiquitinated FANCD2 forms foci and directly interacts with BRCA2, suggests that the FA/BRCA pathway is involved in HRR [20–22], thus justifying the extreme sensitivity of the FA cells and patients to DNA interstrand crosslink inducers such as MMC and, to a lesser extent, to IR [13,23].

Another mechanism of action has been proposed over the years, in which oxidative damage could explain part of the sensitivity of FA cells to both MMC and IR [24–26]. The role of oxygen and oxidative damage in FA is an old [27] and controversial issue. DNA damage caused by Reactive Oxygen Species (ROS) includes a large variety of lesions spanning from base

\* Corresponding authors at: Group of Genome Instability and DNA Repair, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra s/n, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel.: +34 935811830; fax: +34 935812387.

E-mail addresses: [massimo.bogliolo@uab.es](mailto:massimo.bogliolo@uab.es) (M. Bogliolo), [jordi.surralles@uab.es](mailto:jordi.surralles@uab.es) (J. Surrallès).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

and sugar damage to DNA breaks and DNA-protein cross-links. Guanines are easily oxidized, giving rise to two major products 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG) and 7,8-dihydro-8-hydroxyguanine (8-oxoG). The most studied oxidized base is 8-oxoG because of its mutagenic potential [28]. Base excision repair (BER) is the main mechanism by which oxidized bases are repaired. BER repairs chemical alterations of DNA bases including alkylated, oxidized, reduced, or deaminated bases, as well as misincorporated uracils [28].

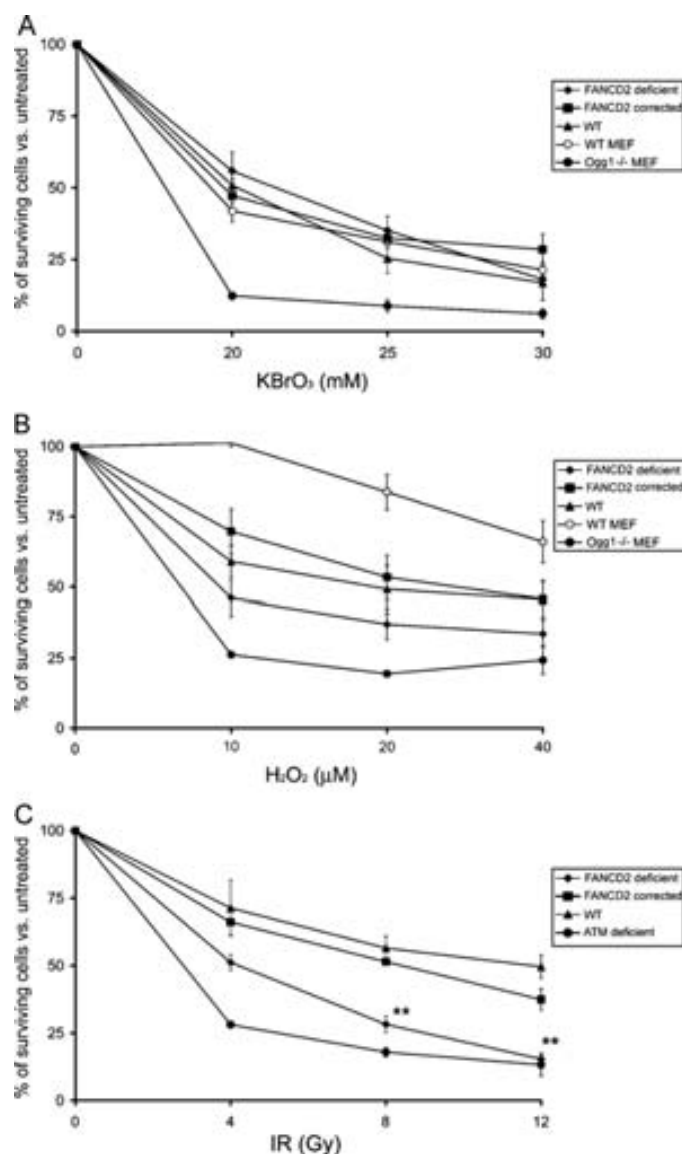
FA cells are sensitive to high levels of oxygen, and recent studies showed that dietary supplements with antioxidants can delay the age of onset of epithelial tumors in FA mouse models [29]. The redox state is indeed altered in FA [30]. Both FA patients and FA cells show abnormal accumulation of 8-oxoG in their DNA [31] suggesting a possible defect in the repair of this lesion. The FA pathway was also recently shown to be involved in the regulation of cellular levels of the human oxidative DNA glycosylase NEIL1 [32], a human DNA glycosylase able to also recognize 8-oxoG, among other oxidized bases [33]. Furthermore, overexpression of NEIL1 was able to partially revert the FA phenotype in FA deficient cell lines [32]. Even if the removal of 8-oxoG appears to be normal [26], nothing up until now is known about the functionality in FA cells of the entire BER process of the oxidized bases, including lesion recognition, excision, gap refilling and ligation.

ATM has been suggested to function, at least in part, in the cellular response to oxidative damage [34]. Support for this statement comes from observations that ATM-deficient cells are unusually sensitive to the toxic effects of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), nitric oxide, and superoxide treatments as determined by colony-forming efficiency assays. Furthermore, *Atm*-deficient mice have elevated markers of oxidative stress [35], and a recent work showed that CHK2, once activated by ATM, phosphorylates XRCC1, a component of BER machinery, thus connecting BER to the ATM Pathway [36]. Therefore, since ATM is known to phosphorylate FANCD2 after DNA damage, and that both AT and FA share common traits of altered response to oxidative stress, we hypothesized that ATM and FANCD2 could be interconnected in the establishment of the normal cellular response to oxidative stress. To test this hypothesis, we compared the effects of IR,  $H_2O_2$  and potassium bromate ( $KBrO_3$ ) on normal, FANCD2 deficient and ATM deficient human and mouse fibroblasts. Unlike  $H_2O_2$ ,  $KBrO_3$  does not react efficiently with vitally important cellular constituents and produces almost exclusively 8-oxoG at DNA level [37,38]. For this reason we included  $KBrO_3$  in our study to rule out more precisely the role of FANCD2 and ATM in response to oxidative DNA damage and to 8-oxoG in particular.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell lines and culturing

The following human transformed fibroblasts cell lines from Coriell Cell Repositories were used in this study: SV40 immortalized FANCD2<sup>-/-</sup> cell line GM16633 (PD20), the microcell hybrid corrected counterpart GM16634 (3.15) and of the wild type cell line SV40 immortalized AG10076 (MRC5). PD20 expressing a non-ubiquitinable FANCD2 form (PD20-K561R) and PD20 expressing a non-phosphorylatable Ser 222 Ala mutated FANCD2 (PD20F-S222A) were generous gifts of Dr. Irene Garcia-Higuera and Dr Toshiyasu Taniguchi, respectively. Wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEF) and *Ogg1*<sup>-/-</sup> MEF were kindly shared by Dr Deborah Barnes and *Atm* MEF were provided by Dr. Elsa Callen. The MEF wild-type cell line was cultured with E4/F12 1:1 plus 10% FBS and 1% non-essential aminoacids and the MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup> with E4/F12 3:1 plus 15% FBS. All the other cell lines were cultured as we previously



**Fig. 1.** FANCD2 deficient cells exhibit increased IR but normal  $H_2O_2$  and  $KBrO_3$  sensitivity. (A) and (B)  $KBrO_3$  sensitivity of the FANCD2 deficient cells (PD20), FANCD2 corrected cells (3.15), WT (MRC5 human fibroblast), wild type mouse embryonic fibroblast (WT MEF) and *Ogg1*<sup>-/-</sup> MEF. (C) IR sensitivity of the already indicated cell lines and of ATM deficient cells (AT-7). The graphs represent the mean of 5 independent experiments and error bars represent the standard error of the mean. \*\*  $P < 0.02$  Student's test.

described [18,39]. AT-7 ATM deficient human cell line has already been described in [18].

### 2.2. Survival assay

100,000 cells were seeded in duplicate in 6 cm Petri dishes and the following day cells were irradiated in a gamma irradiator (IBL 437C) at the indicated doses. For  $KBrO_3$  and  $H_2O_2$  treatments, the cells were exposed to  $KBrO_3$  or  $H_2O_2$  (Sigma) at the indicated concentrations for 60 and 30 min, respectively, in serum free RPMI medium at 37 °C and in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Subsequently the medium was removed, the cells washed with PBS and new complete growing medium was added. Seventy two hours after treatment, the medium was discarded, cells were washed twice with PBS and harvested by trypsinization. The number of cells in the resulting cell suspension was counted in a Beckman-Coulter



cell counter. Results are expressed in fold decrease in respect to the untreated controls.

### 2.3. Small interfering RNA

ATM was knocked down with the 5'AAACUACUACUCAAAGACAUU3' siRNA. As a control, the 5'CGUACGCGGAAUACUUCGA3' siRNA against firefly luciferase was used. Cells were transfected twice with the siRNAs at 25 nM final concentration with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Briefly 150,000 cells/well were seeded in a six well plate already containing the transfection mix (reverse transfection). 24 h later, after removal of the medium and a wash with PBS, the cells were transfected again (forward transfection). Cells were treated or harvested 72 h after the second transfection.

### 2.4. Western blot analysis

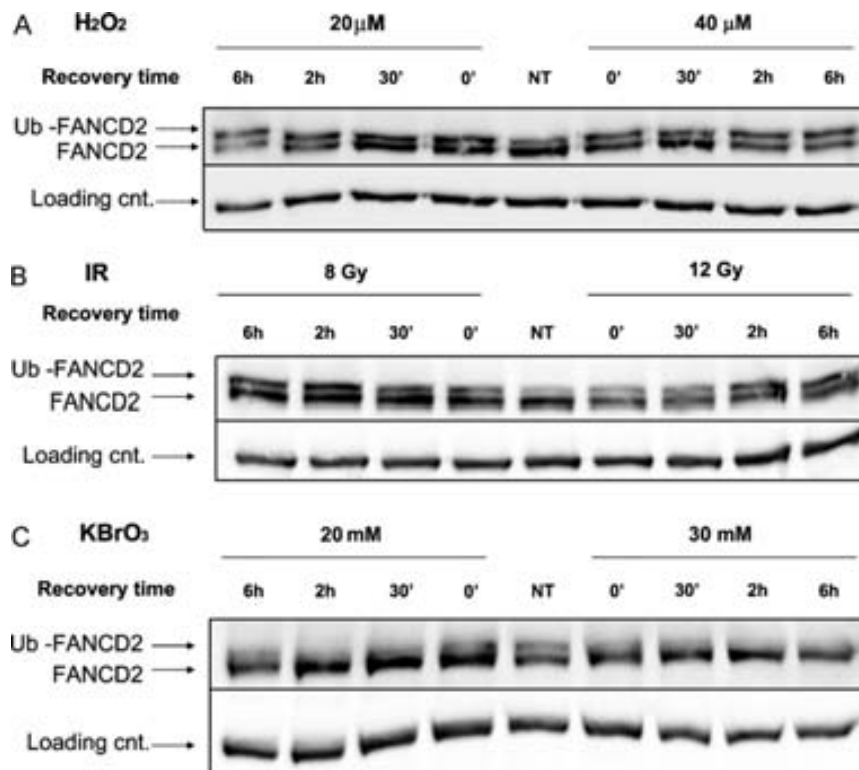
Cells were harvested by scraping, and lysed for 10 min at 4 °C in RIPA lysis buffer (Millipore, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM EDTA) supplemented with benzoylase (Novagen) at 8 U/ml final concentration. Total protein concentration was measured by spectrophotometry with the Bio-Rad Protein Assay (Biorad). 40 µg of total proteins were separated on 6% (for FANCD2 monoubiquitination studies) or 15% (for H2AX phosphorylation studies) SDS/PAGE gel, blotted onto nitrocellulose membranes (Biorad) and incubated overnight with the appropriate primary antibody. The following antibodies were used in 5% nonfat dried milk in TTBS: Rab anti-FANCD2 (abcam ref. ab2187) diluted 1:2500, Mab anti-vinculin (abcam, ref. ab18058) diluted 1/5000, Rab anti-actin (abcam, ref. ab1801) diluted 1/1000, Mab anti-ATM 1:500 (abcam ref. ab78). Mab anti-γH2AX (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, Upstate) was diluted 1:5000 in 5% BSA in TTBS.

### 2.5. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine assay

DNA was extracted from cultured cell lines using the PerfectPure DNA Cultured cell kit (5 Prime) following the manufacturer's instructions. DNA was digested with micrococcal nuclease (New England Biolabs) and processed with the BIOXYTECH 8-OHdG-EIA kit (Oxis International) following the company's guidelines.

### 2.6. Base excision repair assay

The procedures for preparation of plasmids carrying a single lesion have been described previously [40,41]. Briefly, pGEM3Zf(+) single-stranded DNA was annealed with an oligonucleotide carrying a single 8-oxoG in position 12 (22 bp; GATCCTCTAA8-oxoGTCGACTGCA) or an oligonucleotide carrying a single uracil (U) (22 bp; GATCCTCTAGAGUCGACTGCA) in position 13 (pGEM U), thus generating a single 8-oxoG/C base pair or a single U/A base pair. Control pGEM T plasmids were prepared with an oligonucleotide carrying the normal bases. Closed circular double-stranded DNA was obtained by incubation with T4 DNA polymerase, single-strand binding protein and T4 DNA ligase (Roche). The plasmid carrying a single natural abasic (AP) site (pGEM X) was generated by incubation of pGEM U with *Escherichia coli* U DNA glycosylase [1 ng protein (50 ng DNA); 37 °C; 45 min] (Roche). Cell extracts were prepared basically by the method of Tanaka et al. [42] with some modifications. Briefly, harvested cells were washed three times with PBS and resuspended in a buffer made up of 10 mM Tris-HCl pH 7.8 and 200 mM KCl (buffer I) at a cell density of  $1 \times 10^6$  cells/10 µl. After the addition of an equal volume of a second buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM KCl 2 mM EDTA, 40% glycerol, 0.2% Nonidet P-40, 2 mM dithiothreitol, Roche Complete, Mini, EDTA-free protease inhibitors, 1 tablet each 10 ml; buffer II), the cell suspension was stirred



**Fig. 2.** FA/BRCA pathway is activated by FANCD2 monoubiquitination by IR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not by KBrO<sub>3</sub>. Whole cell extracts from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), IR (B) or KBrO<sub>3</sub> (C) treated wild type MRC5 cells where immunoblotted with anti FANCD2 antibody. Cells were treated at the specified doses and allowed to recover for the indicated times before being harvested. Equal loading was assessed by immunoblotting with anti Vinculin antibody (loading cnt.).

for 1 h at 4°C and centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. The total protein concentration in the supernatant was then measured using the Bio-Rad Protein Assay (Biorad) according to the manufacturer's instructions. The supernatant was divided into aliquots and stored in liquid nitrogen. The *in vitro* BER assay was described previously [41,43]. Briefly, 300 ng of plasmid substrate was incubated with 40 µg extract protein for the indicated times at 30°C in presence of <sup>32</sup>PdGTP or <sup>32</sup>PdTTP. After the repair reaction, the DNA reaction product was purified with the el NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) and digested with the restriction endonucleases XbaI-PstI (20 units each) (Roche). The resulting 16 bp DNA fragments were resolved by PAGE in the presence of 7 M urea at 30 mA constant current. Levels of incorporation of the radiolabelled base were then analyzed by phosphor imaging.

2.7. Damage resistant DNA synthesis (RDS)

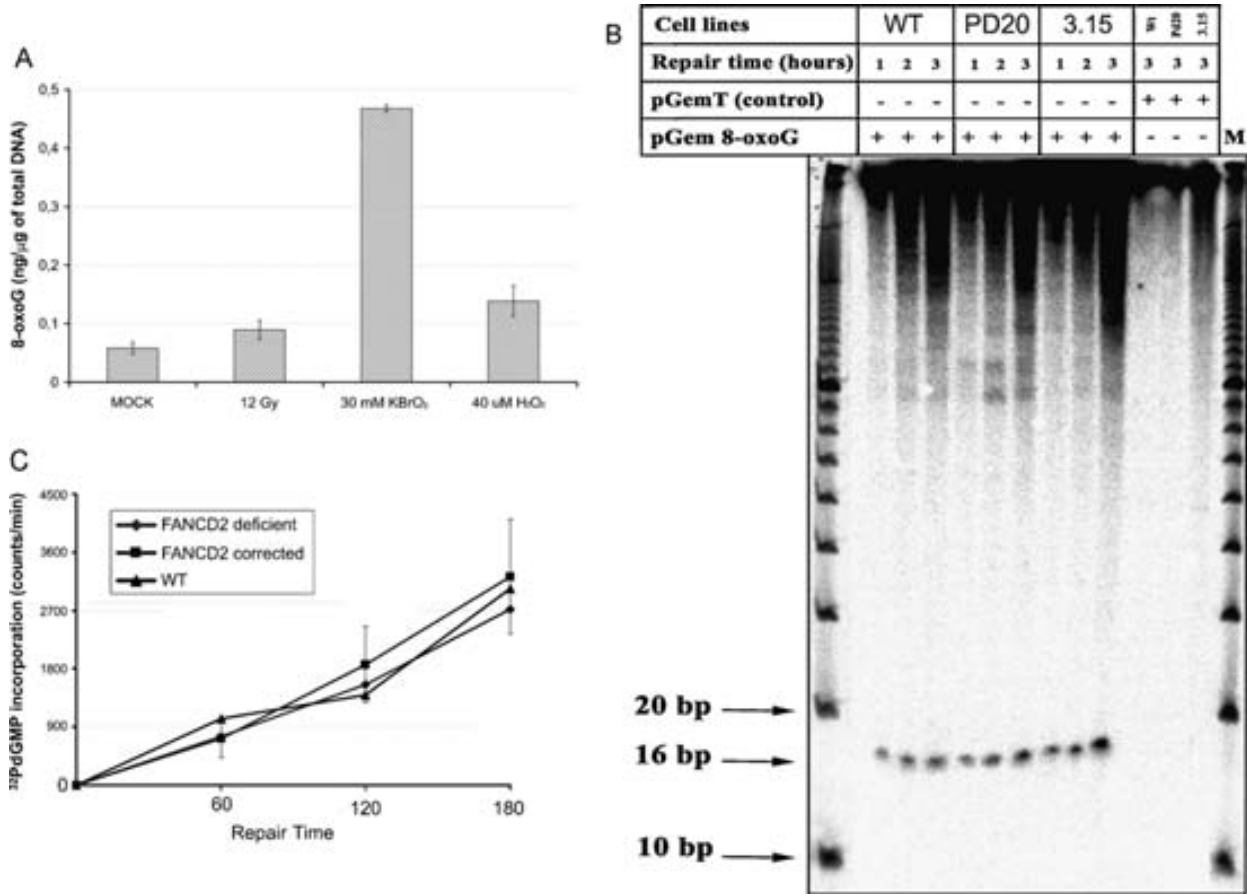
RDS was measured as reported elsewhere [44] with some modifications. Cells were treated at the indicated doses. After 3 h, the cells were pulse-labeled for 10 min with 10 µM of 5-ethynyl-2'-Deoxyuridine (EdU) diluted in normal medium. EdU is an analog of BrdU that is incorporated in DNA during DNA synthesis. Cells were subsequently fixed and processed following the manufacturer's instructions with the Click-it EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry assay kit (Invitrogen). FACS analysis was performed in a FACSCanto

cytometer (BD bioscience) and the data were analyzed using the flow cytometry analysis software FlowJo (Tree Star, Inc).

3. Results

3.1. FA cells are not sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or KBrO<sub>3</sub> induced damage

We first checked the sensitivity of the SV40 immortalized FANCD2 deficient cell line (PD20) and of their corrected counterpart (3.15) to the various agents used in this study (Fig. 1). Cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub> an IR at the indicated doses and then viable cells were counted 72 h after the treatment. The percentage of surviving cells compared to the untreated control is shown in the graphs. After KBrO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no differences were observed between FANCD2 deficient, FANCD2 corrected and WT cell lines. Ogg1<sup>-/-</sup> MEF showed a clear sensitivity to both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and KBrO<sub>3</sub> compared to WT MEF, confirming the reliability of the survival assay used in this study (Fig. 1A and 1B). FANCD2 deficient cells showed a moderate, but significant, sensitivity to IR (Fig. 2C) when compared to their corrected counterpart, or to WT and ATM deficient cells (Fig. 1C). These data are in line with already published results showing that FANCD2 deficient cells are moderately sensitive to IR [13,23]. ATM deficient MEF showed a moderate sensitivity to KBrO<sub>3</sub> and a clear sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (supplemental Fig. 1A and B) in keeping with the known notion that ATM deficient cells are susceptible to DNA breaks and to oxidative insults [34].



**Fig. 3.** KBrO<sub>3</sub> is a strong inducer of 8-OxoG and 8-oxoG is normally repaired by BER in the absence of FANCD2. (A) Wild type MRC5 cells were exposed to the indicated agents and harvested immediately after the treatment. Genomic DNA was purified, digested with micrococcal nuclease and analyzed by ELISA. All graphs represent the mean of 3 independent experiments. Error bars represent the standard deviation. (B) Repair of a single 8-oxoG by MRC5 (WT), PD20 (FANCD2 deficient) and 3.15 (FANCD2 corrected) cell extracts. 300 ng of pGEM 8-oxoG and control pGEM T plasmids were incubated with 40 µg of cells extracts for the indicated times. Plasmids were then purified and treated with XbaI–PstI restriction endonuclease for analysis of the single nucleotide insertion and of the long-patch pathway. The quantifications of repair incorporations by the different cell extracts (expressed as cpm of <sup>32</sup>PdGMP incorporated) were plotted in (C). Data are the means of 3 independent experiments. Error bars represent standard error of the mean.

### 3.2. $H_2O_2$ , but not $KBrO_3$ induced damage triggers FANCD2 monoubiquitination

To compare the effects of the different treatments on the cellular response and to keep our studies within the boundaries of physiological relevance, in the following experiments we used doses and concentrations of the various agents that produced a similar decrease in cell survival as reported in Fig. 1. Exposure to  $H_2O_2$  produced a clear activation of the FA/BRCA pathway, especially at longer times, as evidenced by Western blot analysis of FANCD2 monoubiquitination in WT cells (Fig. 2A). Similar activation was induced by IR (Fig. 2B). This response was quick and lasted at least up to 6 h after treatment (Fig. 2A and 2B). However, the FA/BRCA pathway was not activated upon treatment with 20, 30 mM (Fig. 2C) and 50 mM  $KBrO_3$ , even 24 h after treatment (supplemental Fig. 2). Cytometric analysis ruled out any modification of the cell cycle as a possible cause of the lack of activation of FANCD2 after  $KBrO_3$  treatment (not shown).

### 3.3. $H_2O_2$ and $KBrO_3$ generates different levels of 8-oxoG in the DNA

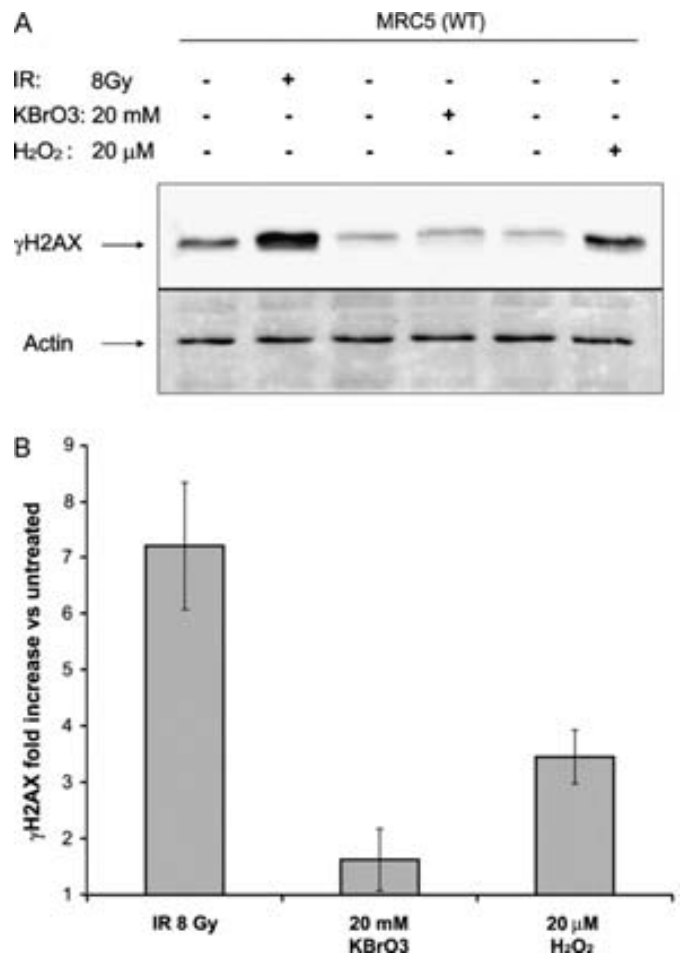
To quantify oxidative damage induced by the different treatments, we measured the level of 8-oxoG at concentrations of the different agents giving a similar cytotoxicity. We purified DNA from treated and untreated WT cells and digested it with micrococcal nuclease, and the total quantity of 8-oxoG in the DNA was measured by an ELISA assay. As shown in Fig. 3A,  $KBrO_3$ , as expected, was the strongest inducer of 8-oxoG when compared to IR and  $H_2O_2$ . Since  $KBrO_3$  treatment did not affect FANCD2 monoubiquitination (Fig. 2C and supplemental Fig. 2), it is unlikely that 8-oxoG could play a role in the activation of the FA/BRCA pathway, which is known to be triggered by lesions perturbing DNA replication forks [3]. This is also in line with previous reports showing that 8-oxoG does not impair replicative DNA polymerases [45].

### 3.4. Normal BER of 8-oxoG in the absence of FANCD2

To further test the role of the FA/BRCA pathway in response to oxidative insults, we measured BER functionality of FA cells with a well established BER assay [43]. Whole cell extracts were prepared from the FANCD2 deficient, FANCD2 corrected, and WT cell lines, and an equal amount of protein extracts was incubated with an equal amount of a DNA substrate bearing a single 8-oxoG at a known position (Fig. 3B and supplemental Fig. 3A). Repair was allowed to take place for 1–3 h in the presence of  $^{32}P$ dGTP. This assay measures the total activity of BER, in other words, the total amount of repair produced by both the short and the long patch BER pathways [43]. As a control, the same plasmid with the normal sequence was used. The products of the repair reaction were then purified and analyzed by denaturing PAGE (Fig. 3B). The quantity of radioactivity incorporated by the 16 bp fragments (directly proportional to the repair activity of the cells extracts) is shown in Fig. 3C. FANCD2 deficient cells extracts did not show any evident impairment in the repair of the substrate with a single 8-oxoG and they are also proficient in the BER of other DNA substrates including single abasic sites or uracils (Fig. 3C and supplemental Fig. 3B and C). In conclusion, the FA/BRCA pathway is not activated by 8-oxoG, and FA (this work) and ATM [46] cells showed normal BER of 8-oxoG *in vitro*.

### 3.5. $H_2O_2$ , but not $KBrO_3$ treatment induces histone H2AX phosphorylation

We checked the induction of phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX) at doses that produced a similar lethality in WT cells. As expected, 8 Gy

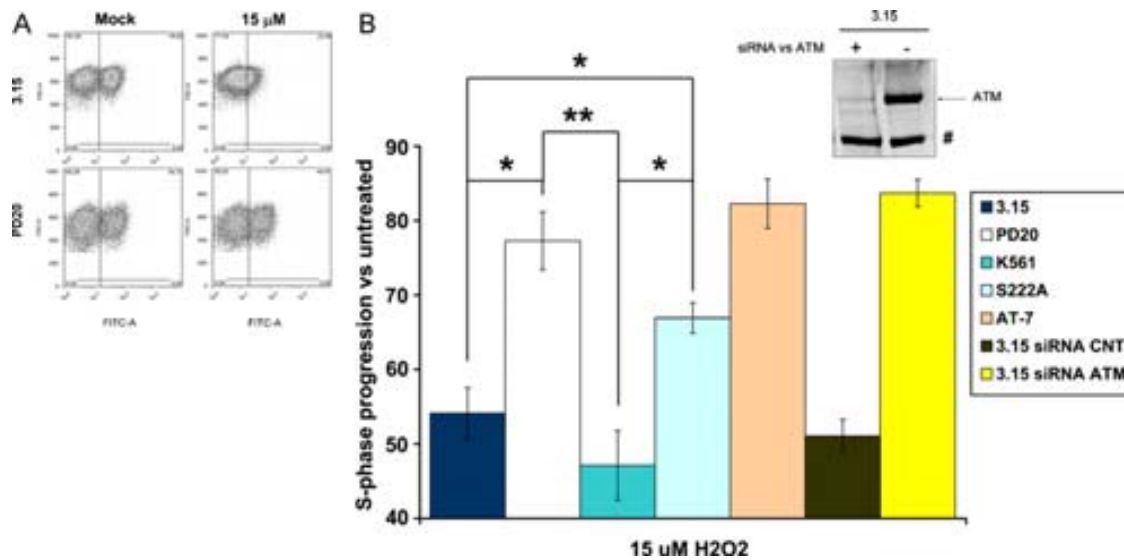


**Fig. 4.** IR and  $H_2O_2$  but not  $KBrO_3$ , activate histone H2AX phosphorylation. (A) Wild type MRC5 cell extracts were immunoblotted with an anti  $\gamma$ H2AX antibody. Cells were treated at the specified doses and allowed to recover for 1 h before being harvested. Equal loading was assessed by immunoblotting with an anti actin antibody. Levels of  $\gamma$ H2AX were assessed by densitometry and plotted in (B). Fold increase respect to the untreated controls are reported in (B). The graph represents the mean of 3 independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean.

of IR were able to induce the strongest response in terms of H2AX phosphorylation (Fig. 4). While intermediate levels of  $\gamma$ H2AX were observed after 20  $\mu$ M of  $H_2O_2$ ,  $KBrO_3$  treatment did not induce H2AX phosphorylation (Fig. 4A and B). Thus, unlike  $KBrO_3$ ,  $H_2O_2$  and IR had similar effects on both FANCD2 monoubiquitination and H2AX phosphorylation, suggesting that DSB but not 8-oxoG are responsible of the activation of the FA/BRCA pathway.

### 3.6. ATM and FANCD2 deficient cell lines have an impaired S-phase checkpoint after $H_2O_2$ treatment

ATM mediated FANCD2 phosphorylation at Ser222 is required for IR-induced S-phase checkpoint [13]. Since both  $H_2O_2$  and IR were able to trigger FANCD2 K561 monoubiquitination alongside with H2AX phosphorylation, we decided to check if the S-phase checkpoint after oxidative damage was normal in cells lacking FANCD2 or expressing either a non monoubiquitinable FANCD2 (K561R) or a non ATM-phosphorylatable FANCD2 (S222A). Treated and untreated cells were pulse-labeled with 5-ethynyl-2'-Deoxyuridine (EdU) and the proportion of EdU-labeled cells was then analyzed by flow cytometry. Untreated WT cells incorporated EdU at a higher rate than their treated counterparts (Fig. 5A) resulting in a population of cells with higher mean fluorescence. ATM deficient or ATM depleted cells showed a clear RDS after



**Fig. 5.** Flow cytometric analysis of RDS after  $H_2O_2$  treatment. (A) Cells were pulse labeled with  $10 \mu M$  of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine at 6 h after being treated with  $15 \mu M$  of  $H_2O_2$  and they were subsequently processed with the Click-it EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry assay kit and analyzed by flow cytometry. Incorporation of EdU was evaluated as mean fluorescence in 3.15 (FANCD2 corrected) PD20 (FANCD2 deficient) AT-7 (ATM deficient) K561R (PD20 expressing K561R FANCD2), S222A (PD20 expressing S222A FANCD2), 3.15 + siRNA control (3.15 siRNA CNT) and 3.15 + siRNA vs ATM (3.15 siRNA ATM) and plotted in (B) as percentage of the mean fluorescence of the untreated counterpart. All data are representative of 5 independent experiments. \* $P < 0.05$  Student's test. \*\* $P < 0.02$  Student's test. Error bars represent standard error of the mean. The indicated 3.15 cell extracts were examined for protein expression after siRNA transfection. (#) Unspecific band used as a control of equal loading.

$15 \mu M$  of  $H_2O_2$ , as well as the FANCD2 deficient cells (Fig. 5). The same behavior was observed upon IR treatment for both FA and AT cells (supplemental Fig. 4). Cells expressing the K561R FANCD2 mutant were able to correct the checkpoint defect of the FANCD2 deficient cells after  $H_2O_2$  treatment (Fig. 5). These results confirm that only the presence of phosphorylatable FANCD2 is sufficient to re-establish the correct S-phase checkpoint in FANCD2 deficient cells after  $H_2O_2$  treatment (Fig. 5). When the same cells were forced to express the S222A phosphorylation mutant, they were unable to recover the S-phase checkpoint defect (Fig. 5), indicating that FANCD2 phosphorylation at this position is critical for the correct cellular response after  $H_2O_2$ -induced oxidative damage.

#### 4. Discussion

$H_2O_2$  is the most abundant secondary product of the oxidative phosphorylation mechanism that eukaryotic cells use to produce the energy necessary for life in form of ATP.  $H_2O_2$  generates active forms of hydroxyl radicals through the Fenton reaction and is held responsible for most of the oxidative damage that all biological systems suffer throughout their lifespan [47]. Oxygen radicals may attack DNA at either the sugar or the base, giving rise to a large number of products including oxidized bases, base loss and a strand breaks [47]. It is known that FA cells have an abnormal sensitivity to oxygen [27] and that FA fibroblasts grow better and have less chromosome breaks at lower oxygen tensions [27,48]. In addition, the age of onset of epithelial tumors in Fancd2 KO mice can be delayed by dietary antioxidants [29]. These data would suggest that inadequate processing of DNA oxidative lesions may be related to the FA cellular and clinical phenotype. However no mechanistic studies have been published to clarify the role of FA proteins in response to oxidative stress.

In this work we investigated the role of the FA pathway and its crosstalk with ATM in the repair of oxidized DNA bases, the control of S-phase checkpoint and the sensitivity of FA cells in response to oxidative stress.  $H_2O_2$  is able to induced histone H2AX phosphorylation and FANCD2 monoubiquitination while  $KBrO_3$ , an agent that induces almost exclusively 8-oxoG, is unable to do so. This

indicates that DNA breaks and not 8-oxoG formation are the main cause of FA pathway activation upon treatments with ROS inducers. The level of DSB formation measured by  $\gamma H2AX$  formation after  $H_2O_2$  was relatively low when compared with that observed after IR. This was consistent with the low effect of  $H_2O_2$  and the moderate but significant effect of IR in the survival of FANCD2 deficient cells ([13,23] and this study).

Interestingly, neither base incision nor the following BER steps were affected as a result of mutations in the FANCD2 gene. It cannot be ruled out that the *in vitro* assay used in this study does not faithfully reflect the complex relationship between sensing of damage, cell cycle regulation, and repair existing *in vivo*, and consequently is unable to disclose possible BER defects in FA. This, however, is unlikely as this assay accurately detected BER defects in various mammalian mutants and knockouts [49,50]. These observations, together with the lack of sensitivity of FA to  $KBrO_3$  and the lack of activation of the FA/BRCA pathway after  $KBrO_3$  treatment, lead to the conclusion that the FA pathway is dispensable for the repair of 8-oxoG and, therefore, that the accumulation of 8-oxoG in FA cells reflects overproduction of ROS rather than defective processing of oxidized bases.

AT cells and FANCD2 deficient cells were reported to have an impaired S-phase checkpoint after IR and ATM directly phosphorylates FANCD2 at Ser 222 residue [13]. In this work we found that the FANCD2 deficient cell line PD20 shows a very similar impairment in the S-phase checkpoint in response to  $H_2O_2$ . Notably this defect was corrected by the expression of a non-monoubiquitinable FANCD2 but not by the expression of the S222A FANCD2 mutant suggesting that the FA-complex complementation groups (A, B, C, E, F, G, L) do not suffer any S-phase checkpoint impairment after  $H_2O_2$ . This checkpoint defect, as seen in FANCD2 deficient cells, could explain why patients with mutation in the FANCD2 gene have a more severe phenotype, suggesting critical

functions for the FANCD2 protein independent of the FA pathway [51].

The defect in the S-phase checkpoint response after oxidative damage could be particularly relevant for actively replicating cells such as epithelial and hematopoietic stem cells. In this context, our finding on the coordinated action of FANCD2 and ATM to control the S-phase checkpoint in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provides a mechanistic frame to explain the FA susceptibility to oxidative stress and the reduction in chromosome fragility when FA cells are grown in low oxygen tension [27,48] at least for the FA-D2 complementation group. Given the reported high levels of oxidative stress in FA, probably through overexpression of proinflammatory factors, this type of studies could be clinically relevant in the future to find a way to alleviate the severity of this devastating disease.

### Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgments

JS laboratory is funded by the Generalitat de Catalunya (SGR0489-2009), the La Caixa Foundation Oncology Program (BM05-67-0), Fundación Genoma España, the Spanish Ministry of Science and Innovation (projects FIS PI06-1099, CB06/07/0023, SAF2006-3440 and SAF2009-11936), the Commission of the European Union (project RISC-RAD F16R-CT-2003-508842), and the European Regional Development Funds. CIBERER is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. PC is supported by the Spanish Ministry of Education and Science (FPU grant).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.dnarep.2011.02.007](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.02.007).

### References

- [1] E. Callen, J.A. Casado, M.D. Tischkowitz, J.A. Bueren, A. Creus, R. Marcos, A. Dasi, J.M. Estella, A. Munoz, J.J. Ortega, J. de Winter, H. Joenje, D. Schindler, H. Hanenberg, S.V. Hodgson, C.G. Mathew, J. Surrallés, A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain, *Blood* 105 (2005) 1946–1949.
- [2] D.I. Kutler, B. Singh, J. Satagopan, S.D. Batish, M. Berwick, P.F. Giampietro, H. Hanenberg, A.D. Auerbach, A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR), *Blood* 101 (2003) 1249–1256.
- [3] W. Wang, Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 735–748.
- [4] A. Meindl, H. Hellebrand, C. Wiek, V. Erven, B. Wappenschmidt, D. Niederacher, M. Freund, P. Lichtner, L. Hartmann, H. Schaal, J. Ramser, E. Honisch, C. Kubisch, H.E. Wichmann, K. Kast, H. Deissler, C. Engel, B. Muller-Myhsok, K. Neveling, M. Kiechle, C.G. Mathew, D. Schindler, R.K. Schmutzler, H. Hanenberg, Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene, *Nat. Genet.* 42 (2010) 410–414.
- [5] F. Vaz, H. Hanenberg, B. Schuster, K. Barker, C. Wiek, V. Erven, K. Neveling, D. Endt, I. Kesterton, F. Autore, F. Fraternali, M. Freund, L. Hartmann, D. Grimwade, R.G. Roberts, H. Schaal, S. Mohammed, N. Rahman, D. Schindler, C.G. Mathew, Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder, *Nat. Genet.* 42 (2010) 406–409.
- [6] T.R. Singh, S.T. Bakker, S. Agarwal, M. Jansen, E. Grassman, B.C. Godthelp, A.M. Ali, C.H. Du, M.A. Roommans, Q. Fan, K. Wahengbam, J. Steltenpool, P.R. Andreassen, D.A. Williams, H. Joenje, J.P. de Winter, A.R. Meetei, Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M, *Blood* 114 (2009) 174–180.
- [7] I. Garcia-Higuera, T. Taniguchi, S. Ganesan, M.S. Meyn, C. Timmers, J. Hejna, M. Grompe, A.D. D'Andrea, Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway, *Mol. Cell.* 7 (2001) 249–262.
- [8] A. Smogorzewska, S. Matsuo, P. Vinciguerra, E.R. McDonald 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, B.A. Ballif, S.P. Gygi, K. Hofmann, A.D. D'Andrea, S.J. Elledge, Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair, *Cell* 129 (2007) 289–301.
- [9] A.R. Meetei, J.P. de Winter, A.L. Medhurst, M. Wallisch, Q. Waisfisz, H.J. van de Vrugt, A.B. Oostra, Z. Yan, C. Ling, C.E. Bishop, M.E. Hoatlin, H. Joenje, W. Wang, A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia, *Nat. Genet.* 35 (2003) 165–170.
- [10] S. Longerich, J. San Filippo, D. Liu, P. Sung, FANCI binds branched DNA and is mono-ubiquitinated by UBE2T-FANCL, *J. Biol. Chem.* (2009).
- [11] V. Castillo, O. Cabre, R. Marcos, J. Surrallés, Molecular cloning of the *Drosophila* Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA, *DNA Repair (Amst)* 2 (2003) 751–758.
- [12] L.R. Marek, A.E. Bale, *Drosophila* homologs of FANCD2 and FANCL function in DNA repair, *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 1317–1326.
- [13] T. Taniguchi, I. Garcia-Higuera, B. Xu, P.R. Andreassen, R.C. Gregory, S.T. Kim, W.S. Lane, M.B. Kastan, A.D. D'Andrea, Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways, *Cell* 109 (2002) 459–472.
- [14] P.R. Andreassen, A.D. D'Andrea, T. Taniguchi, ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response, *Genes Dev.* 18 (2004) 1958–1963.
- [15] P. Pichierri, F. Rosselli, The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways, *Embo J.* 23 (2004) 1178–1187.
- [16] C. Jacquemont, T. Taniguchi, The Fanconi anemia pathway and ubiquitin, *BMC Biochem.* 1 (Suppl. 8) (2007) S10.
- [17] S. Hussain, J.B. Wilson, A.L. Medhurst, J. Hejna, E. Witt, S. Ananth, A. Davies, J.Y. Masson, R. Moses, S.C. West, J.P. de Winter, A. Ashworth, N.J. Jones, C.G. Mathew, Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 1241–1248.
- [18] M. Bogliolo, A. Lyakhovich, E. Callen, M. Castella, E. Cappelli, M.J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, R. Kalb, K. Neveling, D. Schindler, J. Surrallés, Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability, *Embo J.* 26 (2007) 1340–1351.
- [19] J.B. Wilson, K. Yamamoto, A.S. Marriott, S. Hussain, P. Sung, M.E. Hoatlin, C.G. Mathew, M. Takata, L.H. Thompson, G.M. Kupfer, N.J. Jones, FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3, *Oncogene* 27 (2008) 3641–3652.
- [20] T. Taniguchi, I. Garcia-Higuera, P.R. Andreassen, R.C. Gregory, M. Grompe, A.D. D'Andrea, S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51, *Blood* 100 (2002) 2414–2420.
- [21] A.D. D'Andrea, M. Grompe, The Fanconi anaemia/BRCA pathway, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 23–34.
- [22] K. Nakanishi, Y.G. Yang, A.J. Pierce, T. Taniguchi, M. Digweed, A.D. D'Andrea, Z.Q. Wang, M. Jasin, Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 1110–1115.
- [23] S. Houghtaling, A. Newell, Y. Akkari, T. Taniguchi, S. Olson, M. Grompe, Fancd2 functions in a double strand break repair pathway that is distinct from non-homologous end joining, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 3027–3033.
- [24] A.A. Clarke, N.J. Philpott, E.C. Gordon-Smith, T.R. Rutherford, The sensitivity of Fanconi anaemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking, *Br. J. Haematol.* 96 (1997) 240–247.
- [25] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London, 1987.
- [26] G. Pagano, P. Degan, M. d'Ischia, F.J. Kelly, B. Nobili, F.V. Pallardo, H. Youssoufian, A. Zatterale, Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype, *Eur. J. Haematol.* 75 (2005) 93–100.
- [27] H. Joenje, A.B. Oostra, Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi anaemia, *Hum. Genet.* 65 (1983) 99–101.
- [28] M. D'Errico, E. Parlanti, E. Dogliotti, Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology, *Mutat. Res.* 659 (2008) 4–14.
- [29] Q.S. Zhang, L. Eaton, E.R. Snyder, S. Houghtaling, J.B. Mitchell, M. Finegold, C. Van Waes, M. Grompe, Tempol protects against oxidative damage and delays epithelial tumor onset in Fanconi anemia mice, *Cancer Res.* 68 (2008) 1601–1608.
- [30] G. Pagano, L.G. Korkina, P. Degan, D. Del Principe, B. Lindau-Shepard, A. Zatterale, C. Franceschi, In vitro hypersensitivity to oxygen of Fanconi anemia (FA) cells is linked to ex vivo evidence for oxidative stress in FA homozygotes and heterozygotes, *Blood* 89 (1997) 1111–1112.
- [31] P. Degan, S. Bonassi, M. De Caterina, L.G. Korkina, L. Pinto, F. Scopacasa, A. Zatterale, R. Calzone, G. Pagano, In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families, *Carcinogenesis* 16 (1995) 735–741.
- [32] G. Mace-Aime, S. Couve, B. Khassenov, F. Rosselli, M.K. Saparbaev, The Fanconi anemia pathway promotes DNA glycosylase-dependent excision of interstrand DNA crosslinks, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2010) 508–519.
- [33] T.K. Hazra, T. Izumi, I. Boldogh, B. Imhoff, Y.W. Kow, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, S. Mitra, Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 3523–3528.
- [34] A. Barzilai, G. Rotman, Y. Shiloh, ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage, *DNA Repair (Amst)* 1 (2002) 3–25.
- [35] C. Barlow, P.A. Dennery, M.K. Shigenaga, M.A. Smith, J.D. Morrow, L.J. Roberts 2nd, A. Wynshaw-Boris, R.L. Levine, Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 9915–9919.
- [36] W.C. Chou, H.C. Wang, F.H. Wong, S.L. Ding, P.E. Wu, S.Y. Shieh, C.Y. Shen, Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair, *Embo J.* 27 (2008) 3140–3150.

- [37] D. Ballmaier, B. Epe, DNA damage by bromate: mechanism and consequences, *Toxicology* 221 (2006) 166–171.
- [38] S. Kawanishi, M. Murata, Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress, *Toxicology* 221 (2006) 172–178.
- [39] E. Callen, E. Samper, M.J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, J.J. Ortega, T. Olive, I. Badell, M.A. Blasco, J. Surralles, Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 439–444.
- [40] G. Frosina, P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L.S. Cox, D.P. Lane, A. Abbondandolo, E. Dogliotti, Two pathways for base excision repair in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9573–9578.
- [41] E. Cappelli, P. Degan, G. Frosina, Comparative repair of the endogenous lesions 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (8-oxoG), uracil and abasic site by mammalian cell extracts: 8-oxoG is poorly repaired by human cell extracts, *Carcinogenesis* 21 (2000) 1135–1141.
- [42] M. Tanaka, J.S. Lai, W. Herr, Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter, *Cell* 68 (1992) 755–767.
- [43] M. Bogliolo, R.M. Taylor, K.W. Caldecott, G. Frosina, Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells, *Oncogene* 19 (2000) 5781–5787.
- [44] B. Xia, Q. Sheng, K. Nakanishi, A. Ohashi, J. Wu, N. Christ, X. Liu, M. Jasin, F.J. Couch, D.M. Livingston, Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2, *Mol. Cell.* 22 (2006) 719–729.
- [45] G.W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L.S. Beese, Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase, *Nature* 431 (2004) 217–221.
- [46] E. Cappelli, O. Rossi, L. Chessa, G. Frosina, Efficient DNA base excision repair in ataxia telangiectasia cells, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6883–6887.
- [47] J.A. Imlay, S.M. Chin, S. Linn, Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro, *Science* 240 (1988) 640–642.
- [48] H. Saito, A.T. Hammond, R.E. Moses, Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells, *Mutat. Res.* 294 (1993) 255–262.
- [49] R.W. Sobol, J.K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R.K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky, S.H. Wilson, Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair, *Nature* 379 (1996) 183–186.
- [50] E. Cappelli, R. Taylor, M. Cevasco, A. Abbondandolo, K. Caldecott, G. Frosina, Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23970–23975.
- [51] A. Lyakhovich, J. Surralles, New roads to FA/BRCA pathway: H2AX, *Cell Cycle* 6 (2007) 1019–1023.

## Agraïments

A tots aquells científics que d'alguna manera o altre m'han contagiats la seva **energia**, **passió**, **il·lusió** i **motivació** per explorar amb perseverança tot allò que és desconegut. I en especial als meus primers supervisors, en Thomas Stratmann i en Niels de Wind per introduir-me en aquest fantàstic món i fer-me sentir un més des del primer moment. A les meves companyes de laboratori i guies espirituals Elsa Callén i Maria Castellà. A la gran Maria Jasin per acollir-me i obrir de bat a bat el seu laboratori als meus ulls d'aprenent. I finalment, al meu supervisor durant aquests 4 llargs anys, en Massimo Bogliolo, per les seves llarguíssimes i profitoses discussions científiques i a en Jordi Surrallés, per donar-me la oportunitat del retorn a casa i per demostrar-me que la ciència més bàsica té una cara més humana i aplicada en pacients i les seves famílies. A tots els meus companys, presents i passats dels laboratoris amb qui he compartit molt bones estones i moments, tècnics, doctorands, estudiants de màster i postdocs.

Al meu pare i a la meva mare per incentivar-me sempre la **creativitat** i la **curiositat** per tot el que m'envolta i per educar-me amb esperit **crític** i **inconformista**. Al meu germà, per ensenyar-me a **compartir** i per transmetre'm els somnis d'un lluitador incombustible. A la meva àvia, per ensenyar-me a viure amb un somriure als llavis.

Als meus amics, per transmetre'm els valors més essencials d'**alegria** en estat pur, de **diversió** i de felicitat. Per tots els bons moments viscuts, passats, presents i **futurs** a diferents racons de món. Sílvia, Mimi i Airó, Cristina, Nikos, Daniel, a tots els de la colla de Molins, a tots aquells amb qui varem caminar plegats durant la dolça època universitària i a tots els que van formar part de la màgica bombolla holandesa.

A la Griselda, per fer-me viure intensament amb **amor** i permetre'm somiar en un món més lliure i digne.

**Ciència** *f* [lèxic comú][biologia]. Alegria, amor, cooperació, creativitat, crítica, curiositat, diversió, energia, futur, il·lusió, inconformisme, motivació i passió.

Pau Castillo Bosch  
Molins de Rei, Gener de 2012





## ITACA

Quan surts per fer el viatge cap a Itaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.  
Has de pregar que el camí sigui llarg,  
que siguin moltes les matinades  
que entraràs en un port  
que els teus ulls ignoraven,  
i vagis a ciutats  
per aprendre del que saben.  
Has d'arribar-hi, és el teu destí,  
però no forçis gens la travessia.  
És preferible que duri molts anys,  
que siguis vell quan fondegis l'illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat  
fent el camí, sense esperar  
que et doni més riqueses.  
Itaca t'ha donat el bell viatge,  
sense ella no hauries sortit.  
I si la trobes pobra, no és que Itaca  
t'hagi enganyat. Savi, com bé t'has fet,  
sabràs el que volen dir les Itagues.

Més lluny, heu d'anar més lluny  
dels arbres caiguts que ara us empresonen,  
i quan els haureu guanyat  
tingueu ben present no aturar-vos.

Més lluny, sempre aneu més lluny,  
més lluny de l'avui que ara us encadena.  
I quan sereu deslliurats  
torneu a començar els nous passos.

Més lluny, sempre molt més lluny,  
més lluny del demà que ara s'acosta.  
I quan creieu que arribeu,  
sapigueu trobar noves sendes.

Més lluny, sempre molt més lluny,  
més lluny del demà que ara ja s'acosta  
I, quan sereu deslliurats  
tingueu ben present de no aturar-vos

Bon viatge per als guerrers  
que al seu poble són fidels,  
afavoreixi el Déu dels vents  
el velam del seu vaixell,  
i malgrat llur vell combat  
tinguin plaer dels cossos més amants.  
Omplin xarxes de volguts estels  
plens de ventures,  
plens de coneixences.

Bon viatge per als guerrers  
que al seu poble són fidels,  
afavoreixi el Déu dels vents  
el velam del seu vaixell,  
i malgrat llur vell combat  
l'amor ompli el seu cos generós,  
trobin els camins dels vells anhels,  
plens de ventures,  
plens de coneixences.

