



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

RESOLUCIÓ DELS PONTS DE DNA I GENERACIÓ D'INESTABILITAT GENÒMICA

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Facultat de Biociències - UAB Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Neil Joseph Ganem

School Of Medicine - Boston University, Estats Units

1. Resum

Els ponts cromosòmics són intermediaris comuns en els mecanismes que generen inestabilitat cromosòmica. Tot i que se sap que estan implicats en la tumorigènesi i la progressió tumoral, els processos que en regeixen la resolució continuen sent poc coneguts, tot i que han sorgit diversos models pel que fa a la resolució. No obstant això, aquests models es contradiuen entre si. Barbara McClintock va proposar, el 1941, que els cromosomes dicèntrics formen ponts i que aquests ponts es poden trencar durant la divisió mitòtica (McClintock, 1941). Molts anys més tard, Janssen i els seus col·legues van suggerir que, durant la citocinesi, les forces de compressió poden tallar la cromatina pendent de segregació, com la que es troba en ponts i micronuclis (Janssen *et al.*, 2011). Finalment, estudis recents postulen que els ponts no es trenquen durant la mitosi, sinó durant la interfase, ja sigui per causes bioquímiques (Maciejowski *et al.*, 2015) o mecàniques (Umbreit *et al.*, 2020). Aquest projecte de recerca busca dilucidar els mecanismes implicats en la resolució dels ponts cromosòmics. La nostra recerca demostra que els ponts cromosòmics poden patir trencaments tant durant la divisió cel·lular com durant la interfase, amb diferents mecanismes que en regeixen el trencament en cada etapa del cicle cel·lular. En aquest projecte coordinat han participat dos equips de recerca, un de liderat per Anna Genescà, de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), i un altre de liderat per Neil Ganem, de la Universitat de Boston (BU). Hem utilitzat un model experimental basat en la tecnologia CRISPR/Cas9 per generar ponts cromosòmics de geometria definida sota un control temporal exquisit. El nostre estudi conjunt va revelar que, a la sortida de la mitosi, la resolució dels ponts cromosòmics està intricadament lligada a les forces de tensió imposades pels microtúbuls del fus mitòtic sobre els cinetocors del pont, ja que la longitud de la cromatina pont en megabases influeix tant en el moment com en la separació mínima entre els cinetocors del pont necessaris per al seu trencament. Després de la mitosi, l'endonucleasa ANKLE1 contribueix a la resolució dels ponts cromosòmics, ja que la seva inhibició resulta en una freqüència més alta de ponts cromosòmics que arriben a la interfase del cicle cel·lular. En concret, vam descobrir que ANKLE1 també pot resoldre ponts durant la interfase primerenca sense necessitat de ruptura de l'embolcall nuclear. Per contra, un mecanisme alternatiu per a la resolució dels ponts cromosòmics que opera durant la interfase es basa en la ruptura de l'embolcall nuclear. Les adherències focals que ancoren el pont al substrat combinades amb una migració independent de les cèl·lules filles donen lloc al

trencament del DNA i a la ruptura de l'embolcall nuclear, cosa que permet l'acció de les exonucleases citoplasmàtiques, com TREX1, per a la resolució dels ponts cromosòmics en aquesta etapa del cicle cel·lular. En conjunt, les troballes d'aquest projecte de recerca demostren que els ponts cromosòmics poden patir trencaments en diferents etapes al llarg del cicle cel·lular, i això revela un conjunt divers i distintiu de mecanismes que governen el trencament dels ponts cromosòmics.

2. Resultats

1. Resolució dels ponts cromosòmics durant la mitosi

Els resultats obtinguts per l'equip de la UAB revelen que la majoria de ponts cromosòmics pateixen trencaments a la sortida de la mitosi, principalment a causa de les forces mecàniques. Les nostres troballes entren en conflicte amb les declaracions d'altres investigadors que suggereixen que els ponts cromosòmics formats a l'anafase persisteixen invariablement intactes a través de la mitosi i es desenvolupen en connexions nucleoplasmàtiques estables entre cèl·lules filles. Aquestes discrepàncies es podrien atribuir al fet que els estudis referenciats anteriorment es van centrar a examinar els ponts cromosòmics durant la interfase, i potencialment van negligir una investigació exhaustiva de la dinàmica dels ponts cromosòmics durant la mitosi (Maciejowski *et al.*, 2015; Maciejowski i De Lange, 2017; Steigemann *et al.*, 2009; Umbreit *et al.*, 2020).

Vam obtenir 4 observacions independents que donen suport a la noció que el trencament de la molècula de DNA en ponts cromosòmics durant la mitosi és real. En primer lloc, vam observar que la freqüència de ponts cromosòmics disminuïa a mesura que les cèl·lules progressaven en les últimes etapes de la mitosi, la qual cosa indica que un subconjunt de ponts es resol durant la mitosi. En segon lloc, les cèl·lules mitòtiques examinades van exhibir amb freqüència el marcador de DSB de DNA γ H2AX flanquejant la cromatina interrompuda dels ponts, fet que demostra que les discontinuïtats microscòpiques visibles en els ponts cromosòmics representen efectivament un trencament real de la molècula de DNA. En tercer lloc, utilitzant l'assaig STRIDE (un mètode directe per detectar extrems lliures de 3'-OH a la molècula de DNA), vam confirmar que a la sortida de la mitosi les discontinuïtats del flanqueig del DNA en els ponts cromosòmics presenten extrems 3'-OH, per tant, correspon al

trencament real de la molècula de DNA. En quart lloc, en enregistraments d'imatges en viu de cèl·lules mitòtiques que expressen la proteïna mediadora DDR MDC1 conjugada a la GFP, vam presenciar la retracció dels extrems del pont cromosòmic després del reclutament d'MDC1 al DNA de pont trencat. Totes aquestes observacions demostren el trencament del pont cromosòmic durant la mitosi. Per tant, desafiant les premisses anteriors afirmades per altres autors, les nostres observacions demostren fermament la resolució dels ponts cromosòmics durant la mitosi.

Per investigar més a fons les causes del trencament del pont cromosòmic durant la mitosi, el grup de la UAB va utilitzar la tecnologia CRISPR/Cas9 per induir trencaments de DNA en llocs seleccionats del genoma i generar així ponts cromosòmics amb longitud intercentromèrica definida en megabases. Utilitzant aquest enfocament, es van generar 5 línies cel·lulars d'sgRNA diferents. Vam observar que la separació mínima entre cinetocors necessària per al trencament del pont era característica de cada línia cel·lular i es correlacionava amb la longitud de la seva cromatina pont. En conseqüència, una distància més gran en parells de bases entre els centròmers del pont augmenta la probabilitat que el pont persisteixi intacte, cosa que dona lloc al naixement de cèl·lules filles amb un pont. En conjunt, els nostres resultats indiquen que el trencament dels ponts cromosòmics a la sortida mitòtica es pot atribuir a forces mecàniques inherents. Concretament, la fibra contínua de DNA experimenta tensió, ja que els seus dos cinetocors són arrossegats cap als pols oposats pels microtúbuls del fus mitòtic, cosa que en pot provocar el trencament. A més, aquesta tensió està influenciada per la distància entre els centròmers en parells de bases. Aquesta correlació s'alinea amb els principis físics, ja que els ponts cromosòmics més llargs requeririen una separació més gran per acumular prou tensió dels microtúbuls units als cinetocors del pont per trencar-lo.

2. Els ponts cromosòmics no resolts activen la via p53, però no la via Hippo

Les cèl·lules amb ponts cromosòmics sovint retarden la finalització de la citocinesi fins que es resol el pont. No obstant això, els ponts que no es resolen a temps promouen la regressió del solc citocinètic, la fallada de la citocinesi i la tetraploïdia. La via supressora de tumors Hippo s'activa després del fracàs de la citocinesi i limita la proliferació de les cèl·lules tetraploides protumorigenes resultants. L'equip de la BU que va participar en aquest projecte de recerca va intentar determinar si els ponts cromosòmics no resolts indueixen l'activació de la via supressora de tumors Hippo. Les

nostres dades demostren que les cèl·lules amb ponts cromosòmics, ja siguin ininterromputs o trencats, no activen la via Hippo, ja que no hi ha diferències en la relació nuclear-citoplasmàtica de YAP en aquestes cèl·lules en relació amb els controls. L'equip de la BU també va avaluar si les cèl·lules amb ponts cromosòmics ininterromputs activen la via p53. És ben sabut que miríades d'estrès cel·lular, com el dany al DNA i la tetraploïdia, estableixen p53, fet que condueix a l'aturada del cicle cel·lular. Vam induir ponts cromosòmics utilitzant el sistema descrit anteriorment i després vam tenyir les cèl·lules filles resultants per a p53. A continuació, vam quantificar els nivells nuclears de p53 en cèl·lules amb ponts i sense. Vam trobar que els ponts cromosòmics ininterromputs indueixen un augment estadísticament significatiu dels nivells de p53. Aquestes dades indiquen que els ponts ininterromputs emeten un senyal d'estrès a p53, que no depèn de l'activació de la via Hippo.

3. Cribratge d'RNAi per identificar exonucleases i endonucleases que promouen el trencament del pont cromosòmic

Vam observar mitjançant imatges de cèl·lules vives que, després de generar-los, els ponts cromosòmics es trenquen en el següent cicle cel·lular. Un model postula que aquest trencament es deu completament a les forces mecàniques de tracció de les cèl·lules que migren, separant-se les unes de les altres, cosa que fa que el pont s'estiri i, finalment, es trenqui. No obstant això, un model no mútuament exclouent és que aquest trencament també es veu facilitat per l'acció d'exonucleases i endonucleases a la cèl·lula, que accedeixen al DNA cromosòmic al pont després de la ruptura de l'embolcall nuclear. Per provar aquest segon model, l'equip de la BU va fer una pantalla de siRNA basada en imatges de cèl·lules vives dirigida a 38 exonucleases i endonucleases humanes. Vam plantejar la hipòtesi que determinades exonucleases i endonucleases són importants per promoure el trencament de ponts. Si fos cert, s'esperaria que la pèrdua d'aquestes nucleases faria augmentar significativament la quantitat de temps que triguen els ponts a trencar-se, cosa que faria augmentar també la fracció de cèl·lules amb ponts cromosòmics. Les nostres dades indicaven que l'esgotament de diverses nucleases augmentava significativament la fracció de cèl·lules amb ponts cromosòmics en relació amb els controls.

Entre totes les nucleases analitzades, l'endonucleasa ANKLE1 es va identificar com a potencialment implicada en la resolució de ponts cromosòmics, ja que les cèl·lules inhibides d'ANKLE1 van mostrar i van augmentar la freqüència de ponts cromosòmics en cèl·lules interfàsiques després de la inducció CRISPR/Cas9 en comparació amb les cèl·lules no inhibides.

4. Resolució del pont cromosòmic durant la citocinesi i la interfase primerenca

Els diferents escenaris observats durant la mitosi i la citocinesi suggereixen que les causes del trencament del pont cromosòmic podrien ser diferents. Alguns ponts romanen intactes i les cèl·lules que els allotgen arriben a la citocinesi experimentant un canvi d'escenari que implica el desmuntatge del fus mitòtic, el reasseblatge de l'embolcall nuclear i la citocinesi, que inclou l'especificació del pla d'escissió, l'entrada del solc d'escissió, la formació del mig cos i l'abscisió. L'endonucleasa ANKLE1 podria ser la responsable de la resolució del pont cromosòmic durant la citocinesi. La nostra conclusió es basa en l'observació que la inhibició d'ANKLE1 va conduir a una freqüència més alta de cèl·lules que arribaven a la interfase amb ponts cromosòmics, fet que

indica que ANKLE1 té un paper en la resolució del pont cromosòmic previ a la interfase. Els resultats de la BU s'alineen amb els obtinguts en altres estudis que suggereixen que l'ortòleg de *C. elegans* d'ANKLE1 resol ponts de cromatina (Hong *et al.*, 2018) i que ANKLE1 es recluta a la regió del cos mitjà per resoldre cèl·lules humanes de cromatina atrapades (Jiang *et al.*, 2023). En conjunt, aquestes troballes suggereixen fermament que ANKLE1 pot contribuir al trencament del pont cromosòmic durant la citocinesi.

Tot i que ANKLE1 es recluta a la regió del cos mitjà durant la citocinesi, podria ser responsable del trencament del pont cromosòmic en la interfase primerenca. Segons els nostres resultats, durant la interfase coexisteixen dos tipus de ponts, els ponts de curta vida, que es resolen independentment de la reparació per excisió de nucleòtids (NER), i els ponts de llarga vida, que experimenten la NER abans de la seva resolució. Que ANKLE1 té un paper durant la interfase és evident a partir de l'observació que la inhibició d'ANKLE1 o l'impediment del seu reclutament redueix la fracció de ponts que es resolen en poc temps i mitjançant un mecanisme independent de la NER. ANKLE1 es localitza en el citoplasma durant la interfase a causa del seu senyal d'exportació nuclear (Zlopasa *et al.*, 2016) i és reclutat a la zona mitjana del fus durant la citocinesi. Per tant, les cèl·lules amb ponts cromosòmics resolts per ANKLE1 durant la interfase podrien haver reclutat aquest enzim abans de passar a la interfase.

5. Resolució de ponts cromosòmics durant la interfase

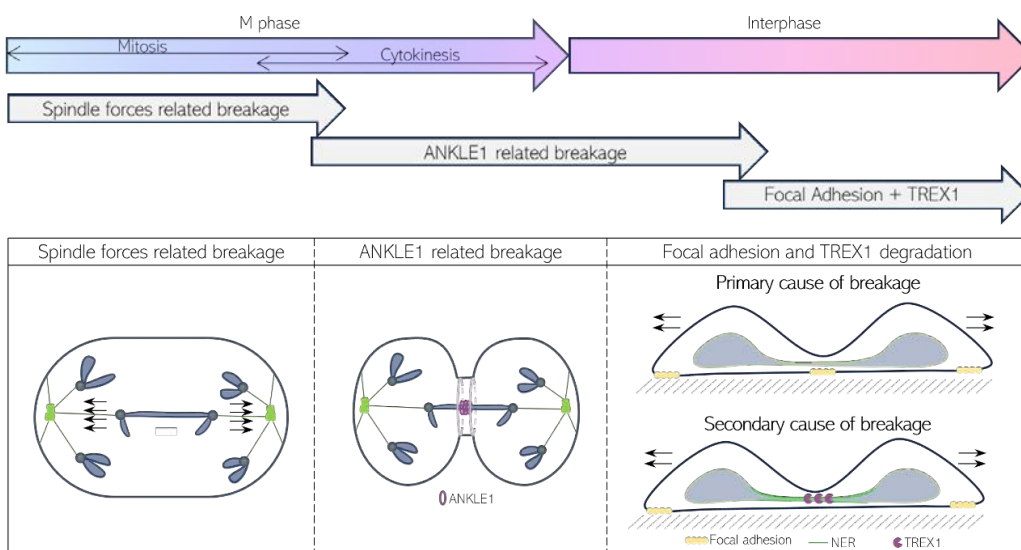
Les cèl·lules que allotgen ponts cromosòmics poden progressar a través de la interfase del cicle cel·lular i sovint presenten un col·lapse de l'embolcall nuclear que envolta el pont. L'anàlisi d'imatges de cèl·lules vives ens ha permès esbossar una seqüència d'observacions. En general, les cèl·lules amb ponts cromosòmics neixen amb un embolcall nuclear no trencat que envolta les cèl·lules filles, els nuclis primaris i el pont. Mentrestant, les dues cèl·lules filles acabades de néixer migren, allunyant-se l'una de l'altra. Bruscament, els ponts pateixen NER, però les cèl·lules continuen migrant. De sobte, el pont esdevé discontinu. Tot i que la NER precedeix el trencament del pont, el moment d'ocurrència de la NER no es correlaciona amb el moment de trencament del pont, cosa que indica un paper facilitador potencial de la NER en l'esdeveniment del trencament.

Durant la interfase del cicle cel·lular, la resolució dels ponts cromosòmics depèn del seu ancoratge al substrat mitjançant adherències focals. Aquest ancoratge, al seu torn, desencadena la NER i permet reclutar TREX1, una exonucleasa citoplasmàtica. Aquesta conclusió es basa en quatre observacions. En primer lloc, els ponts cromosòmics sovint mostren paxil·lina, un component clau de les adherències focals, que indica el seu ancoratge al substrat. En segon lloc, en reduir la força d'adhesió focal mitjançant la inhibició de la fosforilació de la cadena lleugera de la miosina, tant la resolució de la NER com la del pont es retarden. Això demostra que la NER i la resolució del pont cromosòmic depenen de l'adhesió de les cèl·lules filles al substrat. En tercer lloc, TREX1 es recluta només per a ponts que exhibeixen NER, fet que dona suport a la noció que, després del col·lapse de NE, la majoria dels ponts recluten l'exonucleasa TREX1 associada a ER. En quart lloc, l'exonucleasa TREX1 requereix un trencament inicial per començar a degradar el DNA. Els nostres resultats mostren que els ponts que presenten BAF brillant tenen més probabilitats de tenir DSB que els ponts BAF basals. Atesa l'associació entre BAF brillant i adhesió focal, es pot inferir que l'adhesió focal pot contribuir a facilitar l'osca inicial de DNA necessari per a l'activitat de TREX1. En conjunt, les nostres observacions suggereixen que la migració a part de les cèl·lules amb ponts cromosòmics, juntament amb la presència d'adhesió focal sota la cromatina pont, pot facilitar la NER i el trencament de la molècula de DNA dins del pont. Aquests esdeveniments són crucials per reclutar l'exonucleasa TREX1 i per permetre la digestió del DNA dins dels ponts cromosòmics.

En resum, la resolució dels ponts cromosòmics durant la interfase sorgeix de la sinergia entre processos mecànics i bioquímics. Les cèl·lules que allotgen ponts cromosòmics en interfase es comporten com dues entitats separades, i migren allunyant-se l'una de l'altra, però continuen connectades pel pont, sovint ancorades al substrat a través de l'adhesió focal. Aquesta combinació d'esdeveniments inicia la resolució del pont durant la interfase i desencadena la NER. Posteriorment, TREX1 és reclutat al pont per digerir el DNA dins de l'embolcall nuclear trencat. És important destacar que aquesta exonucleasa requereix un trencament inicial, que potencialment podria resultar d'adhesions focals o mecanismes alternatius.

6. Dinàmica de la resolució dels ponts cromosòmics: cap a un model integrador

La comprensió predominant sostenia que la resolució del pont és impulsada per un únic mecanisme, ja sigui dirigit per TREX1 (Maciejowski *et al.*, 2015) o per forces d'estirament aplicades pel citoesquelet (Umbreit *et al.*, 2020). No obstant això, els resultats presentats en aquest projecte demostren que els ponts cromosòmics es resolen a través de diversos mecanismes en diferents etapes del cicle cel·lular. En conseqüència, percebem la resolució dels ponts cromosòmics com un procés multifacètic. Tenint en compte que la resolució dels ponts es produeix al llarg del cicle cel·lular, amb cada etapa adaptada segons les condicions ambientals úniques, no és sorprenent que observem una varietat de mecanismes que governen la resolució dels ponts (figura 1). Durant la mitosi, el trencament es produeix principalment a causa de factors mecànics, impulsats per forces de tracció exercides pel fus mitòtic. A més, alguns ponts persisteixen més enllà de la telofase, i l'endonucleasa ANKLE1 reclutada durant la citocinesi degrada els ponts cromosòmics, fet que dona com a resultat el trencament del pont. Finalment, els ponts que no s'han resolt ni durant la mitosi per causes mecàniques ni després per mecanismes bioquímics poden tenir una nova oportunitat de resoldre's durant la interfase. Tot i estar connectades pel pont nucleoplasmàtic, les cèl·lules que neixen amb ponts cromosòmics no resolts migren allunyant-se les unes de les altres. En aquestes circumstàncies, entenem que la resolució dels ponts cromosòmics durant la interfase depèn d'una sèrie de processos mecànics i bioquímics. Les forces d'adhesió dels ponts al substrat contribueixen al trencament de NER i DNA. Aquests esdeveniments, al seu torn, faciliten l'entrada de l'enzim TREX1 per completar la resolució del pont.



3. Rellevància i possibles implicacions futures

Entendre els diferents mecanismes pels quals els ponts es resolen és crucial, ja que els resultats potencials que es derivin d'aquests mecanismes de resolució poden variar significativament. Especulem que, a escala cel·lular, l'extensió del dany al DNA pot variar en funció del mecanisme implicat. Els processos que actuen de manera localitzada, com les forces de tracció dels microtúbuls o l'activitat d'ANKLE1, probablement resulten en menys dany en comparació amb els mecanismes que involucren enzims com TREX1, que degraden el DNA al llarg de l'àrea del pont cromosòmic sotmès a la NER. A escala d'organisme, la NER condueix a l'exposició del contingut nuclear al citoplasma, cosa que potencialment desencadena conseqüències com l'activació de la proteïna citosòlica d'unió al DNA cGAS, que pot iniciar la resposta immunitària innata. Aquesta activació és especialment potent quan cGAS interacciona amb DNA que no té organització nucleosòmica (Kujirai *et al.*, 2020), com pot passar en els ponts cromosòmics. No obstant això, l'acumulació de BAF (Guey *et al.*, 2020) o TREX1 (Mohr *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021) pot dificultar la via cGAS-STING. Per tant, els ponts cromosòmics amb BAF augmentat o processats per TREX1 també podrien impedir la senyalització de cGAS. Ateses les incerteses, es necessiten més investigacions per determinar si els ponts cromosòmics amb NER activen el sistema immunitari.

La recerca d'aquest projecte contribueix a resoldre debats de llarga durada al voltant de la resolució de ponts cromosòmics. Aquest estudi revela un model per a la resolució de ponts cromosòmics, i aporta nova informació sobre els processos tant mecànics com bioquímics que operen de manera dependent del cicle cel·lular. Aquestes troballes tenen implicacions significatives per a la comprensió de la inestabilitat genòmica en les cèl·lules canceroses, en què la presència de ponts cromosòmics pot contribuir a cicles d'alteracions del DNA que culminen en inestabilitat cromosòmica.

4. Bibliografia científica generada

Publicacions directament derivades del projecte de recerca finançat per 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.

Manuscripts preparats per presentar-los a revistes científiques:

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.*

Manuscripts en preparació:

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

Ponències en congressos científics directament derivats del projecte de recerca

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. Juny del 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 setembre del 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 juny del 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 juny del 2023.