

MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

RESOLUCIÓN DE LOS PUENTES DE ADN Y GENERACIÓN DE INESTABILIDAD GENÓMICA

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Facultat de Biociències - UAB Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Neil Joseph Ganem

School Of Medicine - Boston University, Estats Units

1. Resumen

Los puentes cromosómicos son intermediarios comunes en los mecanismos que generan inestabilidad cromosómica. Aunque se sabe que están implicados en la tumorigénesis y la progresión tumoral, los procesos que gobiernan su resolución siguen siendo poco conocidos. Han surgido diversos modelos en cuanto a su resolución. Sin embargo, estos modelos se contradicen entre sí. Barbara McClintock propuso, ya en 1941, que los cromosomas dicéntricos forman puentes y que estos puentes pueden romperse durante la división mitótica (McClintock, 1941). Muchos años después, Janssen y sus colegas sugirieron que, durante la citocinesis, las fuerzas de compresión pueden cortar la cromatina pendiente de segregación, como la que se encuentra en puentes y micronúcleos (Janssen *et al.*, 2011). Por último, estudios recientes han postulado que los puentes no se rompen durante la mitosis sino durante la interfase, ya sea por causas bioquímicas (Maciejowski *et al.*, 2015) o mecánicas (Umbreit *et al.*, 2020). Este proyecto de investigación busca dilucidar los mecanismos implicados en la resolución de los puentes cromosómicos. Nuestra investigación demuestra que los puentes cromosómicos pueden sufrir roturas tanto durante la división celular como durante la interfase, con diferentes mecanismos que gobiernan su rotura en cada etapa del ciclo celular.

En este proyecto coordinado han participado dos equipos de investigación, uno liderado por Anna Genescà, de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), y otro liderado por Neil Ganem, de la Universidad de Boston (BU). Hemos utilizado un modelo experimental basado en la tecnología CRISPR/Cas9 para generar puentes cromosómicos con geometría definida bajo un exquisito control temporal. Nuestro estudio conjunto reveló que, a la salida de la mitosis, la resolución de los puentes cromosómicos está intrincadamente ligada a las fuerzas de tensión impuestas por los microtúbulos del huso mitótico en los cinetocoros del puente, ya que la longitud de la cromatina puente en las megabases influye tanto en el tiempo como en la separación mínima entre los cinetocoros del puente necesarios para la rotura del puente. Después de la mitosis, la endonucleasa ANKLE1 contribuye a la resolución de los puentes cromosómicos, ya que su inhibición da lugar a un aumento de la frecuencia de puentes cromosómicos que alcanzan la interfase del ciclo celular. En particular, descubrimos que ANKLE1 también puede resolver puentes durante la interfase temprana sin necesidad de romper la envoltura nuclear. Por el contrario, un mecanismo alternativo

para la resolución de los puentes cromosómicos que opera durante la interfase se basa en la rotura de la envoltura nuclear. Las adherencias focales que anclan el puente al sustrato, combinadas con la migración independiente de las células hijas, dan como resultado la rotura del ADN y la rotura de la envoltura nuclear, lo que permite la acción de las exonucleasas citoplasmáticas, como TREX1, para la resolución de puentes cromosómicos en esta etapa del ciclo celular. En conjunto, los hallazgos de este proyecto de investigación demuestran que los puentes cromosómicos pueden sufrir roturas en diferentes etapas a lo largo del ciclo celular, lo que revela un conjunto diverso y distintivo de mecanismos que gobiernan la rotura de los puentes cromosómicos.

2. Resultados

1. Resolución de los puentes cromosómicos durante la mitosis

Los resultados obtenidos por el equipo de la UAB revelan que la mayoría de los puentes cromosómicos sufren roturas a la salida de la mitosis, principalmente debido a las fuerzas mecánicas. Nuestros hallazgos entran en conflicto con las afirmaciones de otros investigadores que sugieren que los puentes cromosómicos formados en la anafase invariablemente persisten intactos a través de la mitosis y se desarrollan en conexiones nucleoplasmáticas estables entre las células hijas. Estas discrepancias podrían atribuirse al hecho de que los estudios mencionados anteriormente se centraron en examinar los puentes cromosómicos durante la interfase y descuidaron potencialmente una investigación exhaustiva de la dinámica de los puentes cromosómicos durante la mitosis (Maciejowski *et al.*, 2015; Maciejowski y De Lange, 2017; Steigemann *et al.*, 2009; Umbreit *et al.*, 2020).

Obtuvimos 4 observaciones independientes que apoyan la noción de que la rotura de la molécula de ADN en los puentes cromosómicos durante la mitosis es real. En primer lugar, observamos que la frecuencia de puentes cromosómicos disminuyó a medida que las células avanzaban a través de las últimas etapas de la mitosis, lo que indica que un subconjunto de puentes se resuelve durante la mitosis. En segundo lugar, las células mitóticas examinadas exhibían con frecuencia el marcador DSB de ADN γ H2AX flanqueando la cromatina interrumpida de los puentes, lo que demuestra que las discontinuidades microscópicamente visibles en los puentes cromosómicos representan

de hecho una rotura real de la molécula de ADN. En tercer lugar, utilizando el ensayo STRIDE (un método directo para detectar los extremos libres de 3'-OH en la molécula de ADN), confirmamos que a la salida de la mitosis las discontinuidades flanqueantes del ADN en los puentes cromosómicos presentan de hecho extremos 3'-OH, lo que corresponde a una rotura real de la molécula de ADN. En cuarto lugar, en las grabaciones de imágenes en vivo de células mitóticas que expresan la proteína mediadora de DDR MDC1 conjugada con GFP, fuimos testigos de la retracción de los extremos del puente cromosómico después del reclutamiento de MDC1 en el ADN de puente roto. Todas estas observaciones demuestran la rotura del puente cromosómico durante la mitosis. Por lo tanto, desafiando las premisas previas afirmadas por otros, nuestras observaciones demuestran firmemente la resolución de los puentes cromosómicos durante la mitosis.

Para investigar más a fondo las causas de la rotura de los puentes cromosómicos durante la mitosis, el grupo de la UAB empleó la tecnología CRISPR/Cas9 para inducir roturas de ADN en sitios seleccionados del genoma y generar así puentes cromosómicos con una longitud intercentromérica definida en megabases. Utilizando este enfoque, se generaron 5 líneas celulares de sgRNA diferentes. Observamos que la separación mínima entre cinetocoros requerida para la rotura del puente era característica de cada línea celular y se correlacionaba con la longitud de su cromatina puente. En consecuencia, una mayor distancia en los pares de bases entre los centrómeros del puente aumenta la probabilidad de que el puente persista intacto, lo que lleva al nacimiento de células hijas con un puente. Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que la rotura de los puentes cromosómicos a la salida mitótica puede atribuirse a fuerzas mecánicas inherentes. Específicamente, la fibra continua de ADN experimenta tensión a medida que sus dos cinetocoros son atraídos hacia polos opuestos por los microtúbulos del huso mitótico, lo que puede provocar la rotura. Además, esta tensión está influenciada por la distancia entre centrómeros en pares de bases. Esta correlación se alinea con los principios físicos, ya que los puentes cromosómicos más largos requerirían una mayor separación para acumular suficiente tensión de los microtúbulos unidos a los cinetocoros del puente para romper el puente.

2. Los puentes cromosómicos no resueltos activan la vía p53 pero no la vía Hippo

Las células con puentes cromosómicos a menudo retrasan la finalización de la citocinesis hasta que se resuelve el puente; sin embargo, los puentes que no se resuelven de manera oportuna promueven la regresión del surco citocinético, el fracaso de la citocinesis y la tetraploidía. La vía supresora de tumores de Hippo se activa tras el fracaso de la citocinesis y limita la proliferación de las células tetraploides protumorígenas resultantes. El equipo de la BU que participó en este proyecto de investigación buscó determinar si los puentes cromosómicos no resueltos inducen la activación de la vía supresora de tumores Hippo. Nuestros datos demuestran que las células con puentes cromosómicos, ya sea ininterrumpidos o rotos, no activan la vía Hippo, ya que no hay diferencia en la relación nuclear-citoplasmática de YAP en estas células en relación con los controles.

El equipo de la BU también evaluó si las células con puentes cromosómicos ininterrumpidos activan la vía p53. Es bien sabido que una miríada de tensiones celulares, como el daño en el ADN y la tetraploidía, estabilizan p53, lo que conduce a la detención del ciclo celular. Inducimos puentes cromosómicos utilizando el sistema descrito anteriormente y luego teñimos las células hijas resultantes para p53. A continuación, cuantificamos los niveles de p53 nuclear en células con y sin puentes. Encontramos que los puentes cromosómicos ininterrumpidos inducen un aumento estadísticamente significativo en los niveles de p53. Estos datos indican que los puentes ininterrumpidos emiten una señal de estrés a p53, que no depende de la activación de la vía Hippo.

3. Cribado de ARNi para identificar exonucleasas y endonucleasas que promueven la rotura de puentes cromosómicos

Observamos mediante imágenes de células vivas que, después de generarse, los puentes cromosómicos se rompen en el siguiente ciclo celular. Un modelo postula que esta rotura se debe enteramente a las fuerzas mecánicas de tracción de las células que migran, separándose las unas de las otras, lo que hace que el puente se estire y, en última instancia, se rompa. Sin embargo, un modelo no mutuamente excluyente es que esta rotura también se ve facilitada por la acción de las exonucleasas y endonucleasas en la célula, que acceden al ADN cromosómico en el puente después de la rotura de la envoltura nuclear. Para probar este segundo modelo, el equipo de la BU realizó un cribado de ARNi basado en imágenes de células vivas dirigido a 38 exonucleasas y endonucleasas humanas. Planteamos la hipótesis de que las exonucleasas y endonucleasas específicas son importantes para promover la rotura del puente. De ser cierto, se esperaría que la pérdida de estas nucleasas aumentara significativamente la cantidad de tiempo que tardan los puentes en romperse, lo que aumentaría la fracción de células con puentes cromosómicos. Nuestros datos indicaron que la depleción de varias nucleasas aumentó significativamente la fracción de células con puentes cromosómicos en relación con los controles.

Entre todas las nucleasas probadas, la endonucleasa ANKLE1 se identificó como potencialmente involucrada en la resolución de puentes cromosómicos, ya que las células inhibidas por ANKLE1 mostraron un aumento de la frecuencia de puentes cromosómicos en las células de interfase después de la inducción de CRISPR/Cas9 en comparación con las células no inhibidas.

4. Resolución del puente cromosómico durante la citocinesis y la interfase temprana

Los distintos escenarios observados durante la mitosis y la citocinesis sugieren que las causas de la rotura del puente cromosómico pueden ser diferentes. Algunos puentes permanecen intactos y las células que los albergan llegan a la citocinesis experimentando un cambio de escenario que implica el desmontaje del huso mitótico, el reensamblaje de la envoltura nuclear y la citocinesis, que incluye la especificación del plano de escisión, la entrada del surco de escisión, la formación del cuerpo medio y la abscisión. La endonucleasa ANKLE1 podría ser responsable de la resolución del puente cromosómico durante la citocinesis. Nuestra conclusión se basa en la

observación de que la inhibición de ANKLE1 condujo a una mayor frecuencia de células que alcanzaron la interfase con puentes cromosómicos, lo que indica que ANKLE1 tiene un papel en la resolución del puente cromosómico antes de la interfase. Los resultados de la BU se alinean con los reportados por otros estudios que sugirieron que el ortólogo de *C. elegans* de ANKLE1 resuelve los puentes de cromatina (Hong *et al.*, 2018), y que ANKLE1 se recluta en la región del cuerpo medio para resolver las células humanas atrapadas de cromatina (Jiang *et al.*, 2023). Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que ANKLE1 puede contribuir a la rotura del puente cromosómico durante la citocinesis.

Aunque ANKLE1 se recluta en la región media del cuerpo durante la citocinesis, podría ser responsable de la rotura del puente cromosómico en la interfase temprana. De acuerdo con nuestros resultados, durante la interfase coexisten dos tipos de puentes, los puentes de corta duración, que se resuelven independientemente de la reparación por escisión de nucleótidos (NER), y los puentes de larga duración, que experimentan la NER antes de su resolución. Que ANKLE1 tiene un papel durante la interfase es evidente a partir de la observación de que la inhibición de ANKLE1 o el impedimento de su reclutamiento reduce la fracción de puentes que se resuelven en poco tiempo y a través de un mecanismo independiente de la NER. ANKLE1 se localiza en el citoplasma durante la interfase debido a su señal de exportación nuclear (Zlopasa *et al.*, 2016) y es reclutado en la zona media del huso durante la citocinesis. Por lo tanto, las células con puentes cromosómicos resueltos por ANKLE1 durante la interfase podrían haber reclutado esta enzima antes de pasar a la interfase.

5. Resolución de puentes cromosómicos durante la interfase

Las células que albergan puentes cromosómicos pueden progresar a través de la interfase del ciclo celular y, con frecuencia, exhiben un colapso de la envoltura nuclear que rodea el puente. El análisis de imágenes de células vivas nos ha permitido esbozar una secuencia de observaciones. En general, las células con puentes cromosómicos nacen con una envoltura nuclear no rota que rodea los núcleos primarios de las células hijas y el puente. Mientras tanto, las dos células hijas recién nacidas migran alejándose la una de la otra. Abruptamente, los puentes sufren NER, pero las células continúan migrando. De repente, el puente se vuelve discontinuo. Aunque la NER precede la rotura del puente, el momento de la aparición de la NER no se correlaciona con el

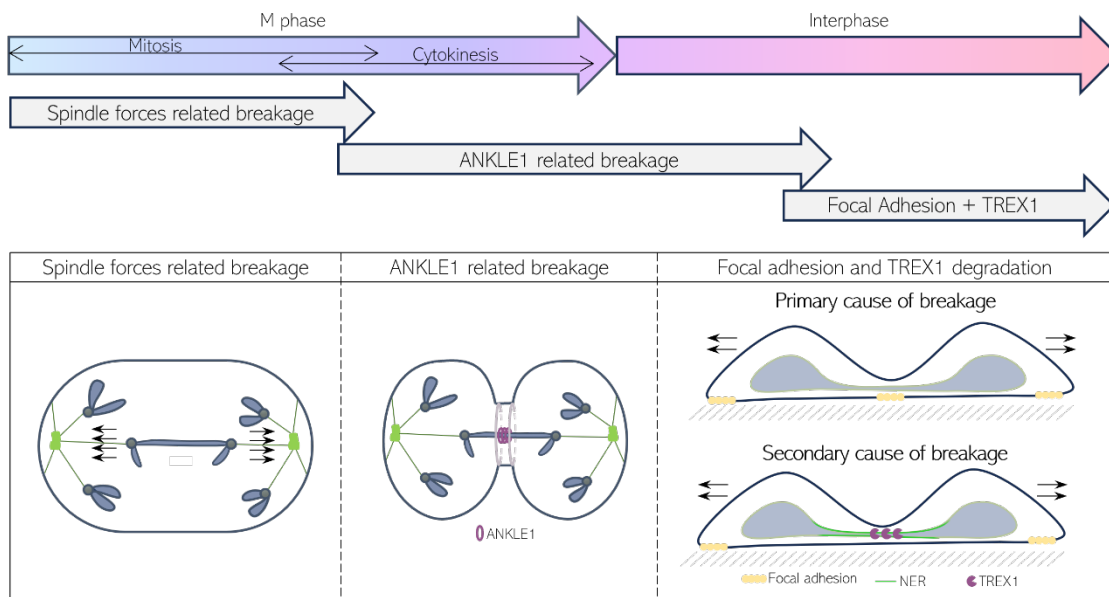
momento de la rotura del puente, lo que indica un posible papel facilitador de la NER en el evento de la rotura.

Durante la interfase del ciclo celular, la resolución de los puentes cromosómicos depende de su anclaje al sustrato a través de adherencias focales. Este anclaje, a su vez, desencadena la NER y permite el reclutamiento de TREX1, una exonucleasa citoplasmática. Esta conclusión se basa en cuatro observaciones. En primer lugar, los puentes cromosómicos a menudo muestran paxilina, un componente clave de las adherencias focales, lo que indica su anclaje al sustrato. En segundo lugar, al reducir la fuerza de adhesión focal a través de la inhibición de la fosforilación de la cadena ligera de miosina, tanto la NER como la resolución del puente se retrasan. Esto demuestra que la NER y la resolución del puente cromosómico dependen de la adhesión de las células hijas al sustrato. En tercer lugar, TREX1 se recluta solo en los puentes que exhiben NER, lo que apoya la idea de que, tras el colapso de NE, la mayoría de los puentes reclutan la exonucleasa TREX1 asociada a ER. En cuarto lugar, la exonucleasa TREX1 requiere una rotura inicial para comenzar a degradar el ADN. Nuestros resultados muestran que los puentes que exhiben BAF brillante tienen más probabilidades de tener DSB que los puentes BAF basales. Dada la asociación entre el BAF brillante y la adhesión focal, se puede inferir que la adhesión focal puede contribuir a facilitar la muesca inicial del ADN requerida para la actividad de TREX1. En conjunto, nuestras observaciones sugieren que la migración de las células con puentes cromosómicos, junto con la presencia de adhesión focal debajo de la cromatina puente, puede facilitar la NER y la rotura de la molécula de ADN dentro del puente. Estos eventos son cruciales para reclutar la exonucleasa TREX1 y para permitir la digestión del ADN dentro de los puentes cromosómicos.

En resumen, la resolución de los puentes cromosómicos durante la interfase surge de la sinergia entre los procesos mecánicos y bioquímicos. Las células que albergan puentes cromosómicos en la interfase se comportan como dos entidades separadas, que migran alejándose la una de la otra pero conectadas por el puente, a menudo ancladas al sustrato a través de la adhesión focal. Esta combinación de eventos inicia la resolución del puente durante la interfase y desencadena la NER. Posteriormente, TREX1 es reclutado en el puente para digerir el ADN dentro de la envoltura nuclear rota. Es importante destacar que esta exonucleasa requiere una rotura inicial, que podría ser el resultado de adherencias focales o mecanismos alternativos.

6. Dinámica de la resolución de los puentes cromosómicos: hacia un modelo integrador

La comprensión predominante sostenía que la resolución del puente es impulsada por un solo mecanismo, ya sea dirigido por TREX1 (Maciejowski *et al.*, 2015) o por las fuerzas de estiramiento aplicadas por el citoesqueleto (Umbreit *et al.*, 2020). Sin embargo, los resultados presentados en este estudio demuestran que los puentes cromosómicos se resuelven a través de diversos mecanismos en diferentes etapas del ciclo celular. En consecuencia, percibimos la resolución de los puentes cromosómicos como un proceso multifacético. Teniendo en cuenta que la resolución del puente ocurre a lo largo del ciclo celular, con cada etapa adaptada por condiciones ambientales únicas, no es sorprendente que observemos una variedad de mecanismos que gobiernan la resolución del puente (figura 1). Durante la mitosis, la rotura se produce principalmente debido a factores mecánicos, impulsados por las fuerzas de tracción ejercidas por el huso mitótico. Además, algunos puentes persisten más allá de la telofase, y la endonucleasa ANKLE1 reclutada durante la citocinesis degrada los puentes cromosómicos, lo que provoca la rotura del puente. Por último, los puentes que no se han resuelto ni durante la mitosis por causas mecánicas ni después por mecanismos bioquímicos pueden tener una nueva oportunidad de resolverse durante la interfase. A pesar de estar conectadas por el puente nucleoplasmático, las células que nacen con puentes cromosómicos no resueltos migran alejándose las unas de las otras. En estas circunstancias, entendemos que la resolución de los puentes cromosómicos durante la interfase depende de una serie de procesos mecánicos y bioquímicos. Las fuerzas de adhesión de los puentes al sustrato contribuyen a la rotura de NER y ADN, y estos eventos, a su vez, facilitan la entrada de la enzima TREX para completar la resolución del puente.



3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Comprender los diferentes mecanismos por los que los puentes se resuelven es crucial, ya que los posibles resultados que se deriven de estos mecanismos de resolución pueden variar significativamente. Especulamos que, a nivel celular, la extensión del daño en el ADN puede variar dependiendo del mecanismo involucrado. Los procesos que actúan de manera localizada, como las fuerzas de tracción de los microtúbulos o la actividad de ANKLE1, probablemente resulten en menos daño en comparación con los mecanismos que involucran enzimas como TREX1, que degradan el ADN a lo largo del área del puente cromosómico que sufre la NER. A nivel del organismo, la NER conduce a la exposición del contenido nuclear al citoplasma, lo que puede desencadenar consecuencias como la activación de la proteína citosólica de unión al ADN cGAS, que puede iniciar la respuesta inmunitaria innata. Esta activación es particularmente potente cuando el cGAS interactúa con el ADN que carece de organización de nucleosomas (Kujirai *et al.*, 2020), como puede ocurrir en puentes cromosómicos. Sin embargo, la acumulación de BAF (Guey *et al.*, 2020) o TREX1 (Mohr *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021) puede obstaculizar la vía cGAS-STING. Por lo tanto, los puentes cromosómicos con BAF elevado o procesados por TREX1 también podrían impedir la señalización de cGAS. Dadas las incertidumbres, se necesita más investigación para determinar si los puentes cromosómicos con NER activan el sistema inmunitario.

La investigación descrita en el proyecto de investigación contribuye a resolver debates de larga duración en torno a la resolución de puentes cromosómicos. Este estudio revela un modelo para la resolución de puentes cromosómicos, por lo que arroja luz sobre los procesos mecánicos y bioquímicos que operan de manera dependiente del ciclo celular. Estos hallazgos tienen implicaciones significativas para la comprensión de la inestabilidad genómica en las células cancerosas, en las que la presencia de puentes cromosómicos puede contribuir a ciclos de alteraciones del ADN que culminan en inestabilidad cromosómica.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones directamente derivadas del proyecto de investigación financiado por la Fundació La Marató

1. Rodríguez-Muñoz M, Anglada T, Genescà A.

A matter of wrapper: Defects in the nuclear envelope of lagging and bridging chromatin threatens genome integrity.

Semin Cell Dev Biol. 2022 Mar;123:124-130. doi: 10.1016

2. Rodríguez-Muñoz M, Serrat M, Soler D, Genescà A, Anglada T.

Breakage of CRISPR/Cas9-Induced Chromosome Bridges in Mitotic Cells.

Front Cell Dev Biol. 2021 Sep 28;9:745195. doi: 10.3389/fcell.2021.745195.

3. González-Bermúdez L, Genescà A, Terradas M, Martín M.

Role of H4K16 acetylation in 53BP1 recruitment to double-strand break sites in in vitro aged cells.

Biogerontology. 2022 Aug;23(4):499-514. doi: 10.1007/s10522-022-09979-6.

Manuscritos listos para su envío:

4. *Engineering Chromosome Bridges through CRISPR/Cas9: Deciphering the Impact of Intercentromeric Distance on the Resolution Dynamics.*

5. *Unveiling Chromosome Bridge Resolution beyond Mitosis: Contribution of Physical- and Biochemical-based mechanisms.*

Manuscritos en preparación

6. *Unresolved chromosome bridges activate the p53 pathway but not the Hippo pathway.*

Ponencias en congresos científicos directamente derivados del proyecto de investigación

1. Rodríguez-Muñoz M, Serrat M, Soler D, Anglada T, Genescà A.

Resolution of DNA bridges: stage-dependent mechanisms.

VI Jornades de Biorecerca. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Junio de 2021.

2. Rodríguez-Muñoz M, Serrat M, Anglada T, Genescà A.

Breakage of chromosome bridges during mitosis: Relevance of mechanical stress.

The Consequences of Aneuploidy Conference. Massachusetts, 11-16 de septiembre de 2022

3. Rodríguez-Muñoz M, Serrat M, Anglada T, Genescà A.

Breakage of chromosome bridges during mitosis: relevance of mechanical stress.

VIII Jornades de Biorecerca. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. 15 de junio de 2023.

4. Pulido N, Rodríguez-Muñoz M, Anglada T, Genescà A.

Multiwalled Carbon Nanotubes, a physical barrier to cell division.

VIII Jornades de Biorecerca. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. 15 de junio de 2023.